



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Érica Patricia de Lima

**Taxonomia Integrativa morfo-molecular das
espécies de zoantídeos do gênero *Protopalythoa*
(Cnidaria: Anthozoa) em Pernambuco**

Vitória de Santo Antão

2014

Érica Patricia de Lima

**Taxonomia Integrativa morfo-molecular das
espécies de zoantídeos do gênero *Protopalythoa*
(Cnidaria: Anthozoa) em Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia

Vitória de Santo Antão

2014



Dissertação de Mestrado apresentada por **Érica Patricia de Lima** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**Taxonomia Integrativa morfo-molecular das espécies de zoantídeos do gênero Protopalythoa (cnidária: Anthozoa) em Pernambuco**”, orientada pelo Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez, aprovada no dia 29 de abril de 2014 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Carlos Daniel Pérez
CAV-UFPE

Dr. Augusto César Pessoa Santiago
CAV-UFPE

Dr.^a Luciana Ianuzzi
Dep. Zoologia-UFPE

Autora

Érica Patricia de Lima

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca do Centro de Acadêmico de Vitória
Bibliotecária Jaciane Freire Santana

L732t Lima, Érica Patrícia de

Taxonomia Integrativa morfo-molecular das espécies de zoantídeos do gênero *Protopalythoa* (Cnidaria: Anthozoa) em Pernambuco /Érica Patrícia de Lima. Vitória de Santo Antão: O autor, 2014.

Xiii + 52 folhas: fig.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez

Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014.

1. Cnidários. 2. Arrecifes de coral. 3. Anemona do mar. I. Pérez, Carlos Daniel. II. Garcia, José Eduardo. III. Título.

593.5 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-017/2014

Dedico esse trabalho ao meu amigo,
companheiro e eterno amor, à meu esposo
Thiago por toda compreensão e carinho, obrigada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, meus pais e meus irmãos por todo apoio, por ser minha eterna fortaleza. Principalmente minha mãe a mulher mais maravilhosa que conheço, é o meu maior exemplo de amor!

Quero agradecer demais ao meu professor e amigo Carlos Pérez pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela sua orientação, compreensão nos momentos de dificuldades, pela paciência com meu jeito enrolado e pelos divertidos e bons momentos que tivemos. Que nossa parceria possa continuar por muito tempo.

Agradeço ao professor José Eduardo por sua orientação, por ter me mostrado esse mundo novo e complicado da genética. Agradeço por sua compreensão e amizade. Mesmo com o tempo corrido sempre foi muito atencioso, obrigada!

Quero agradecer ao professor Rodrigo, que nos momentos finais foi importante pelas análises filogenéticas, obrigada. Quero agradecer ao professor Cristiano por ter disponibilizado, tantas vezes seus materiais e espaço e pela ajuda na histologia.

De uma forma muito especial quero agradecer a Paula Gomes por sua orientação, toda sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Quero agradecer por tudo que você já fez por mim, por tudo que me ensinou, pela sua paciência, por nossas conversas, pelos bons momentos que tivemos, pelo seu apoio. Você não é apenas minha professora, é uma amiga muito querida por quem tenho muito carinho e admiração. Obrigada pela oportunidade de está vivendo tudo isso!

Quero agradecer a todos do GPA (Gislaine, Manuela, Liliane, Débora, Davi, Felipe, Taciana, Renata, Amanda, Rafael Bezerra, Lais, Nathália, Alessandra, Ericka e Erika Flavia) esse grupo é fantástico e todos têm participação nesse trabalho, contudo preciso agradecer especialmente a algumas pessoas. A Suellen e a Nadia pela parceria nesse mestrado, pelas horas de estudos e risadas que demos juntas, vocês tornaram esses dois anos muito mais leve. Obrigada Suellen pela “guarita” em vários dias, você e Nadia foram dois presentes que ganhei nessa jornada. Obrigada a Janine por toda ajuda, toda cumplicidade, pelas várias caronas e por tudo. Agradeço também a Liany por tudo, mais principalmente por toda força e ajuda que me deu na parte molecular, obrigada tia!! Obrigada a meu pitel (Roger), que me ajudou tanto nas coletas, sempre um cavalheiro. Obrigada a Ralf por toda ajuda com os textos, os papers, as figuras, valeu fio!

Quero agradecer a duas pessoas muito especiais e que foram importantíssimas nesses dois anos. A Bel por toda sua ajuda dentro e fora do laboratório, sem você garota sei não como teria sido... obrigada pela força e pela amizade, você é uma pessoa muito especial. Outra pessoa muito importante é meu querido Rafael, Rafa você foi super! Obrigada pela paciência e por toda ajuda, sem você as coisas teriam sido bem mais complicadas!

Quero agradecer aos meus eternos amigos Sarco (Gê, Ozias, Thiago e Belinha) amo vocês! Preciso agradecer a meu querido amigo/primo Thiago Franklin, que me salvou tantas vezes com essas coisas tecnológicas, obrigada meu querido, você é nota 10!

Preciso agradecer a todos que fazem o Centro Acadêmico de Vitória que me acolheram de uma forma muito especial, a todos os professores que fazem parte do centro e a todos os colegas de mestrado. Aproveito para agradecer a FACEPE que me proporcionou o suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Por último, quero agradecer a aquele que foi de fundamental importância durante todo esse tempo, ao meu amor lindo, ao meu amigo, meu companheiro, que esteve comigo por todo tempo, que não me deixou desanimar quando as coisas complicaram, que sempre me apoiou, me incentivou, me deu forças. Obrigada meu amor, por ter entendido minha falta de tempo, minha correria, meu estresse, por ter vivido comigo tão intensamente tudo isso, e principalmente pelo seu amor. Te amo para sempre!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	xi
1.1 Introdução	xii
1.2 Objetivos	1
1.2.1 Objetivo Geral	1
1.2.2. Objetivos Específicos	1
1.3 Revisão da Literatura	2
1.3.1 Cnidários	2
1.3.2 Zoantídeos	3
1.3.3 <i>Protopalythoa</i> Verril, 1900	5
1.3.4 Taxonomia Integrativa	7
CAPÍTULO 2	9
Taxonomia integrativa das espécies de zoantídeo <i>Brachycnemina</i> (Anthozoa: Zoantharia) no nordeste brasileiro com descrição de nova espécie.	
2.1. Introdução	10
2.2 Materiais e Métodos	11
2.3 Resultados e Discussão	17
2.4 Considerações Finais	40
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Mapa de Pernambuco mostrando os pontos de coletas dos morfotipos de *Protopalythoa variabilis*. (B) Mapa da localização do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Referência bibliográfica: COSTA, *et al.* 2011. Morphological plasticity in the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum* as an adaptive strategy. *Ann. Zool. Fennici*. 48: 349-358..... 12
- Figura 2. Árvore baseada em sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I, COI. Valores de suporte de bootstrap (Neighborn-Joining/Inferência Bayesiana)..... 18
- Figura 3. Árvore baseada em sequências do gene mitocondrial 16S rDNA. Valores de suporte de bootstrap (Neighborn-Joining/Inferência Bayesiana). 19
- Figura 4. Árvore baseada em sequências do gene mitocondrial 12S rDNA. Valores de suporte de bootstrap (Neighborn-Joining/Inferência Bayesiana). 20
- Figura 5. Colônias de *Protopalythoa variabilis*, morfotipo 1. (A) Pólipos abertos, mostrando detalhes do disco oral. (B) Pólipos entre colônias de *Zoanthus* sp..... 23
- Figura 6. Anatomia interna de *Protopalythoa variabilis*. (A) coluna dos pólipos; (B) corte transversal do tentáculo; (C) músculo do esfíncter; (D) faringe; (E) Arranjo mesenterial, mostrando os dois tipos de arranjo encontrado nos morfotipos 1 e 3; (F) corte transversal da coluna, com detalhe dos mesentérios. Ec – ectoderme; Mg – mesogléia; Me – mesentérios; En – endoderme; M – músculo esfíncter; S – sifonoglife; AM – arranjo macrocnemine; AB – arranjo brachycnemine; Mi – mesentério micronemine; Ma – mesentério macronemine..... 25
- Figura 7. Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 1 de *Protopalythoa variabilis*. (A) espirocisto, (B, D, F) basítrico, (C, G) p-mastigóforo, (E) holótrico, e (H) grande holótrico. Escala = 10µm..... 27
- Figura 8. Colônias de *Protopalythoa variabilis*, morfotipo 2. (A) Pólipos abertos, mostrando detalhes do disco oral, entre esponjas na praia de Casa Caiada, Olinda. (B) Colônias de *P. variabilis* na praia de Tamandaré..... 28
- Figura 9. Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 2 de *Protopalythoa variabilis*. (I, L, M) basítrico; (J) espirocisto; (K) holótrico; (N) p-

	mastigóforo; (O) holótrico grande; (P) holótrico pequeno. Escala = 10µm.....	29
Figura 10.	Colônias de <i>Protopalythoa variabilis</i> , morfotipo 3. (A) Pólipos, mostrando detalhes da linha no disco oral e tentáculos; praia do Paiva. (B) Detalhes do disco oral e peristoma, praia de Piedade.	30
Figura 11.	Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 3 de <i>Protopalythoa variabilis</i> . (Q) espirocisto; (R, T, U) basítrico; (S) holótrico; (V) p-mastigóforo; (X) grande holótrico. Escala = 10µm.	31
Figura 12.	Colônias de <i>Protopalythoa mínima</i> nov. sp. (A) colônias de <i>Protopalythoa mínima</i> nov. sp. entre colônias de <i>Palythoa caribaeorum</i> . (B) Pólipos de <i>Protopalythoa mínima</i> nov sp.	36
Figura 13.	Anatomia interna de <i>Protopalythoa mínima</i> nov. sp. (A) corte transversal da coluna mostrando sistema de canais da mesogléia com lacunas contendo grupos de células; (B) anatomia do tentáculo; (C) músculo do esfíncter; (D) mesentérios micronemine e macronemine. Mg.- mesogléia; Lc- lacunas na mesogléia; Ec- ectoderme; M- músculo esfíncter; Ma- mesentérios macronemine; Mi- mesentério micronemine.	37
Figura 14.	Tipos de cnidocistos encontrados em <i>Protopalythoa mínima</i> nov. sp. (1) espirocisto; (2, 5) basítrico; (3) holótrico grande; (4) holótrico pequeno; (6) p-mastigóforo. Escala = 10µm.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Localização das amostras de morfotipos de <i>Protopalythoa variabilis</i> em Pernambuco. Número de acesso do acervo do GPA. * amostra usada pelo marcador molecular. -- amostra não utilizada pelo marcador molecular.	14
Tabela 2.	Sequências de espécies utilizadas nesse estudo com genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), 16S rDNA e 12S rDNA. Números de Acesso do GenBank.	16
Tabela 3.	Comprimento e largura das cápsulas de cnidocistos e filamentos encontrados nos morfotipos de <i>Protopalythoa variabilis</i> . Frequência indica a quantidade de cnidocistos existentes nos pólipos. N número desejado de cápsulas de cnidocistos e n quantidade encontrada nos pólipos. As letras entre parênteses indicam os tipos de nematocistos nas figuras.	26
Tabela 4.	Comparação dos morfotipos de <i>Protopalythoa variabilis</i>	34
Tabela 5.	Comprimento e largura das cápsulas e filamentos dos cnidocistos encontrados em <i>Protopalythoa mínima</i> nov. sp. Frequência de cnidocistos existentes nos pólipos. N número desejado de cápsulas de cnidocistos e n quantidade encontrada nos pólipos. Os números entre parênteses indicam os tipos de cnidocistos na figura 11.	38
Tabela 6.	Comparação das espécies do gênero <i>Protopalythoa</i> registradas para o Oceano Atlântico.	42

RESUMO

Zoantídeos são cnidários comuns de águas rasas em todo o mundo e no Brasil compõe a maioria das comunidades de ambiente recifal, principalmente no nordeste brasileiro. Apesar de abundantes são ainda pouco estudados. Apresentam história taxonômica confusa e com descrições vagas. Dentre os gêneros mais comuns se destaca *Protopalythoa* (Zoanthidea: Sphenopidae) cujas espécies são abundantes dos recifes pernambucanos. O objetivo desse estudo é realizar a identificação das espécies do gênero *Protopalythoa* utilizando a integração de dados morfológicos, moleculares e ecológicos, para o esclarecimento de sua taxonomia. Foram realizadas coletas em oito praias de Pernambuco, entre 2012 e 2013, e uma amostra do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, coletada no ano de 2009, também foi analisada. No momento das coletas foram feitas fotografias das colônias e foi realizada a anotação de todas as características ecológicas e abióticas, como proximidade com outros organismos, profundidade das colônias e local onde foram coletadas. Foram mensuradas as dimensões dos pólipos (altura, diâmetro e quantidade de tentáculos), foram produzidas lâminas histológicas para análise da musculatura e foi realizado o cnidoma a partir dos tentáculos, da faringe e dos filamentos dos pólipos. Para análise molecular, foi realizada a extração, amplificação e sequenciamento do DNA das amostras utilizando os marcadores 12S, 16S e COI, a fim de construir relações filogenéticas entre os organismos. Os resultados moleculares e morfológicos revelaram a existência de três morfotipos para a espécie *Protopalythoa variabilis* na costa de Pernambuco e uma nova espécie *Protopalythoa mínima* nov. sp. descrita para o Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Variação intraespecífica foi observada dentro da espécie *P. variabilis*, confirmada por dados moleculares, além de ampla distribuição, já que os morfotipos se mostraram presente em quase todas as praias e ao longo de toda a costa pernambucana. As análises integradas se revelam eficientes na capacidade de identificar e descrever espécies de zoantídeos.

Palavras-Chave: *Protopalythoa variabilis*, Brachycnemina, Sistemática, Cnidários.

ABSTRACT

Zoanthids are common animals in shallow waters around the world and in Brazil composes the majority of the communities of reef environment, particularly in the northeast. Despite abundant are yet poorly studied. Present confused taxonomic history with faulty descriptions. Among the most common genera stands out genera *Protopalythoa* (Zoanthidea: Sphenopidae) abundant organism of Pernambuco reefs. The aim of this study is to identify species of the genus *Protopalythoa* using the integration of morphological and molecular data, to clarify their taxonomy. Collections were made in eight beaches of Pernambuco, between 2012 and 2013 and a sample of the Archipelago of São Pedro and São Paulo, collected in 2009, was also analyzed. At the time of collecting photographs of colonies were made and the annotation of all ecological characteristics were made, such as proximity to other organism, and depth of the colonies site they were collected. The size of the polyps (height, diameter and number of tentacles) was measured, histological slides for analysis of muscle were produced and cnidoma was produced from the tentacles, pharynx and filaments of polyps. For molecular analysis, extraction, amplification, and DNA sequencing samples were performed using 12S, and 16S markers COI, in order to construct phylogenetic relationships between organisms. Molecular, morphological and ecological results revealed the existence of three morphotypes to species *Protopalythoa variabilis* on the coast of Pernambuco and a new species *Protopalythoa minimum* nov. sp. described the Archipelago of São Pedro and São Paulo. Intraspecific variation was observed between morphotypes inside species of the *P. variabilis*, confirmed by molecular data, as well as wide distribution, morphotypes have proved present in almost all beaches and throughout the coast of Pernambuco. The integrated analyzes reveal themselves efficient in their ability to identify and describe species of zoanthids.

Keywords: *Protopalythoa variabilis*, Brachycnemina, Systematic, Cnidaria.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os zoantídeos são cnidários pertencentes à ordem Zoantharia ou Zoanthidea (Classe: Anthozoa), são representantes abundantes em comunidades marinhas ao redor do mundo (MARQUES E COLLINS, 2004) e se caracterizam por apresentar uma simetria radial, com tentáculos em dois ciclos e uma única sifonoglife (DALY *et al.* 2007). A grande maioria de suas espécies aparece na forma de colônias com exceção do gênero *Sphenopus* Streenstrup, 1856 (Família: Sphenopidae) que possui pólipos solitários. Essa ordem é dividida em duas subordens: Macrocnemine e Brachycnemine, tendo como principal diferença o quinto mesentério a partir do par de diretivos dorsal, que em Macrocnemine é completo e em Brachycnemine é incompleto (HADDON e SHACKLETON, 1890).

Apesar de essa divisão ser bem aceita a identificação de espécies não é muito fácil. Zoantídeos são animais de estrutura corporal muito simples possuindo poucas características taxonômicas, isso atrelado a descrições incompletas e de baixa especificidade tem construído uma história taxonômica confusa para vários gêneros (BURNETT *et al.* 1997).

A atual classificação da ordem Zoanthidea tem como base caracteres morfológicos, ecológicos e moleculares (SINNIGER *et al.* 2013). A união desses caracteres junto às informações geográficas e biológicas constitui uma ferramenta potencialmente útil para discernir relações evolucionárias e filogenéticas formando uma taxonomia integrativa capaz de resolver a conturbada identificação das espécies de vários grupos (DAYRAT, 2005). Um dos gêneros que apresenta dificuldade de identificação é o gênero *Protopalythoa* (Subordem: Brachycnemine; Família: Sphenopidae), muitas de suas espécies possuem descrição com poucas características dificultando assim a identificação (RYLAND e LANCASTER, 2003; 2004). Esse gênero se caracteriza por apresentar alta incorporação de sedimentos na mesoglea de seus pólipos que são ligados apenas pela base por um cenênquima bastante fino e possuir tentáculos em quantidade superior a de outros gêneros pertencentes a mesma família (*Palythoa* entre 30 e 40; *Protopalythoa* entre 50 e 60) (RYLAND e MUIRHEAD, 1993).

Apesar de *Protopalythoa* ser um organismo abundante e representativo da costa brasileira, principalmente no nordeste, pesquisas a cerca da taxonomia desse gênero são inexistente no Brasil, aumentando a confusão de taxonomistas na identificação dos tipos de espécimes, subestimando a quantidade de espécies encontradas nas praias, contribuindo

assim, para o pouco conhecimento que se tem sobre esse grupo. A quantidade de morfotipos confronta os poucos relatos de espécies, evidenciando que pode haver espécies crípticas ou, talvez, outras que ainda nem foram registradas. Algumas pesquisas sobre reprodução (BOSCOLO *et al.*, 2005) e distribuição desse gênero (OIGMAN-PSZCZOL *et al.* 2004; RABELO 2007; SOARES *et al.* 2011) foram realizadas no Brasil, porém isso é insuficiente para se ter um panorama geral de conhecimento desses animais.

Os estudos de integração taxonômica com zoantídeos auxiliam não apenas a descobertas de novas espécies, mas também esclarece a distinção dessas espécies, pois utilizam vários conhecimentos sobre os animais em estudo para obtenção de resultados satisfatórios. Proporcionando um amplo conhecimento sobre esses indivíduos, podem-se desenvolver assim novas pesquisas a cerca desse importante grupo. Dessa forma novos trabalhos podem ser realizados nos mais diversos campos, como a descoberta de novos produtos a partir desses organismos, já que os zoantídeos são uma potencial fonte de obtenção de produtos farmacológicos e estéticos (KELECON e SOLÉ-CAVA, 1982; MELO *et al.* 2012).

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Unir de forma integrativa as análises morfológicas, histológica, ecológica e molecular, a fim de realizar a identificação taxonômica e descrição das possíveis espécies de zoantídeos do gênero *Protopalythoa* distribuídas na costa pernambucana.

1.2.2. Objetivos específicos

- Identificar e descrever as espécies do gênero *Protopalythoa* nas praias de Pernambuco através de análises morfológicas e moleculares;
- Definir padrões de variação inter ou intra-específicas;
- Definir padrão de distribuição das espécies para costa pernambucana.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Cnidários

Os cnidários são animais que apresentam uma estrutura corporal simples, e possui como caráter diagnóstico a presença de um produto celular altamente complexo, a cnida, contido em células chamadas de cnidócitos, muito provavelmente resultado de um ancestral comum (COLLINS, 2002; MARQUES e COLLINS, 2004 e DALY *et al.*, 2007). São animais que possuem uma simetria radial primária em torno do eixo longitudinal de seu corpo, com extremidade oral e aboral (DALY *et al.*, 2007) apresentando duas formas corporais básicas, o pólipó e a medusa e são em sua maioria marinhos, com exceção de alguns poucos hidrozoários dulcícolas.

De acordo com Marques e Collins (2004) o filo Cnidaria pode ser dividido em cinco classes: Hydrozoa, representado por hidras, caravelas e medusas; Cubozoa, medusas com umbrela cubiforme; Scyphozoa, representado por águas-vivas; Anthozoa, que corresponde a anêmonas-do-mar, zoantídeos, corais escleractíneos e octocorais; e Staurozoa, representada por medusas sésseis, sendo que esta última, não é considerada classe por muitos autores.

Entre as classes citadas acima, Anthozoa é a que apresenta o maior número de espécies descritas, com cerca de 7.500 espécies (DALY *et al.*, 2007), e se caracteriza principalmente por não possuir o estágio medusoide em seu ciclo de vida apenas a forma polipoide. Dividi-se em duas subclasses: Octocorallia que apresenta pólipos compostos por oito tentáculos pinados e oito mesentérios, apresentando como exemplo os alcionáceos e gorgonáceos, e Hexacorallia representada por animais que contém tentáculos e mesentérios em número múltiplo de seis, como exemplo os zoantídeos, anêmonas-do-mar, corais escleractíneos e ceriantários (FAUTIN e MARISCAL, 1991; PÉREZ, 1999). O pólipó dos Antozoários é constituído por um tubo com uma abertura, a boca, que está rodeado por um ou mais ciclos de tentáculos ocos. Estudos filogenéticos de dados morfológicos sugerem que, pelo menos, três apomorfias estão presentes entre os Antozoários: a actinofaringe, sifonoglífe e os mesentérios (WON *et al.*, 2001). A actinofaringe é um tubo linear formado pela ectoderme ligando a abertura oral à cavidade gastrovascular, encontrada em quase todos os Antozoários, exceto o coral negro *Sibopathes* (OPRESKO, 1998). A sifonoglífe é uma região ciliada presente na actinofaringe, podendo ser única ou pareada, em alguns indivíduos clonais pode apresentar mais de duas (DALY *et al.*, 2007) tem como função facilitar a entrada de água auxiliando na absorção de nutrientes. Os mesentérios são folhas de tecido longitudinais, que se estendem radialmente a partir da parede do corpo em direção

a actinofaringe, aumentando a superfície interna do pólipo contribuindo assim para a respiração e a absorção de alimentos (HÄUSSERMANN e OFWEGEN, 2010), proporcionando também um suporte mecânico ao seu corpo e uma simetria radial, característico da classe (PLAYFAIR e MCMURRICH, 1896). Além disso, os mesentérios contribuem para a identificação taxonômica de alguns grupos de Antozoários.

Todos os Antozoários são bentônicos e a maior parte sésil, apresentando em sua maioria (corais escleractíneos, zoantídeos e octocorais) uma estrutura colonial, mantendo seus pólipos ligados através de um tecido vivo, chamado de cenênquima (PLAYFAIR e MCMURRICH, 1896). Os membros de uma colônia são obtidos através de reprodução assexuada, a partir de um pólipo fundador resultante de reprodução sexual (HÄUSSERMANN e OFWEGEN, 2010). Esses animais podem ser encontrados em todos os oceanos, de regiões rasas a grandes profundidades, sendo em águas rasas os principais representantes dos recifes.

No ambiente recifal os principais Antozoários existentes são os corais escleractíneos, anêmonas-do-mar e os zoantídeos sendo este último o principal grupo presente nos recifes brasileiros. Os zoantídeos (Ordem Zoanthidea) são encontrados em todos os oceanos na faixa tropical e subtropical (RYLAND e LANCASTER, 2003), e trabalhos recentes mostram que também podem ser encontrados em grandes profundidades (RYLAND E LANCASTER, 2003; SINNIGER *et al.*, 2010; CARREIRO-SILVA *et al.*, 2011 e SINNIGER *et al.*, 2013).

1.3.2. Zoantídeos

São animais em sua maioria coloniais, apresentando apenas o gênero *Sphenopus*, (Subordem Brachycnemina, Família Sphenopidae) como representante de pólipo solitário (RYLAND, 1997). Possuem seus pólipos unidos pela região basal ou pela coluna através de um cenênquima ou estolão, com ausência do disco pedal. A grande maioria desses organismos possui a capacidade de agregar a seus tecidos, partículas de sedimentos, espículas de esponjas ou detritos, para proteção de seus pólipos. Possuem dois ciclos de tentáculos curtos um interno e outro externo e uma única sifonogliffe (HADDON e SHACKLETON, 1890, 1891).

Os zoantídeos possuem uma organização mesenterial bem característica, essa observação foi feita inicialmente por Andres (1877) sendo esse o ponto inicial de separação da ordem Zoanthidea de outros Actiniaria. Hertwig (1882) corroborando os estudos de Koch (1880) afirma que os zoantídeos possuem septos (posteriormente chamados de mesentérios) completos que partem da parede da coluna e tocam a actinofaringe onde estão presentes os filamentos e as gônadas, e septos incompletos que não tocam a

actinofaringe e são estéreis. Dessa forma, o arranjo mesentérico de zoantídeos se organiza em pares alternando mesentérios completos e incompletos. Outra observação feita por Hertwig (1882) foi que os zoantídeos possuem dois pares de mesentérios diretivos, localizados nas extremidades da actinofaringe, um par na posição ventral formado por mesentérios completos (localizados próximos a sifonoglifo), e um par na posição dorsal formado por mesentérios incompletos.

Haddon e Shackleton (1890), trabalhando com espécies dos gêneros *Epizoanthus*, *Parazoanthus*, *Palythoa* e *Zoanthus* verificaram que o arranjo mesentérico dos zoantídeos apresentava um padrão de organização sempre constante. De acordo com os autores, a partir dos mesentérios diretivos da posição dorsal, os quais chamaram de sulcular, se observou dois padrões de organização: no primeiro, se verificou que o quinto mesentério, de ambos os lados, é incompleto e no segundo padrão, que o quinto mesentério, também de ambos os lados, é completo. Baseado nessas observações os autores criaram as duas subordens existentes para zoantídeos. Quando o quinto mesentério a partir do sulcular for incompleto, se caracteriza a subordem Brachycnemine, e quando o quinto mesentério for completo, se caracteriza a subordem Macrocnemine. Essa divisão foi fundamental para a organização das famílias de zoantídeos em todo o mundo. Atualmente se sabe que além da organização dos mesentérios, outros fatores também são observados para separação das subordens (RYLAND *et al.*, 2004). A subordem Macrocnemine se caracteriza também por apresentar distribuição geográfica global, distribuição batimétrica, simbiose com outros invertebrados (OCANÃ E BRITO, 2004; SWAIN E WULFF, 2007; SINNIGER *et al.*, 2010) e ausência de zooxantelas na maioria dos seus representantes (SWAIN, 2010). Ao contrário, a subordem Brachycnemine possui uma distribuição geográfica centralizada nos trópicos e águas rasas em ecossistemas recifais (BURNETT *et al.*, 1994; 1997; RYLAND E LANCASTER, 2003; REIMER *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2007c, 2008a, 2008b, 2010, 2011, 2012; NICHOLAS *et al.*, 2009), não possui simbiose com outros invertebrados e a maioria de seus representantes são zooxantelados (SWAIN, 2010). Segundo Sinniger *et al.* (2005), a subordem Brachycnemine parece ser um grupo monofilético, enquanto Macrocnemina aparece como grupo parafilético.

As subordens de zoantídeos comportam um total de sete famílias, sendo três da subordem Brachycnemine (Sphenopidae, Zoanthidae e Neozoanthidae) – com seis gêneros – e quatro da subordem Macrocnemine (Epizoanthidae, Hydrozoanthidae, Microzoanthidae e Parazoanthidae) – com doze gêneros – (SINNIGER *et al.*, 2013). Reimer e colaboradores (2007d) descobriram uma nova espécie de zoantídeo de profundidade (3259 m de profundidade) *Abyssoanthus nankaiensis*, que caracterizava um novo gênero *Abyssoanthus*

e uma nova família Abyssonanthidae. Por apresentar caracteres distintos, Abyssonanthidae não se encaixa em nenhuma das duas subordens de zoantídeos, permanecendo com sua classificação incerta (SINNIGER *et al.*, 2013).

Entre as famílias de zoantídeos Brachycnemines podemos destacar a família Sphenopidae pela ampla distribuição de seus representantes presentes em todos os oceanos e mares tropicais, Sphenopidae tem como principal característica a incorporação de areia dentro da mesoglea dos pólipos de seus representantes (RYLAND e LANCASTER, 2003). Essa família possui os dois únicos gêneros que ainda tem sua definição um pouco confusa, *Palythoa* Lamouroux, 1816 e *Protopalythoa* Verril, 1900 que por apresentarem características morfológicas semelhantes foram considerados congêneros por Pax (1910). Essa ideia é apoiada por alguns autores que se baseiam principalmente em dados moleculares (SINNIGER *et al.*, 2005; REIMER *et al.*, 2006b). No entanto, não é uma hipótese aceita por todos. Alguns pesquisadores defendem a separação dos gêneros (KOEHL, 1977; RYLAND e MUIRHEAD, 1993; RYLAND e LANCASTER, 2003), principalmente porque morfológicamente apresentam claras diferenças como a espessura do cenênquima e a quantidade de tentáculos, e mesmo em estudos moleculares os valores para união dos clados são relativamente baixos.

1.3.3 *Protopalythoa* Verril, 1900.

Anthozoa Ehrenberg, 1833

Hexacorallia

Zoanthidea Hertwig, 1882

Brachycnemina Haddon & Shackleton, 1891

Sphenopidae Hertwig, 1882

Protopalythoa Verril, 1900

O gênero *Protopalythoa* foi inicialmente denominado de *Gemmaria* por Duerden, contudo em 1900 Verril percebeu que o nome *Gemmaria* já existia e denominava um gênero de Hydrozoa, devido a isso ele propôs a troca do nome para *Protopalythoa* e um novo tipo para o gênero, trocando *Gemmaria ruseii* por *Protopalythoa variabilis* (Duerden, 1898) com a justificativa da espécie *G. ruseii* não apresentar descrição completa e ausência de prancha de desenhos. Dessa forma, Verril confirma o gênero *Protopalythoa* caracterizando-o como cnidário colonial que apresenta músculo do esfíncter único e mesogleal; mesentérios microtipicos; a mesoglea contém lacunas, algumas provenientes de grãos de areia, o que

torna os pólipos mais ou menos coriáceos. Os zoóides são, em sua maioria monóicos, às vezes dióicos.

Verril faz uma pequena revisão do gênero *Protopalythoa* e admite que apenas algumas espécies sejam válidas, pois a grande maioria não apresentava uma descrição completa, muitas vezes sendo difícil de identificar até mesmo a cor dos pólipos. Entre as espécies válidas estão, *Protopalythoa isolata* (McMurrich, 1889) descrita para Bahamas, *Protopalythoa mutuki* (Haddon e Shackleton, 1891) descrita para o Estreito de Torres, Austrália, *Protopalythoa variabilis* (Duerden, 1898) e *Protopalythoa fusca* (Duerden, 1898) ambas descritas no Atlântico Caribenho, contudo trabalhos recentes (REIMER *et al.* 2012) mostram que *Protopalythoa fusca* seria na verdade sinônimo júnior de *Protopalythoa variabilis*. Nesse mesmo ano (1900) Verril, descreve mais duas espécies para o gênero, *Protopalythoa grandis* e *Protopalythoa grandiflora*, ambas descritas nas Bahamas.

Em 1910 Pax propõe a união dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa* criando três divisões para o gênero: a) *Imersae*, onde os pólipos estariam todos mergulhados em um cenênquima robusto, característico de *Palythoa*; b) *Intermedae* é uma forma parcial entre o cenênquima imerso e o livre; e c) *Liberæ*, em que os pólipos são livres no cenênquima, estando interligados apenas por um estolão, nessa forma Pax colocou todas as espécies descritas para o gênero *Protopalythoa*. Porém essa união não foi aceita entre todos os pesquisadores, porque os gêneros apresentam outras diferenças entre eles além do cenênquima (RYLAND E LANCASTER, 2003). Pax também afirma que a espécie *Protopalythoa grandiflora* na verdade é sinônimo de *Protopalythoa grandis*.

Em 1928 Verril descreve no Havaí uma nova espécie que ele atribuiu ao gênero *Zoanthus* e chamou de *Zoanthus vestitus*. Posteriormente em 1971 Wash e Bowers, analisando espécies do Atlântico Caribenho verificaram que a espécie *Zoanthus vestitus*, na verdade pertence ao gênero *Palythoa* forma *Liberæ* (grupo de *Protopalythoa*), então alteraram seu nome para *Palythoa vestitus*.

Em 1954 Carlgren analisando espécimes de várias localidades descreve quatro novas espécies de *Palythoa Liberæ* (= *Protopalythoa*): *Palythoa praelonga*, descrita na Ilha do Espírito Santo em Vanuatu, *Palythoa rickettsi* descrita na Ilha de Tiburon na Califórnia, *Palythoa ignota* descrita na Baía Angeles na Baixa Califórnia, México, *Palythoa insignis* descrita na Ilha Coronado na região de San Diego e *Palythoa pazi* descrita na região de La Paz na Baixa Califórnia, México. Contudo, comparando as descrições originais verifica-se uma semelhança muito forte entre as espécies descritas por Carlgren, no entanto, nenhum trabalho posterior foi realizado para confirmar sua veracidade.

Herberts (1972) realiza um trabalho com varias espécimes de zoantídeos descrevendo principalmente o cnidoma. Entre as espécies descritas está *Palythoa heidere* Carlgren, 1951, que apresentava uma descrição simples e com poucas características, então Herberts redescreve essa espécie fazendo uma comparação com outras espécies de localidades distintas, detalhando principalmente seu cnidoma, ausente na descrição original.

Mais atualmente, em 2003, Ryland (forte defensor da separação dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa*) e Lancaster realizando pesquisas na região do Estreito de Torres, descreveram uma nova espécie *Protopalythoa heliodiscus* e redescreveram a espécies *Protopalythoa mutuki* (Haddon e Shackleton, 1891).

Como foi observado o gênero *Protopalythoa* apresenta um total de 13 espécies descritas válidas em uma distribuição mundial, porem sempre próximo a região tropical e em águas rasas. Essa distribuição geográfica atrelado a dados ecológicos, morfológicos e moleculares são de fundamental importância para o esclarecimento da taxonomia desse gênero.

1.3.4 Taxonomia Integrativa

A taxonomia é a ciência responsável pela identificação, distinção e classificação dos organismos vivos da Terra. Para isso cada vez mais taxonomistas tem usado ferramentas capazes de auxiliar nessa identificação. Além da taxonomia tradicional que utiliza caracteres morfológicos como base para os trabalhos, tem-se integrado varias análises como estudos moleculares utilizando marcadores capazes de identificar o padrão da sequência genética de cada organismo (BAKER *et al*, 2003; HEBERT *et al*, 2003) além de dados fisiológicos, ecológicos e geográficos (DAYRAT, 2005; PADIAL *et al*. 2010).

Os estudos taxonômicos para zoantídeos são muito confusos principalmente pela elevada variação morfológica encontrada dentro desse grupo de organismos, muitas vezes atrelado a descrições incompletas dos morfotipos encontrados (BURNETT *et al*, 1997). Devido a esses fatores, a identificação dos zoantídeos baseado apenas em caracteres morfológicos tem gerado grande ambiguidade nas descrições realizadas (LONGO, 2002). Assim, tem se integrado cada vez mais dados, a fim de auxiliar a classificação dos organismos.

Um dos dados mais utilizados nas últimas décadas para identificação de zoantídeos têm sido as análises moleculares que foram inicialmente propostas para esse grupo por Burnett e colaboradores (1994; 1997) que ao utilizarem análises de aloenzimas determinaram os limites de populações de zoantídeos na Grande Barreira de Corais e suas relações filogenéticas. Após esses estudos vários trabalhos foram realizados utilizando

dados moleculares como importante ferramenta para a taxonomia dos zoantídeos. Longo (2002) mostrou a eficiência do marcador 16S DNA ribossomal na identificação de espécies do gênero *Zoanthus*. Vários pesquisadores têm realizado estudos filogenéticos com a ordem Zoantharia revelando sucesso nos resultados com os principais marcadores usados para esse grupo que são 16S DNA ribossomal, 12S DNA ribossomal, Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e o Transcrito Interno Nuclear de DNA ribossomal (ITS-rDNA) (SINNIGER *et al*, 2006; 2008; 2009; 2010; 2013; SWAIN, 2009; 2010; HIBINO *et al*, 2013; KRISHINA e GOPHANE, 2013). Um dos principais pesquisadores na área de estudos moleculares com zoantídeos é o professor James Davis Reimer que realizou vários trabalhos com diferentes marcadores moleculares (REIMER *et al*, 2006; 2007a; 2007b; 2008a, 2008b; 2010; 2011; 2012; 2013).

Esses vários trabalhos denotam a importância desse dado para a taxonomia, contudo apesar de eficiente a análise molecular não pode ser considerada a única ferramenta capaz de resolver os problemas de identificação das espécies. Como também, apenas características morfológicas não deve ser a única base para um estudo taxonômico. Baseado nisso, Dayrat (2005) apresenta uma idéia de unir de forma integrativa as várias faces de um estudo taxonômico, unindo as características morfológicas e os dados moleculares aos estudos ecológicos (OCANÃ e BRITO, 2004; SWAIN e WULFF, 2007; NICHOLAS *et al*, 2009; CARREIRO-SILVA *et al*, 2011), como reprodução, distribuição, habitat e nicho, além de estudos filogeográficos, genética de populações e biologia comportamental. Sinniger e colaboradores (2005) citam em seu estudo a importância de uma análise ecológica para a descrição de espécies de zoantídeos macrocnemines, que possuem alta simbiose com esponjas e octocorais, alertando a eficiência desses dados como fundamentais para a classificação dessas espécies.

Essa interdisciplinaridade observada na taxonomia integrativa pode vir a ser a solução para os grandes problemas taxonômicos observados dentro da ordem Zoantharia. Junto a isso, o aumento de pesquisas que tenham como foco a identificação e descrição correta dos zoantídeos será fundamental para o conhecimento desse grupo tão diverso e tão representativo dos ecossistemas recifais, principalmente na costa de nossa região nordeste, onde a ordem Zoanthidea é bastante representativa, no entanto esses estudos são escassos.

CAPÍTULO 2

Taxonomia integrativa das espécies de zoantídeo do gênero *Protopalythoa* (Anthozoa: Zoantharia) em praias do nordeste brasileiro, com descrição de nova espécie.

2.1 Introdução

A ordem Zoanthidea representa um grupo de cnidários que são na maioria colonial presentes em todos os oceanos do mundo, de regiões recifais a grandes profundidades. No Brasil, zoantídeos representam um dos grupos mais frequentes dentro das comunidades de águas rasas (ROHLFS de MACEDO e BELÉM, 1994). A região nordeste do Brasil é a que apresenta maiores abundâncias de zoantídeos, entre os mais representativos podem se destacar os gêneros pertencentes à subordem Brachycnemine, *Zoanthus* (Família: Zoanthidae), *Palythoa* e *Protopalythoa* (Família: Sphenopidae) (AMARAL *et al.* 2000; SOARES *et al.* 2006; BARRADAS *et al.* 2010; SOARES *et al.* 2011).

Apesar de abundantes, os zoantídeos são animais ainda pouco estudados, isso contribui para a falta de conhecimentos específicos (ecológicos, biológicos, taxonômicos) a cerca desses animais e um dos aspectos mais importantes e menos estudados no Brasil é o conhecimento taxonômico desse grupo. A ordem Zoanthidea possui uma história taxonômica confusa (REIMER *et al.* 2006b), em partes, devido a alta plasticidade morfológica (MILLER, 1994) apresentada por seus representantes, o que contribui para descrições incompletas e limitadas, aumentando assim a dificuldade de identificação de espécies e gêneros (FOSSA e NILSEN, 1998).

Dentre os gêneros citados acima, podemos destacar *Protopalythoa* como um dos mais representativos dos recifes brasileiros, porém o menos estudado entre todos. As espécies do gênero se caracterizam por apresentar altos níveis de incorporação de sedimentos nos tecidos de seus pólipos, possuir um cenênquima do tipo *Liberæ* (ver Pax, 1910) basal e curtos tentáculos, em quantidades acima de 60. Esse gênero possui um total de 12 espécies descritas, sendo a espécie tipo *Protopalythoa variabilis* (Verrill, 1900). Para o Brasil, apenas as espécies *P. variabilis* e *P. grandiflora* já foram mencionadas em estudos ecológicos (OIGMAN-PSZCZOL *et al.* 2004; BOSCOLO e SILVEIRA, 2005; CHIMETO *et al.* 2009; GONDIM *et al.* 2011; SILVEIRA e MORANDINI, 2011; SOARES *et al.* 2011). No entanto, nenhuns destes trabalhos tiveram abordagens ou estudos taxonômicos.

Tradicionalmente as espécies de *Protopalythoa* foram identificadas através de caracteres morfológicos como número de tentáculos, cor, forma e local do músculo do esfíncter, além do cnidoma, igual aos demais gêneros da ordem Zoanthidea. Todavia, apenas características morfológicas não são suficientes para esclarecer a posição taxonômica de determinados gêneros e espécies (BURNETT *et al.* 1997). Carlgren (1913), que foi um dos pesquisadores mais ativos dessa ordem, disse que “... *entre os representantes da classe Anthozoa (...), não há praticamente nenhum grupo tão uniforme nas suas características quanto à ordem Zoantharia...*”. Um século depois, a declaração de

Carlgrén continua precisa. Devido a essa falta de características, muitas descrições são vagas e incompletas, contribuindo para um status taxonômico muitas vezes errado. Isso ocorre em todo o mundo com várias espécies de zoantídeos. No Brasil, apesar de existirem pouquíssimos trabalhos taxonômicos sobre zoantídeos, nenhum apresenta a integração de várias análises para formação do status taxonômico, deixando uma lacuna de informação no conhecimento científico marinho.

Atualmente existe uma tendência a integrar os conhecimentos a cerca de determinado táxon, a fim de favorecer sua identificação. Essa ideia fica confirmada por Sinniger e colaboradores (2013) consideram a atual classificação de Zoanthidea baseada na integração de caracteres morfológicos, ecológicos e moleculares. A união desses caracteres junto a informações geográficas constitui a chamada taxonomia integrativa que é uma ferramenta potencialmente capaz de resolver a conturbada identificação das espécies de vários grupos (DAYRAT, 2005).

Recentemente, informações de análises moleculares têm sido uma importante ferramenta para a construção de relações filogenéticas entre os zoantídeos, contribuindo também para rever a taxonomia de vários grupos de zoantídeos e a descrição de novas espécies (LONGO, 2000; SHEARER *et al.* 2002; SINNIGER *et al.* 2005, 2008, 2010, 2013; SINNIGER e HAUSSERMANN, 2009; SWAIN e WULFF, 2007; SWAIN, 2009, 2010; REIMER *et al.* 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2007c, 2008a, 2008b, 2010, 2011, 2012a, 2012b, 2013; HIBINO *et al.* 2013; KRISHNA e GOPHANE, 2013) utilizando, muitas vezes, marcadores específicos para estudos em antozoários como os genes *16S*, *COI* e a região *ITS*. Contudo a utilização exclusiva de análises moleculares para identificação de espécies de zoantídeos não é suficiente para distinguir relações próximas de espécies (SINNIGER *et al.* 2008), sendo necessário a integração com outros parâmetros.

Portanto, o presente estudo tem por objetivo integrar conhecimentos morfológicos e moleculares a fim de descrever e identificar taxonomicamente as espécies pertencentes ao gênero *Protopalythoa* nas praias de Pernambuco e Arquipélago de São Pedro e São Paulo, no nordeste brasileiro.

2.2 Materiais e Métodos

Área de Estudo

Este estudo foi realizado ao longo da costa de Pernambuco nas principais praias do estado abrangendo as áreas norte (Ponta de Pedras), centro-metropolitano (Casa Caiada, Boa Viagem e Piedade) e Sul (Paiva, Suape, Porto de Galinhas, e Carneiros/Tamandaré) (Fig. 1A) durante o período de outubro de 2012 e março de 2013. A escolha das praias foi

de acordo com a presença do ambiente recifal e do organismo em estudo, além de proporcionar maior abrangência de áreas estudadas. Além desses pontos de coletas, foi obtida uma amostra coletada no arquipélago de São Pedro e São Paulo (Fig. 1B) em 2009 por integrantes de Grupo de Pesquisa em Antozoários - GPA.

Os recifes pernambucanos se caracterizam por serem recifes de arenito, com proximidade da costa nas praias citadas acima. Todas as praias visitadas apresentam uma diversidade de organismos marinhos alta, concentrando a maior biodiversidade marinha registrada para Pernambuco (FONSECA, 2002).

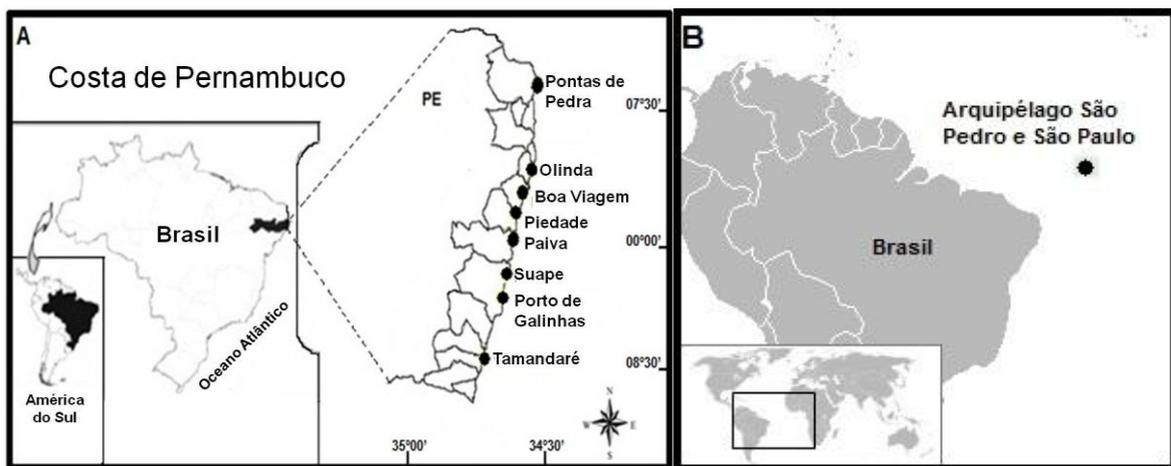


Figura 1. (A) Mapa de Pernambuco mostrando os pontos de coletas dos morfotipos de *Protospalythoa variabilis*. (B) Mapa da localização do Arquipélago de São Pedro e São Paulo - Coordenadas: 00°55.1' N, 29°20.7' W.

Coleta de dados

Durante as coletas foram observado à existência de quatro morfotipos: (morfotipos 1, 2 e 3) ao longo das praias em Pernambuco (Tab. 1) e morfotipo 4 no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. As coletas dos morfotipos foram realizadas nos recifes sempre na maré baixa, com profundidade máxima de 1 m. Com auxílio de espátula foram coletadas parte das colônias dos morfotipos, mínimo de 20 pólipos por amostra, para realização das análises em laboratório. No momento da coleta as amostras foram colocadas em fixadores apropriados de acordo com a análise que foi realizada. Além disso, cada morfotipo foi fotografado e as características do ambiente foram anotadas, como o substrato ao qual se encontra aderida a colônia, a profundidade em que foram coletadas, possíveis simbioses com outros organismos como esponjas ou outros cnidários, além da cor (coluna, disco oral e tentáculo) dos morfotipos.

Análise morfológica e histológica

Para análise morfológica as amostras foram condicionadas em formaldeído 4%. Em laboratório com uso de paquímetro foi feita a análise morfométrica de cada morfotipo, sendo mensurado a altura, diâmetro da coluna e diâmetro do disco oral, em um total de 20 pólipos de cada amostra. Nessa análise foi contabilizada a quantidade de tentáculos dos pólipos e demais características dos morfotipos.

Com auxílio de lupa e microscópio óptico foi realizado o cnidoma de tentáculos, faringe e filamentos dos pólipos. Para cada morfotipo foram utilizados quatro pólipos, para cada pólipos foram feitas três lâminas com o objetivo de contabilizar um total de 80 cápsulas de cada tipo de cnidocisto por morfotipo. Nos tipos de frequência rara não foi possível contabilizar o total desejado. A nomenclatura dos cnidocistos segue Weill (1934).

Paralelo as análises morfológicas foi realizado o estudo histológico da musculatura dos morfotipos. Para isso, partes das amostras coletadas foram colocadas em álcool 70% após fixação em formaldeído. Para preparar as lâminas histológicas foram realizados inicialmente processos de descalcificação e desilificação através de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetracético) e ácido fluorídrico (HF) respectivamente, para retirar todos os sedimentos contidos nos tecidos dos pólipos. Após esse procedimento, que dura em torno de quatro dias (48h no EDTA e 48h no HF), teve início o processo de produção das lâminas histológicas. Primeiro pela desidratação através de cinco banhos de etanol em diferentes porcentagens 70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II (45 min em cada), em seguida a diafanização através de dois banhos em xilol (30 min em cada), seguida de impregnação em parafina com dois banhos de 45 min cada e por fim o pólipos parafinado foi emblocado e cortado através de micrótomo com cortes de 7 μ m de espessura. Para conclusão do processo, os cortes foram desparafinizados através de banhos em xilol, álcool absoluto, álcool 80%, álcool 70%, água mineral e água destilada, então foram colocados em Hematoxilina por 30 s, em água corrente por 15 min, de volta para o álcool 80% e em seguida Eosina por 45 s. Para conclusão ocorreu a montagem das lâminas já coradas através de banhos em álcool e xilol e por fim foi passado Etelan para colagem definitiva da lamínula sobre o corte na lâmina. Após preparado, o corte foi visualizado em microscópio óptico sendo analisado a ectoderme, mesogléia e endoderme, além do músculo do esfíncter e o arranjo dos tentáculos e dos mesentérios dos pólipos.

Tabela 1. Localização das amostras de morfotipos de *Protopolythoa variabilis* em Pernambuco. Número de acesso do acervo do GPA. * amostra usada pelo marcador molecular. -- amostra não utilizada pelo marcador molecular.

Tipo de <i>Protopolythoa variabilis</i>	Local de Coleta	Número de acesso	Marcador molecular		
			COI	16S	12S
Morfotipo 1	Porto de Galinhas V	259	*	*	*
	Paiva I	260	--	*	--
	Ponta de Pedras I	263	*	*	*
	Piedade I	265	--	*	*
	Olinda I	269	--	--	--
	Suape II	273	--	*	*
	Suape IV	275	*	*	*
	Morfotipo 2	Porto de Galinhas I	257	--	--
Paiva III		262	*	*	*
Ponta de Pedras II		264	*	*	*
Piedade III		267	*	*	*
Boa Viagem		268	*	*	*
Olinda II		270	--	*	*
Suape I		272	*	*	*
Tamandaré I		276	*	*	*
Morfotipo 3	Porto de Galinhas II	258	--	--	--
	Paiva II	261	*	*	*
	Piedade II	266	*	*	*
	Olinda III	271	*	*	*
	Suape III	274	*	*	*

Análise Molecular (extração, amplificação e seqüenciamento do DNA)

As amostras coletadas dos morfotipos 1, 2, 3 e 4 foram fixadas em álcool P.A. 100% ainda em campo para conservar o DNA. A extração de DNA foi realizada através do Kit de Extração Promega, seguindo recomendações do fabricante, em todas as amostras coletadas. O processo de amplificação do DNA através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) aconteceu seguindo a literatura (SINNIGER *et al.* 2005; REIMER *et al.* 2007a) usando o Primer TaqTM DNA Polymerase (Genet Bio) seguindo orientações do fabricante. O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando o primer V5a (5'- ATT CGT AGT AAG ATG CTA C – 3') e V5r (TCG CCC CAA CCA AAC TGT CC – 3') (SINNIGER *et al.* 2008), com a seguinte condição ciclo-termal: 30 ciclos de 2 minutos à 95 °C, 2 minutos à 92 °C, 2 minutos à 53 °C, 1 minuto e 30 segundos à 72 °C e após os ciclos 10 minutos à 72 °C. O gene COI foi amplificado utilizando primer HCO2198 (5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3') e LCO1490 (5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TT GG – 3') (FOLMER *et al.* 1994) e o gene 12S foi amplificado utilizando o primer 3r (5' – ACG GGC NAT TTG TRC TAA CA – 3') e 1a (5' – TAA GTG CCA GCM GAC GCG GT -3') (SINNIGER *et al.* 2005) ambos genes seguiram as mesmas condições ciclo-termal: 30 ciclos de 2 minutos à 95 °C, 2 minutos à 92 °C, 2 minutos à 52 °C, 1 minuto e 30 segundos à 72 °C e após os ciclos 10 minutos à 72 °C. Por fim a região ITS rDNA foi amplificada utilizando o primer específico para zoantídeos

Zoan R (5' – CGG AGA TTT CAA ATT TGA GCT – 3') e Zoan F (5' – CTT GAT CAT TTA GAG GGA GT – 3') (REIMER *et al.* 2007b) seguindo a condição termal de: 30 ciclos de 2 minutos à 95 °C, 2 minutos à 92 °C, 2 minutos à 54 °C e 1 minuto e 30 segundos à 72 °C, após os ciclos mais 10 minutos à 72 °C. Contudo o gene ITS não foi adicionado aos resultados por não apresentar boa qualidade de produto amplificado, produzindo sequências de baixa qualidade.

Os produtos de PCR foram visualizados em de gel de Agarose a 1% através de eletroforese. O produto amplificado foi purificado utilizando o protocolo de purificação do kit QIAGEN [PCR PURIFICATION KIT (250)] QIAQUIK^R/QIAGEN, seguindo orientações do fabricante. Após esse processo, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento na MACROGEM Coreia, em seguida as amostras foram alinhadas manualmente utilizando o programa BioEdit v7.2.3 (HALL, 1999).

Análise Filogenética

As sequências foram editadas visualmente no Bioedit (HALL, 1999) e alinhadas utilizando o software Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994), implementado pelo Bioedit (HALL, 1999).

O modelo evolutivo da variância dos sítios de 12S, 16S e CO I foi avaliado pelo JMODELTEST (FELSENSTEIN, 2005; POSADA, 2008; DARRIBA, 2012). Relações filogenéticas foram inferidas por Inferência Bayesiana (com 11 milhões de gerações e desvio padrão < 0,01) usando o software Mr Bayes v.3.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003) e por valores de Neighbor-Joining usando PALP v4 0b10 (SWOFFORD, 2002). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando como grupo externo, sequências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de *Zoanthus sociatus* (número de acesso: EU348624) e de *Zoanthus* sp. coletado na praia de Piedade, Pernambuco. Sequências de espécies de *Protopalythoa* contidas no banco de dados GenBank (Tab. 2), foram utilizadas para comparação filogenética com as amostras coletadas em Pernambuco e Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

Foi também coletada uma amostra da espécie *Palythoa caribaeorum* Duchassaing e Michelotti, 1856, na praia de Piedade, Pernambuco (Fig. 1A), para realizar uma comparação filogenética entre esses gêneros que são os mais abundantes nos recifes de Pernambuco.

Tabela 2. Sequências de espécies utilizadas nesse estudo com genes mitocondriais Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), 16S rDNA e 12S rDNA. Números de Acesso do GenBank.

Táxon	Local de coleta	Número de acesso		
		COI	16S	12S
<i>Palythoa tuberculosa</i>	Ilhas Ogasawara – Japão	JF419795	EF988096	Não disponível
<i>Palythoa</i> “sp” <i>mada</i>	Local não identificado	Não disponível	EF687832	Não disponível
<i>Palythoa</i> sp <i>sakurajimensis</i>	Taiwan	Não disponível	KF499685	Não disponível
<i>Palythoa mutuki</i>	Nikko Bay Site XXIX - Taiwan	JF419796	KF499641	GQ464971
<i>Palythoa heliodiscus</i>	Short Dropoff - Taiwan	AB219216	KF499614	Não disponível
<i>Palythoa grandiflora</i>	Dania Beach - Flórida	JX119165	JX119142	Não disponível
<i>Palythoa</i> aff <i>clavata</i>	Miame Beach - Flórida	JX119167	JX119141	Não disponível
<i>Palythoa grandis</i>	Big Pine Key - Flórida	JX119164	JX119139	GQ464968
<i>Palythoa</i> aff <i>variabilis</i>	Hawk Channel Patch Reef - Flórida	JX119162	JX119137	Não disponível
<i>Palythoa caribaeorum</i>	Miame Beach – Flórida	AB219208	HM130470	GQ464972
<i>Palythoa</i> sp. 265	Ilha de Cabo verde	Não disponível	HM130464	Não disponível
<i>Palythoa</i> aff <i>caesia</i>	Trinidad and Tobago	Não disponível	GQ464872	GQ464970
<i>Palythoa singaporensis</i>	Singapura	Não disponível	EU333660	Não disponível
<i>Protopalythoa</i> sp	Local não identificado	Não disponível	AY995944	AY995924
<i>Palythoa</i> sp. 1142	Ilhas Ogasawara - Japão	JF419797	Não disponível	Não disponível

2.3 Resultados e discussão

Resultados morfológicos

De acordo com os resultados morfológicos os morfotipos 1, 2 e 3, coletados em Pernambuco, pertencem a espécie *P. variabilis* e o morfotipo 4, coletado no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, representa uma nova espécie para a ciência.

Sistemática

Ordem: Zoanthidea Hertwig, 1882

Subordem: Brachycnemine Haddon & Shackleton, 1891

Família: Sphenopidae Hertwig, 1882

Gênero *Protopalythoa* Verril, 1900

Espécie-tipo: *Gemmaria variabilis* Duerden, 1898 (Caribe: Jamaica)

Diagnose: Pólipos conectados por um cenênquima basal ou estolonar, com disco oral de diâmetro maior que a base; dois ciclos de pequenos tentáculos (>60); mesoglêia com lacunas e esfíncter mesoglêia simples.

Protopalythoa variabilis (Duerden, 1898)

Diagnose emendada de Pax (1910) (emendas em negrito)

Cenênquima pouco desenvolvido, fino, na forma de estolões **ou basal** na base dos pólipos. Altura média dos pólipos entre **7** e 50 mm. Capitulum com **30 a 36** cristas. De **60 a 70** tentáculos dispostos em dois círculos alternados. Grande quantidade de incrustações na parede do corpo. **60 a 70** mesentérios, **podendo ser de um lado do diretivo dorsal Brachycnemina e do outro lado Macrocnemina**. Monóicos. **Mesoglêia da coluna com abundância de lacunas e grupos de células dispostas de forma irregular**. Músculo do esfíncter único, mesogleal formado por pequenas lacunas com tamanho e forma variados. **Tentáculos possuem grande quantidade de cnidocistos do tipo espirocisto e basítrico, em menor número do tipo p-mastigóforo. Actinofaringe com abundância de holótricos grandes e basítricos. Filamentos contendo holótricos grandes, basítricos e p-mastigóforo, podendo apresentar holótricos pequenos em alguns tipos.**

Material: Uma colônia, 20 pólipos, Porto de Galinhas, 08°23'56" S e 35°03'50" W, 2012, GPA 257; uma colônia, 20 pólipos, Porto de Galinhas, 08°23'56" S e 35°03'50" W, 2012,

GPA 258; uma colônia, 20 pólipos, Porto de Galinhas, 08°23'56" S e 35°03'50" W, 2012, GPA 259; uma colônia, 20 pólipos, Paiva, 08°17'15" S e 35°02'00" W, 2012, GPA 260; uma colônia, 20 pólipos, Paiva, 08°17'15" S e 35°02'00" W, 2012, GPA 261; uma colônia, 20 pólipos, Paiva, 08°17'15" S e 35°02'00" W, 2012, GPA 262; uma colônia, 20 pólipos, Pontas de Pedra 07°33'38" S e 35°00'09" W, 2012, GPA 263; uma colônia, 18 pólipos, Pontas de Pedra 07°33'38" S e 35°00'09" W, 2012, GPA 264; uma colônia, 20 pólipos, Piedade 08°06'46" S e 35°00'53" W, 2012, GPA 265; uma colônia, 20 pólipos, Piedade 08°06'46" S e 35°00'53" W, 2012, GPA 266; uma colônia, 20 pólipos, Piedade 08°06'46" S e 35°00'53" W, 2012, GPA 267; uma colônia, 15 pólipos, Boa Viagem 08°03'14" S e 34°52'52" W, 2012, GPA 268; uma colônia, 20 pólipos, Olinda 08°00'32" S e 35°51'19" W, 2013, GPA 269; uma colônia, 20 pólipos, Olinda 08°00'32" S e 35°51'19" W, 2013, GPA 270; uma colônia, 20 pólipos, Olinda 08°00'32" S e 35°51'19" W, 2013, GPA 271; uma colônia, 20 pólipos, Suape 08°23'45" S e 34°58'04" W, 2013, GPA 272; uma colônia, 15 pólipos, Suape 08°23'45" S e 34°58'04" W, 2013, GPA 273; uma colônia, 15 pólipos, Suape 08°23'45" S e 34°58'04" W, 2013, GPA 274; uma colônia, 13 pólipos, Suape 08°23'45" S e 34°58'04" W, 2013, GPA 275; uma colônia, 15 pólipos, Tamandaré 08°45'35" S e 35°06'17" W, 2013, GPA 276; uma colônia, 12 pólipos, Tamandaré 08°45'35" S e 35°06'17" W, 2013, GPA 277.

Descrição dos morfotipos de *Protopalythoa variabilis*

Morfotipo 1 (GPA 259; 260; 263; 265; 269; 273; 275)

Descrição externa

As colônias possuem cenênquima basal, às vezes formando estolões que unem os pólipos, ambos os tipos de cenênquima possuem muitos grãos de sedimentos incorporados no tecido. Os pólipos apresentam aspecto de taça, com a base mais estreita que o disco oral. Esse padrão observado em algumas colônias faz com que o disco oral do pólipo não consiga abertura total, mantendo os tentáculos juntos. A altura dos pólipos varia de 7 a 31 mm e o diâmetro do disco oral de 2 a 14 mm. Possui de 60 a 70 tentáculos distribuídos em dois ciclos alternados. O capitulum possui de 30 a 35 cristas. Alguns pólipos possuem uma linha no disco oral bem marcada que começa na região da abertura oral até a extremidade final de um tentáculo que é mais largo que os demais (Fig. 5A).

O disco oral desse morfotipo apresenta uma tonalidade marrom escura, às vezes possuindo manchas brancas. Peristoma consideravelmente elevado, com boca alongada em forma de fenda, apresenta tonalidade marrom claro circundada por uma região mais clara.

Tentáculos possuem região interna e extremidade final em tom de verde, capitulum e coluna marrom clara, devido à alta quantidade de sedimentos incorporados aos tecidos (Fig. 5).

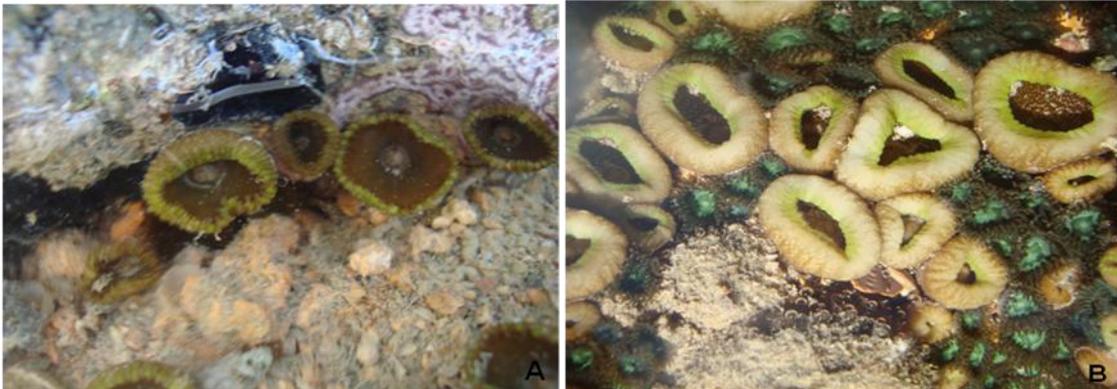


Figura 5. Colônias de *Protopalycha variabilis*, morfotipo 1. (A) Pólipos abertos, mostrando detalhes do disco oral. (B) Pólipos entre colônias de *Zoanthus* sp.

Anatomia Interna

Em secções longitudinais (SL) foi observado que a coluna do pólipo possui camada de ectoderme espessa porém muito degradada, devido a grande quantidade de lacunas resultantes do acúmulo de sedimentos, tornando essa camada irregular em toda a coluna do pólipo (Fig. 6A). Contêm muitas zooxantelas, grânulos de pigmentos e foi observada, com frequência, a presença de grandes holótricos nas lâminas dessa região. A mesoglêia espessa, com até 106 μm , possui lacunas proveniente dos sedimentos incorporados pelo tecido do pólipo. Também foi observada grande quantidade de lacunas contendo grupos de células em seu interior de tamanhos e formatos irregulares. Em direção a base do pólipo e a região oral a mesoglêia se torna mais espessa. A endoderme é formada por uma fina camada celular que, em direção a base do pólipo, se torna mais espessa.

Em secções transversais (ST) do disco oral foi observado que a ectoderme forma uma camada mais espessa que a mesoglêia (Fig. 6A), porém mais degradada devido a grande quantidade de lacunas deixadas pelos grãos de sedimentos incorporados pelo pólipo. A mesoglêia se torna mais uniforme com menos lacunas, principalmente quando se encontra ao nível da cavidade oral. Nessa região foi observada grande quantidade de zooxantelas. A cavidade oral é circundada por uma camada endodérmica com até 180 μm formando sulcos em direção ao centro da faringe, que é curta com 85 μm . Nessa região da faringe a mesoglêia não possui lacunas, é apenas uma massa homogênea.

Tentáculos em ST (Fig. 6B) formam dois ciclos alternados apresentando uma ectoderme espessa repleta de zooxantelas. Mesoglêia de até 54 μm apresenta na região

basal do tentáculo algumas lacunas vazias, em alguns pontos a mesogléia invagina para o interior da endoderme que possui pequena espessura. O interior dos tentáculos é oco.

O músculo do esfíncter (SL) é mesogleal formado por uma extensa série de lacunas de tamanhos e formatos variados. Ao nível do disco oral essas lacunas se assemelham a estrias encurtando o espaço entre uma e outra (Fig. 6C).

Faringe formada por robusta camada de tecido com região mais interna bem pigmentada (Fig. 6D). No centro da faringe foi observado sulcus em ambos os lados. Foram visualizados vários holótricos. Na região da sifonoglife são observados cílios voltados para o centro da faringe, ainda nessa região a mesogléia se torna mais espessa e com ausência de lacunas.

Mesentérios seguem o arranjo brachycnemina, contudo por vezes foi observado em alguns pólipos de um lado do diretivo dorsal um arranjo brachycnemina e do outro lado um arranjo macrocnemina (Fig. 6E). Apenas mesogléia e endoderme formam os mesentérios. Foram observadas na mesogléia dos mesentérios, na região da base, lacunas contendo grupos de células em seu interior. Mesentérios micronemines são muito curtos (Fig. 6F).

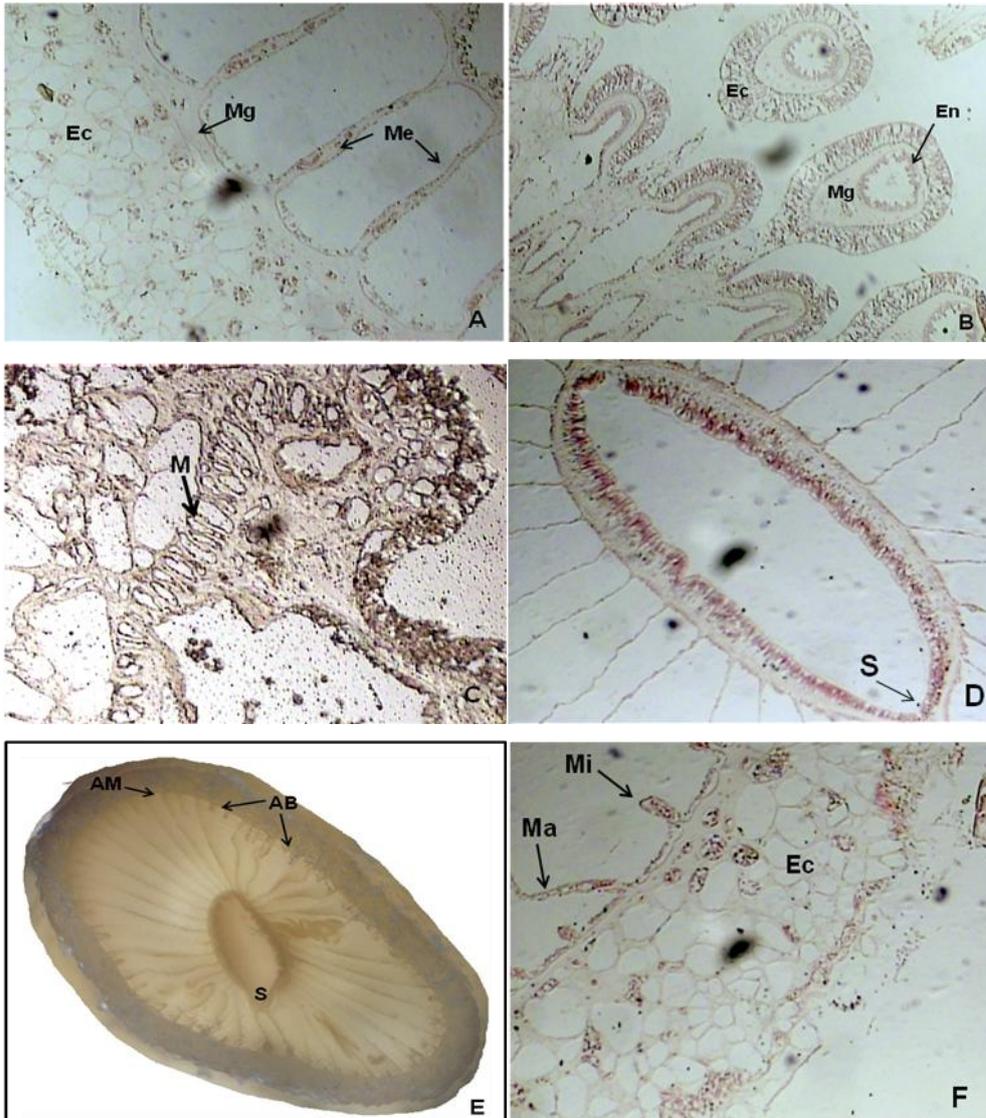


Figura 6. Anatomia interna de *Protopalychoa variabilis*. (A) coluna dos pólipos; (B) corte transversal do tentáculo; (C) músculo do esfíncter; (D) faringe; (E) Arranjo mesentorial, mostrando os dois tipos de arranjo encontrado nos morfotipos 1 e 3; (F) corte transversal da coluna, com detalhe dos mesentérios. **Ec** – ectoderme; **Mg** – mesogléia; **Me** – mesentérios; **En** – endoderme; **M** – músculo esfíncter; **S** – sifonoglife; **AM** – arranjo macrocnemine; **AB** – arranjo brachycnemine; **Mi** – mesentério micronemine; **Ma** – mesentério macronemine.

Cnidoma

Tamanhos e frequências dos cnidocistos se encontram na tabela 3. Os tentáculos possuem grande quantidade de espirocisto e basítrico, e com frequência foram encontrados p-mastigóforos. A faringe possui alta abundância de basítrico e grandes holótricos. Nos filamentos foram observados grandes holótricos, basítricos e p-mastigóforos (Fig. 7).

Tabela 3. Comprimento e largura das cápsulas de cnidocistos e filamentos encontrados nos morfotipos de *Protopalythoa variabilis*. Frequência de cnidocistos nos pólipos. **N** número desejado de cápsulas de cnidocistos e **n** quantidade encontrada nos pólipos. As letras entre parênteses indicam os tipos de nematocistos nas figuras.

Tecido	Tipo	N	n	comprimento μm	largura μm	filamento μm	frequência
Morfotipo I							
<i>Tentáculo</i>	Espirocisto (A)	80	80	20,8 - 28,6	2,6 - 5,2		comum
	Basítrico (B)	80	80	20,8 - 31,2	5,2	15,6 - 23,4	frequente
	p-mastigoforo (C)	80	40	18,2 - 36,4	2,6 - 7,8	18,2 - 33,2	raros
<i>Actinofaringe</i>	Basítrico (D)	80	80	23,4 - 39	5,2		comum
	Holótrico grande (E)	80	80	49,4 - 59,8	18,2 - 28,6	23,4 - 31,2	frequente
<i>Filamentos</i>	Basítrico (F)	80	80	31,7 - 57,2	5,2	33,8 - 46,8	comum
	p-mastigoforo (G)	80	80	26 - 46,8	5,2 - 7,8	13 - 23,4	comum
	Holotrico Grande (H)	80	80	49,4 - 75,4	20,8 - 36,4		frequente
Morfotipo II							
<i>Tentáculo</i>	Basítrico (I)	80	66	20,8 - 26	2,6 - 5,2	18,2 - 26	comum
	Espirocisto (J)	80	78	18,2 - 26	2,6 - 5,2		comum
<i>Actinofaringe</i>	Holótrico (K)	80	80	46,8 - 57,2	20,8 - 28,6		frequente
	Basítrico (L)	80	80	28,6 - 39	5,2		comum
<i>Filamento</i>	Basítrico (M)	80	80	31,2 - 52	5,2	28,6 - 41,6	comum
	p-mastigoforo (N)	80	80	23,4 - 46,8	5,2 - 7,8	13 - 26,4	comum
	Holótrico Grande (O)	80	60	44,2 - 57,2	20,8 - 31,2		frequente
	Holótrico Pequeno (P)	80	60	13 - 15,6	2,6 - 5,2		frequente
Morfotipo III							
<i>Tentáculo</i>	Espirocisto (Q)	80	60	20,8 - 26	2,6 - 5,2		comum
	Basítrico (R)	80	58	18,2 - 39	5,2 - 10,4	15 - 23,4	frequente
<i>Actinofaringe</i>	Holótrico (S)	80	60	39 - 62,4	20,8 - 31,2		frequente
	Basítrico (T)	80	60	23,4 - 33,8	5,2	20,8 - 28,6	comum
<i>Filamento</i>	Basítrico (U)	80	60	33,8 - 46,8	5,2	26 - 41,6	comum
	p-mastigoforo (V)	80	60	20,8 - 41,6	5,2 - 10,4	10,4 - 23,4	frequente
	Holótrico Grande (X)	80	60	39 - 65	18,2 - 26		frequente

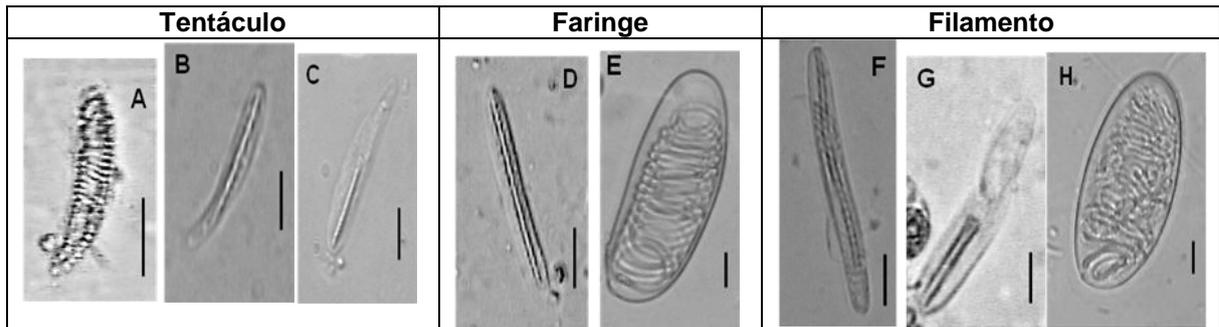


Figura 7. Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 1 de *Protopalythoa variabilis*. (A) espirocisto, (B, D, F) basitrico, (C, G) p-mastigóforo, (E) holótrico, e (H) grande holótrico. Escala = 10µm.

Todas as amostras do morfotipo 1 de *P. variabilis* foram encontradas na região intertidal dos recifes de arenito de Pernambuco, geralmente em poças de maré chegando a profundidades máximas de 1 m. As colônias foram sempre encontradas próximas a esponjas do mar e em alguns casos entre colônias de outros zoantídeos como *Palythoa caribaeorum* e *Zoanthus* sp. Com exceção da praia de Tamandaré em todos os outros pontos de coletas encontramos amostras desse morfotipo.

Morfotipo 2 (GPA 257; 262; 264; 267; 268; 270; 272; 276)

Descrição externa

As colônias possuem cenênquima basal, às vezes formando estolões que unem os pólipos, ambos os tipos de cenênquima possuem muitos grãos de sedimentos incorporados no tecido. Os pólipos apresentam aspecto de taça, com a base mais estreita que o disco oral. Alguns pólipos possuem uma linha bem evidente no disco oral que se prolonga até a ponta do tentáculo, esse tentáculo é mais largo e mais claro que os demais. As colônias possuem cenênquima basal, às vezes estolões que unem os pólipos, ambos os tipos com muitos grãos de sedimentos incorporados no tecido. Os pólipos apresentam aspecto de taça, com a base mais estreita que o disco oral. A altura média dos pólipos varia de 6 a 31 mm e o diâmetro do disco oral de 2 a 14 mm. Possui de 62 a 70 tentáculos distribuídos em dois ciclos alternados. O capitulum possui de 30 a 35 cristas.

O disco oral e os tentáculos apresentam tonalidade marrom escura, no disco oral são notadas linhas mais claras alternadas. Peristoma, com boca alongada em forma de fenda apresenta cor branca. Capitulum e coluna cor marrom clara, devido à alta quantidade de sedimentos incorporados aos tecidos (Fig. 8).

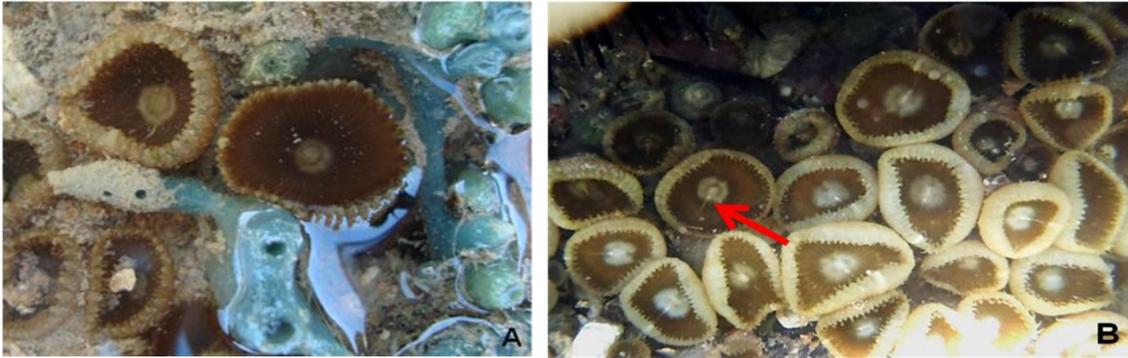


Figura 8. Colônias de *Protopalycha variabilis*, morfotipo 2. (A) Pólipos abertos, mostrando detalhes do disco oral, entre esponjas na praia de Casa Caiada, Olinda. (B) Seta indica marcação de linha no disco oral.

Anatomia interna

Em toda a coluna, a ectoderme se apresenta espessa, porém com bastante lacunas provenientes de grãos de sedimentos, deixando a camada com aspecto degradado. Também foram observadas grandes quantidades de zooxantelas e grânulos de pigmentos. Mesoglêia com até 106 μm , mais fina que a ectoderme, possui inúmeras lacunas vazias e com grupos de células. A endoderme é fina e uniforme ao longo de toda a coluna.

Em ST foi possível observar o disco oral que apresenta ectoderme espessa. Mesoglêia uniforme na espessura, contendo lacunas vazias originadas do acúmulo de sedimentos e lacunas contendo grupos de células e várias zooxantelas. Endoderme é fina e uniforme. As mesmas características observadas no morfotipo 1 foram visualizadas no morfotipo 2.

Dois ciclos alternados de tentáculos foram observados (ST). Ectoderme de espessura duas vezes maior que a endoderme é encontrada nos tentáculos, de consistência uniforme com grande quantidade de zooxantelas. A mesoglêia fina, com até 27 μm é observada criando projeções que se misturam com a endoderme. Semelhante ao morfotipo 1, o centro do tentáculos também é vazio.

O músculo do esfíncter (SL) é mesogleal formado por uma extensa série de lacunas de tamanhos e formatos variados. Ao nível do disco oral essas lacunas se assemelham a estrias encurtando o espaço entre uma e outra.

A faringe é formada por uma forte camada muscular, não homogênea com bastante lacunas. Na região da sifonogliffe são observados cílios, nesse nível a camada muscular se torna mais delgada (Fig. 6D).

Um arranjo brachycnemina foi observado. Nesse tipo não foi visualizado arranjo macrocnemina. Os mesentérios macronemines partem da endoderme da coluna até a faringe formando linhas finas com maior espessura na base, onde foi possível encontrar

lacunas com células musculares bem pigmentadas. Próximo ao diretivo ventral os mesentérios micronemines são muito pequenos formados apenas pela expansão da base (Fig. 6F). No entanto, em direção ao diretivo dorsal esses mesentérios aumentam seus comprimentos podendo chegar até metade do tamanho dos macronemines.

Cnidoma

Tamanhos e frequências dos cnidocistos se encontram na tabela 3. Os tentáculos possuem abundância de espirocistos e basítricos. A faringe possui abundância de basítricos e grandes holótricos. Nos filamentos foram observados grandes holótricos, basítricos e p-mastigóforos, com frequência foi encontrado nos filamentos um tipo diferente de holótrico bem menor se comparado com os grandes holótricos visualizados em outras regiões. Esse tipo de holótrico apenas foi encontrado nos filamentos desse morfotipo (Fig. 9).

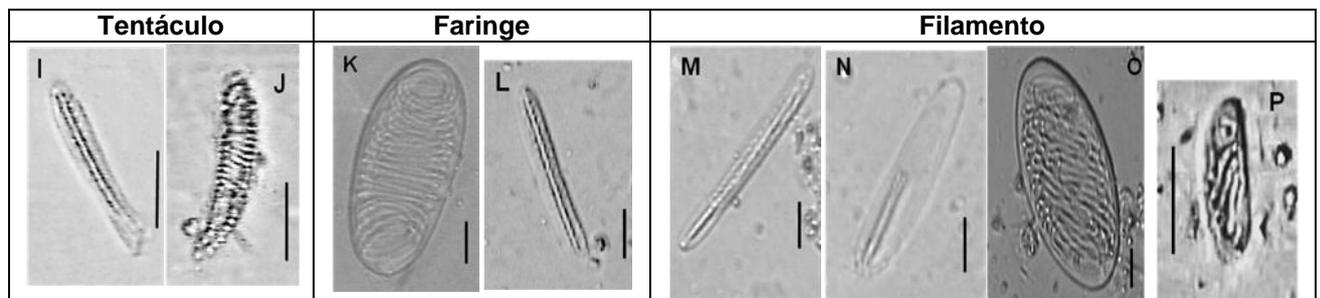


Figura 9. Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 2 de *Protopalythoa variabilis*. (I, L, M) basítrico; (J) espirocisto; (K) holótrico; (N) p-mastigóforo; (O) holótrico grande; (P) holótrico pequeno. Escala = 10µm.

Todos as amostras do morfotipo 2 de *P. variabilis* foram encontradas na região intertidal dos recifes de arenito de Pernambuco, geralmente em poças de maré com profundidades máximas de 2 m. As colônias desse morfotipo foram sempre encontradas entre colônias de esponjas do mar ou colônias de outros zoantídeos como *Palythoa caribaeorum* e *Zoanthus* sp. As colônias desse morfotipo foram encontradas em todos os pontos de coletas. Esse morfotipo também foi o mais encontrado em regiões de maior impacto com as ondas.

Morfotipo 3 (GPA 258; 261; 266; 271; 274; 277)

Descrição externa

As colônias possuem cenênquima basal, às vezes formando estolões que unem os pólipos, ambos os tipos de cenênquima possuem muitos grãos de sedimentos incorporados no tecido. Os pólipos apresentam aspecto de taça, com a base mais estreita que o disco oral. Todos os pólipos possuem uma linha bem evidente no disco oral que se prolonga até a

ponta do tentáculo, esse tentáculo é mais largo e mais claro que os demais (Fig. 10A). As colônias possuem cenênquima basal, às vezes estolões que unem os pólipos, ambas os tipos tem muitos grãos de sedimentos incorporados no tecido. Os pólipos apresentam aspecto de taça, com a base mais estreita que o disco oral. A altura média dos pólipos varia de 5 a 33 mm e o diâmetro do disco oral de 3 a 15 mm. Possui de 60 a 70 tentáculos distribuídos em dois ciclos alternados. O capitulum possui de 30 a 35 cristas.

O disco oral é marrom escuro com linhas alternadas com tom verde escuro. Os tentáculos apresentam tonalidade marrom escuro. Peristoma, com boca bastante alongada em forma de fenda apresenta tonalidade verde ou amarelo (Fig. 7B). Capitulum e coluna cor marrom clara, devido à alta quantidade de sedimentos incorporados aos tecidos (Fig. 7).



Figura 10. Colônias de *Protopalythoa variabilis*, morfotipo 3. (A) Pólipos, mostrando detalhes (seta) da linha no disco oral e tentáculos; praia do Paiva. (B) Detalhes do disco oral e peristoma (seta), praia de Piedade.

Anatomia interna

A coluna (SL) possui ectoderme espessa bastante degradada devido grande quantidade de lacunas provenientes de grãos de sedimentos incorporados pelo pólipo, também foram encontradas zooxantelas e grânulos de pigmento. A mesogléia possui espessura semelhante aos dois morfótipos já citados, com bastante lacunas vazias e lacunas contendo grupos de células. Em direção a base e a extremidade oral do pólipo essas lacunas com grupos de células se tornam maiores e mais numerosas.

Circundando todo o disco oral a camada de ectoderme e endoderme tem as mesmas características citadas anteriormente para os morfótipo 1 e 2. Apenas a mesogléia apresenta uma pequena diferença em relação ao morfótipo 2. A região da mesogléia localizada entre os espaços tentaculares e contornando a abertura forma lacunas alongadas com aspecto de fibras, semelhante aos encontrados no morfótipo 1, circundando a abertura oral.

Dois ciclos de tentáculos alternados (ST) são observados, com ectoderme bastante espessa e grande quantidade de zooxantelas (Fig. 6B). A mesoglêia forma uma camada homogênea com algumas lacunas vazias localizadas apenas na região basal dos tentáculos, formando projeções que se invaginam na endoderme. Essa endoderme é fina e se projeta para o interior do tentáculo que é vazio.

O músculo do esfíncter (SL) é mesogleal formado por uma extensa série de lacunas de tamanhos e formatos variados. Ao nível do disco oral essas lacunas se assemelham a estrias encurtando o espaço entre uma e outra (Fig. 6E).

A faringe é formada por uma forte camada de endoderme com células bem pigmentadas. No centro da faringe foi observado sulcus em ambos os lados. Sifonogliffe com as mesmas características dos morfotipos já citados.

Um arranjo brachycnemina foi observado. E como no morfotipo 1, alguns pólipos apresentaram um arranjo macrocnemina em um dos lados do diretivo dorsal. Os mesentérios macronemines partem da endoderme da coluna até a faringe formando linhas finas com maior espessura na base onde foi possível encontrar lacunas com células musculares bem pigmentadas. Os mesentérios micronemines são muito pequenos formados apenas pela expansão da base (Fig. 6F).

Cnidoma

Tamanhos e frequências dos cnidocistos se encontram na tabela 3. Os tentáculos possuem grande quantidade de espirocisto e basítrico. A faringe possui alta abundância de basítrico e grandes holótricos. Nos filamentos foram observados grandes holótricos, basítricos e p-mastigóforos (Fig. 11).

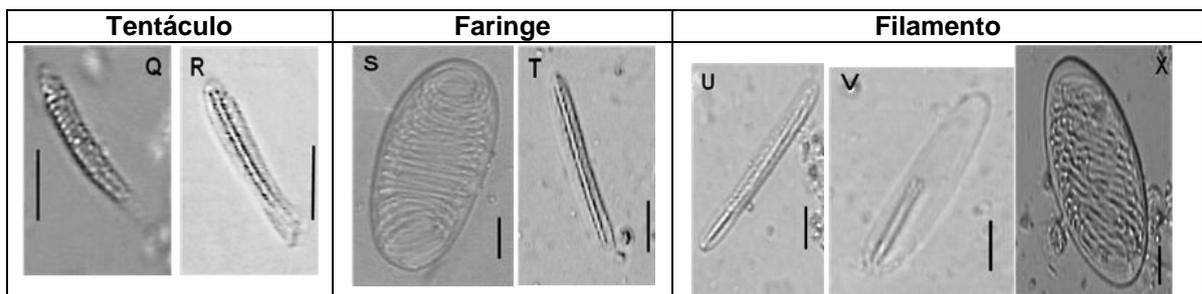


Figura 11. Tipos de cnidocistos encontrados no morfotipo 3 de *Protopalythoa variabilis*. (Q) espirocisto; (R, T, U) basítrico; (S, X) holótrico grande; (V) p-mastigóforo. Escala = 10µm.

Todos os morfotipos foram coletados na região intertidal sobre recifes de arenito, geralmente em poças de maré com pouca profundidade, chegando no máximo a 1 m. As colônias do morfótipo 3 foram encontradas entre esponjas e outros zoantídeos como

Palythoa caribaeorum e espécies do gênero *Zoanthus*, ambas as espécies são características da região nordeste. As colônias do morfotipo 3 foram encontradas em quase todos os pontos de coleta, exceto a praia de Pontas de Pedra.

Considerações morfológicas

Os três morfotipos encontrados em Pernambuco revelam características semelhantes que permite incluí-los na espécie *Protopalythoa variabilis*. Podemos destacar as características encontradas na coluna, o padrão de organização das camadas de tecido no disco oral, e o formato e tipo de músculo do esfíncter. Contudo, pequenas diferenças são observadas entre os morfotipos, como exemplo, o padrão de cor, o arranjo mesenterial (Tab. 4) e o cnidoma (Tab. 3), que foram consideradas variações intraespecíficas. Apesar dessas diferenças as características entre os morfotipos são bastante semelhantes, apresentando inclusive, dimensões de pólipos e quantidades de tentáculos similares (Tab. 4). Todos os caracteres se encaixam com a descrição de *Protopalythoa variabilis*, feita por Duerden (1898), inclusive apresentando as mesmas características de presença de lacunas na mesoglêia da coluna e do tentáculo, características da faringe, do músculo do esfíncter e dos mesentérios. Apesar de Swain (2010) declarar que a posição do músculo do esfíncter não seja um bom caráter para trabalhos taxonômicos, as formas idênticas encontradas nos três morfotipos são levadas em consideração devida sua forte semelhança, e por pertencerem ao mesmo gênero. O cnidoma apresentou algumas diferenças entre os morfotipos (Tab. 3), porém apenas o cnidoma não pode ser utilizado para separação ao nível de espécie (RYLAND e LANCASTER, 2004). O arranjo mesenterial é uma importante característica taxonômica, porém a diferença observada entre os morfotipos não representa um padrão encontrado em todos os pólipos, apenas ocorreu em três amostras distintas, duas do morfotipo 1 (GPA 260 e 263) e uma do morfotipo 3 (GPA 266). A variação dos arranjos brachycnemina e macrocnemina de um lado e outro do diretivo dorsal encontrados em alguns pólipos dos morfotipo 1 e 3, foi citado por Duerden (1898) na descrição original de *P. variabilis*. Esse detalhe foi observado mais tarde por Verril (1900) e Pax (1910) ao analisarem exemplares semelhantes a *P. variabilis* das Bahamas e Caribe (Ilha Tortuga), respectivamente, locais próximos a localidade tipo, Jamaica. Para nós fica claro a evidência de variação intraespecífica dentro da espécie *P. variabilis*.

No Brasil, além de *P. variabilis*, foi citada a ocorrência de *Protopalythoa grandiflora* (Verril, 1900) (OIGMAN-PSZCZOL *et al.* 2004). De acordo com Ryland e Lancaster (2003) *P. grandiflora* possui morfologia similar a *Protopalythoa mutuki* (Haddon e Shackleton, 1891) e semelhante a *P. variabilis*. No entanto, a descrição de *P. grandiflora* é muito pobre em

detalhes, não possui descrição de anatomia interna, nem cnidoma, deixando várias lacunas na identificação de seus caracteres, dessa forma não foi possível fazer uma comparação. Contudo, as poucas características presentes na descrição de *P. grandiflora*, revelam diferenças em comparação a *P. variabilis*. Outra espécie descrita no gênero *Protopalythoa* que apresenta semelhanças com *P. variabilis* é *Protopalythoa grandis* Verril, 1900, que recebeu esse nome devido ao grande tamanho de seus pólipos com altura = 30 – 36 mm e diâmetro do disco oral = 10 – 16 mm. Segundo Ryland e Lancaster (2003) essa espécie é uma variação de *P. variabilis*. Contudo, Verril (1900) descreve essa espécie podendo chegar a > 12 m de profundidade, região em que *P. variabilis* é difícil de ocorrer, pois essa é uma espécie comum de águas do mediolitoral. A ideia proposta por Ryland e Lancaster foi contestada por Reimer e colaboradores (2012a) que considera *P. grandis* distinta de *P. variabilis*, inclusive em dados moleculares. Estudos futuros de revisão dessas duas espécies de *Protopalythoa* (*P. grandis* e *P. grandiflora*) no Oceano Atlântico são necessários para esclarecer o status taxonômico, e facilitar a discussão com as demais espécies descritas para o gênero. Até então consideraremos ambas as espécies como *inquirenda*, que o Código de Nomenclatura Zoológica define como uma espécie de identificação duvidosa com os elementos disponíveis na atualidade.

A espécie *P. variabilis* possui características bem semelhantes à *Protopalythoa heliodiscus* Ryland e Lancaster, 2003, no entanto, se diferenciam principalmente na sua distribuição em diferentes oceanos, Atlântico e Pacífico, e nas diferenças encontradas no cnidoma (*P. variabilis* possui basítricos nos filamentos enquanto *P. heliodiscus* tem ausência total desse nematocisto nos filamentos; *P. variabilis* tem ausência de holótricos nos tentáculos, enquanto *P. heliodiscus* tem presença apenas desse nematocisto). Além disso, podemos observar diferenças nos mesentérios, lacunas na mesogléia da coluna e dimensões dos pólipos. *P. variabilis* possui altura = 7 – 50 mm e diâmetro do disco oral = 2 – 30 mm, enquanto que *P. heliodiscus* possui pólipos menores com altura = 10 – 17 mm e diâmetro do disco oral = 3 – 7 mm. Baseado em nossas observações essas espécies apresentam diferenças que suportam bem a sua separação.

Embora não tenha sido possível a comparação com o holótipo de *P. variabilis*, baseado em nossas descrições e análises confirmamos que os três morfotipos encontrados nas praias de Pernambuco é de fato uma variação da espécie *P. variabilis*, tomando como base a descrição original dessa espécie.

Tabela 4. Comparação dos morfotipos de *Protopalythoa variabilis* de Pernambuco.

Características	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3
Cor	Disco oral: marrom Boca: marrom claro Tentáculo: verde	Disco: marrom com linhas claras Boca: branca Tentáculo: Marrom igual à coluna.	Disco marrom com linhas verde Boca: verde e amarelo Tentáculo: marrom escuro
Disco Oral	Pode apresentar manchas brancas.	Alguns pólipos possuem uma linha bem evidente da boca até a ponta do tentáculo.	Maioria dos tentáculos possui linha bem evidente da boca até a ponta do tentáculo.
Altura / Diâmetro pólipos	Altura: 7 a 31 mm Diâmetro: 2 a 14 mm.	Altura: 6 a 31 mm Diâmetro: 2 a 14 mm	Altura: 5 a 33 mm Diâmetro: 2 a 15 mm
Quantidade de tentáculo / cristas capitulares	Tentáculos: 60 a 70 Cristas capitulares: 32	Tentáculo: 62 a 70 Cristas capitulares: 32 a 36	Tentáculo: 60 a 68 Cristas: 36
Características da coluna	Coluna espessa e irregular com lacunas de sedimentos; Mesoglea espessa com lacunas de grupos de células, que aumentam em direção à base; Endoderme fina e contínua.	Coluna espessa e irregular com lacunas de sedimentos; Mesoglea espessa com lacunas de grupos de células, que aumentam em direção à base; Endoderme fina e contínua.	Coluna espessa e irregular com lacunas de sedimentos; Mesoglea espessa com lacunas de grupos de células, que aumentam em direção à base; Endoderme fina e contínua.
Características do tentáculo	Ectoderme espessa com zooxantelas; Mesoglea com lacunas; Endoderme fina.	Ectoderme espessa com zooxantelas; Mesoglea com lacunas; Endoderme fina.	Ectoderme espessa com zooxantelas; Mesoglea com lacunas; Endoderme fina.
Músculo esfíncter	Mesogleal, formado por lacunas que variam o tamanho e quantidade.	Mesogleal, formado por lacunas que variam o tamanho e quantidade.	Mesogleal, formado por lacunas que variam o tamanho e quantidade.
Arranjo mesentérico	Pode apresentar de um lado arranjo brachycnemina e do outro arranjo macrocnemina. Presença de vacúolo na base dos mesentérios contendo células.	Arranjo brachycnemina. Foram observados vacúolos nas bases dos mesentérios	Pode apresentar de um lado arranjo brachycnemina e do outro arranjo macrocnemina. Presença de vacúolo na base dos mesentérios contendo células.
Cnidoma Tentáculo	Espirocisto, basítrico e p-mastigóforo	Espirocisto e basítrico	Espirocisto e basítrico
Cnidoma Faringe	Basítrico e holótrico	Basítrico e holótrico	Basítrico e holótrico
Cnidoma Filamento	Basítrico, holótrico grande e p-mastigóforo	Basítricos, holótricos grandes, holótricos pequenos e p-mastigóforo	Basítrico, holótrico grande e p-mastigóforo

***Protopalythoa minima* n. sp.**

Material: Holótipo, 1 colônia, 10 pólipos, 00°55.1' N, 29°20.7' W, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, 2009, MOUPE (numeração provisória); Parátipo, 1 colônia, 5 pólipos, 00°55.1' N, 29°20.7' W, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, 2010, GPA 278.

Diagnose

Cenênquima basal; pólipos pequenos (5-12 mm altura x 3-6,5 mm diâmetro) com aproximadamente 65 tentáculos curtos. Mesogléia dos tentáculos com ausência de lacunas e mesogléia da coluna com lacunas formando canais circundando todo o disco oral e parede do pólipo. Micronemes curtos apresentando canais basais. Tentáculos com espirocistos, faringe com basítrico e filamentos com basítrico, p-mastigóforo, holótricos pequenos e raros holótricos grandes.

Descrição do holótipo (MOUPE)

Descrição externa

A colônia possui um cenênquima basal que mantém os pólipos próximos uns aos outros dificultando a completa expansão do disco oral. Cada pólipo possui um tentáculo diferenciado mais largo que os demais tentáculos e de mesma cor. No disco oral existe uma linha muito evidente que parte da boca até a ponta desse tentáculo diferenciado (Fig. 12B). Em expansão os pólipos possuem disco oral mais largo que a base. A altura dos pólipos varia de 5 a 12 mm e o diâmetro do disco oral varia de 3 a 6,5 mm. Possui aproximadamente 65 tentáculos distribuídos em dois ciclos e cerca de 30 cristas capitulares. Quando contraídos, os tentáculos e o disco oral correspondem a cerca da metade do comprimento do pólipo.

O disco oral apresenta cor preta com discretas linhas azuis. A boca formando peristoma também se apresenta preta. A região interna dos tentáculos é preta, o capitulum e a coluna são azuis, que apesar de incorporar partículas de sedimentos não possuem a cor característica marrom (Fig. 12).

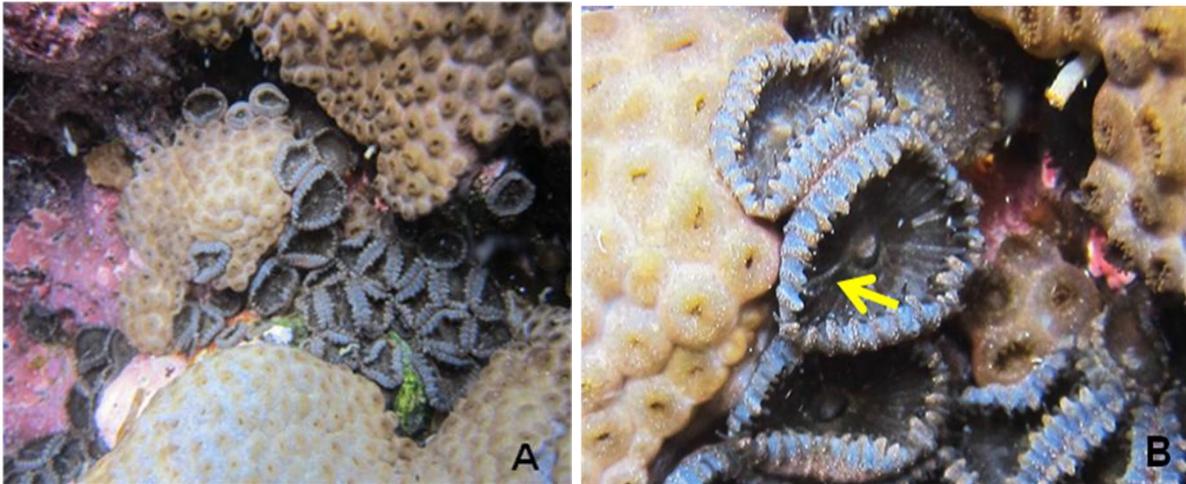


Figura 12. Colônias de *Protopalychia minima* nov. sp. em poças de maré do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (Brasil). (A) colônias entre colônias de *Palychia caribaeorum*. (B) Detalhe da linha do disco oral do pólipo (seta).

Anatomia Interna

Em secções transversais (ST) e longitudinais (SL) foi observado que os pólipos possuem uma coluna espessa que vai alargando em direção a base. A ectoderme forma uma fina cutícula irregular repleta de lacunas provenientes de grãos de sedimentos, em sua maioria areia, e zooxantelas. A mesoglêia é espessa tornando-se maior em direção ao nível da base do pólipo. Contem grupos de células dentro de lacunas e poucas zooxantelas, essas lacunas são encontradas em abundância na mesoglêia distribuídas de forma agrupadas formando um esquema de canais que circunda todo a mesoglêia da coluna do pólipo. Esse sistema de canais fica bem evidente em cortes transversais, mas também são visíveis em cortes longitudinais. Essas lacunas aparecem como uma característica muito marcante de *Protopalychia minima* nov. sp. A endoderme é fina e contínua.

Em (ST) o disco oral apresentou mesoglêia bastante espessa chegando a 1,3 mm e inúmeras lacunas contendo células alinhadas uma ao lado da outra formando um anel em torno do disco oral (Fig. 13A). A camada da mesoglêia penetra para o centro do disco oral entre os tentáculos até o limite da abertura oral, onde forma lacunas com aspecto de fibras, circundando toda a abertura oral. E endoderme é fina e uniforme.

Ainda em (ST) se observou a anatomia dos tentáculos que formam dois ciclos alternados circundando todo o disco oral. A ectoderme forma uma camada espessa com até 426 μm com inúmeras zooxantelas. A mesoglêia é mais fina que a ectoderme e não possui lacunas, nem grupos de células, caracterizando uma massa homogênea em todo o tentáculo (Fig. 13B). A endoderme possui espessura semelhante à mesoglêia e ocupa quase todo o centro dos tentáculos.

O músculo do esfíncter (SL) é único e forma uma extensa série de cavidades lacunas arredondadas na mesogléia, muito próximas umas das outras, indicando um aspecto robusto ao músculo (Fig. 13C). Ao nível do centro do disco oral essas lacunas se tornam maiores.

O arranjo brachycnemina foi observado. Os mesentérios são formados por espessas camadas de músculo endodérmico e mesogléia no centro. Os micronemines são curtos e possuem em sua base aberturas com aspectos de vacúolos (Fig. 13D).

Devido ao diminuto tamanho dos pólipos não foi possível cortes precisos nem detalhes da faringe. Mais foi possível observar que apresenta padrão similar a outras espécies do gênero *Protopalythoa*.

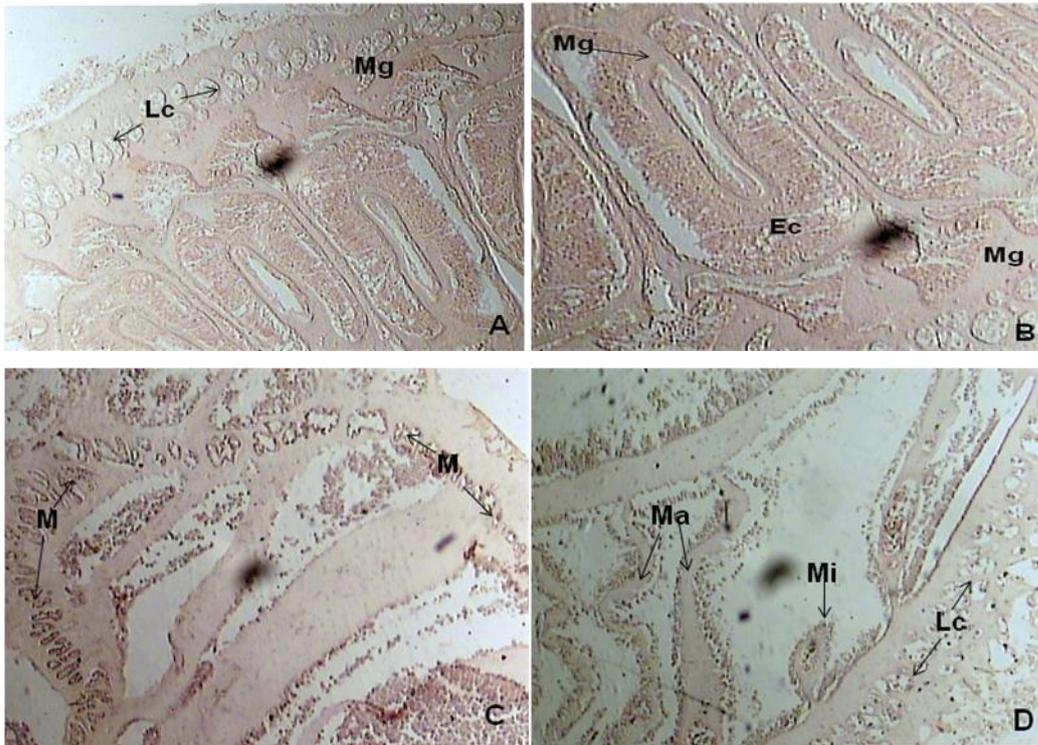


Figura 13. Anatomia interna de *Protopalythoa minima* nov. sp. (A) corte transversal da coluna mostrando sistema de canais da mesogléia com lacunas contendo grupos de células; (B) anatomia do tentáculo; (C) músculo do esfíncter; (D) mesentérios micronemine e macronemine. **Mg.**- mesogléia; **Lc**- lacunas na mesogléia; **Ec**- ectoderme; **M**- músculo esfíncter; **Ma**- mesentérios macronemine; **Mi**- mesentério micronemine.

Cnidoma

Para medidas visualizar tabela 5. Os tentáculos apresentaram elevada abundância de espirocisto e a região da faringe elevada abundância de basítricos com ausência de grandes holótricos. Os filamentos apresentaram elevada abundância de p-mastigóforo e

basítricos, com poucos, porém frequentes holótricos pequenos e raros holótricos grandes (Fig. 14).

Tabela 5. Comprimento e largura das cápsulas e filamentos dos cnidocistos encontrados em *Protopalythoa mínima* nov. sp. Frequência de cnidocistos nos pólipos. **N** número desejado de cápsulas de cnidocistos e **n** quantidade encontrada nos pólipos. Os números entre parênteses indicam os tipos de cnidocistos na figura 14.

Tecido	Tipo	N	n	comprimento			frequência
				μm	largura μm	filamento μm	
Tentáculo	Espirocisto (1)	20	20	15,6 - 20,8	2,6 - 5,2		comum
Actinofaringe	Basítrico (2)	20	20	20,8 - 33,8	5,2	15,6 - 31,2	comum
Filamento	Holótrico grande (3)	20	5	41,6	18,2		raros
	Holótrico pequeno (4)	20	20	10,4 - 13	2,6		comum
	Basítrico (5)	20	20	23,4 - 28,6	5,2	20,8 - 26	frequentes
	p-mastigofora(6)	20	20	15,6	5,2	7,8 - 10,4	comum

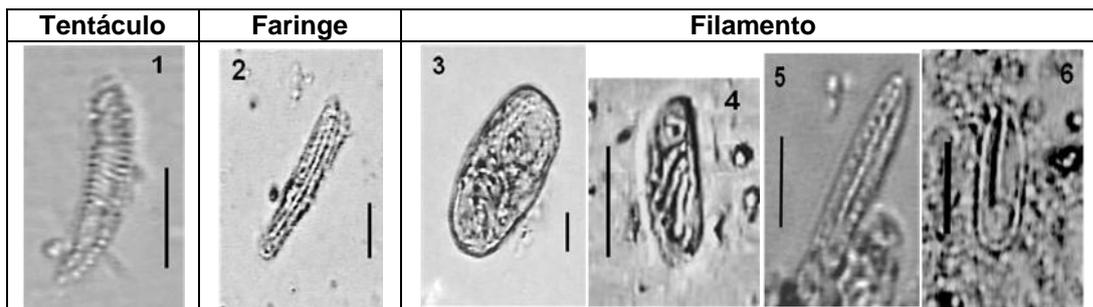


Figura 14. Tipos de cnidocistos encontrados em *Protopalythoa mínima* nov. sp. (1) espirocisto; (2, 5) basítrico; (3) holótrico grande; (4) holótrico pequeno; (6) p-mastigóforo.

As colônias de *Protopalythoa mínima* nov. sp. foram encontrados na região de mediolitoral em poças de maré nos recifes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, com a profundidade máxima de dois metros. Encontra-se sobre substratos duros, em meio a outros zoantídeos como *Palythoa caribaeorum* e espécies do gênero *Zoanthus*, comuns dessa região. Além desses organismos também foi possível observar esponjas, algas e corais escleractíneos.

Etimologia

O epíteto específico *minima* vem do latim *minimum* que significa “o menor de todos” e refere-se ao pequeno tamanho dos pólipos, que são os menores já registrados para espécies do gênero *Protopalythoa*.

Considerações

Caracteres merísticos como altura e diâmetro são considerados potenciais fontes de dados para taxonomia de várias espécies de zoantídeos (RYLAND e LANCASTER, 2003). *Protopalythoa minima* nov. sp. apresenta as menores medidas de altura e diâmetro entre as espécies já descritas no gênero *Protopalythoa*. A espécie *Protopalythoa heidere* (Carlgren, 1954) possui as dimensões mais próximas das encontradas em *P. minima* nov. sp. porém ainda são maiores, além disso, *P. heidere* possui uma mesoglêia na coluna de espessura menor que a encontrada em *P. minima* nov. sp e a mesoglêia do tentáculo possui inúmeras lacunas (HERBERTS, 1972), o que em *P. minima* nov. sp não acontece. Outra diferença também encontrada entre estas duas espécies é a distribuição, enquanto *P. minima* nov. sp é descrita no Arquipélago de São Pedro e São Paulo no oceano Atlântico, *P. heidere*, foi descrita para a região de Tulear, Madagascar no oceano Índico. Apesar de zoantídeos possuírem uma taxa de dispersão larval alta (~ 170 dias) (POLAK *et al.* 2011) a distância entre as duas localidades é muito grande dificultando a sobrevivência das larvas dos zoantídeos. As espécies *P. mutuki* e *P. heliodiscus* são espécies simpátricas da região da Austrália e foram diferenciadas principalmente pelos caracteres merísticos e a ocorrência e dimensões dos nematocistos (RYLAND e LANCASTER, 2003).

As espécies de *Protopalythoa* mais próximas, em termos geográficos, a *P. minima* nov. sp, são *P. grandiflora*, *P. grandis* e *P. variabilis* que apesar da proximidade geográfica se diferem em vários aspectos (Tab. 6). Apesar de *P. grandiflora* também ter sido citada para o Brasil (OIGMAN-PSZCZOL *et al.* 2004), possui quantidade de tentáculos inferior (52 – 56) a *Protopalythoa minima* nov. sp e maiores dimensões dos pólipos. Além disso, *P. grandiflora* possui poucos caracteres descritos e ausência de estudos histológicos (VERRIL, 1900), dificultando sua comparação com outras espécies.

A espécie *P. grandis* com distribuição na região do Caribe, apesar de possuir quantidade de tentáculos semelhantes à *P. minima* nov. sp, apresenta grandes pólipos (altura = 30 – 36 mm e diâmetro = 12 – 16 mm), essa característica lhe rendeu o nome *grandis*. Igual a *P. grandiflora*, *P. grandis* também não possui uma descrição detalhada, faltando varias características como anatomia interna e cnidoma. Estudos futuros de revisão dessas duas espécies de *Protopalythoa* no oceano Atlântico são necessários para esclarecer o status taxonômico, e facilitar a discussão com as demais espécies descritas para o gênero. Como foi falado anteriormente consideraremos, neste trabalho ambas as espécies como *inquirenda*.

A espécie *P. minima* nov. sp., possui claras diferenças em relação à *P. variabilis*. Podemos indicar os caracteres merísticos (altura, diâmetro e quantidade de tentáculos), as

características da mesoglêia da coluna e tentáculos, que em *P. variabilis* são abundantes, mas não forma canais como em *P. minima* nov. sp na coluna, e o cnidoma que para as duas espécies é bastante diferente. *P. minima* nov. sp não possui basítrico nos tentáculos e os grandes holótricos encontrados em *P. variabilis* com elevada abundância, em *P. minima* nov. sp são raros e vistos apenas nos filamentos. Além das diferenças morfológicas podemos destacar a localização de *P. minima* nov. sp. que é descrita para o Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Este Arquipélago fica na região oceânica a 1000 km da costa do estado de Rio Grande do Norte. O isolamento da ilha pode levar a adaptação de características e ter provocado mecanismos de especiação em zoantídeos (REIMER e TAKUMA, 2010).

Baseadas nessas diferenças e em nossas análises, podemos afirmar que *Protopalythoa minima* nov. sp trata-se de uma nova espécie do gênero *Protopalythoa* descrita para o Oceano Atlântico.

Tabela 6. Comparação das espécies do gênero *Protopalythoa* registradas para o Oceano Atlântico.

Caracteres morfológicos	<i>Protpalythoa variabilis</i>	<i>Protopalythoa grandis</i>	<i>Protopalythoa grandiflora</i>	<i>Protopalythoa minima</i>
Distribuição	NE e SE do Brasil; Caribe.	Caribe	SE do Brasil; Caribe	Arquipélago de São Pedro e São Paulo
Cor disco oral/tentáculo	Verde e/ou marrom	Laranja ou marrom	Laranja / marrom	Preto/ azul
Altura pólipo	7 - 50 mm	30 - 36 mm	15 - 20 mm	5 - 12 mm
Diâmetro pólipo	5 - 30 mm	12 - 16 mm	10 - 13 mm	3 - 6 mm
Número de tentáculos	60 a 80	60 a 66	52 a 56	60 a 70
Lacunas na mesoglêia coluna	Distribuição de forma aleatória	Dado não informado	Dado não informado	Distribuição agrupada semelhante a canais.
Lacunas mesoglêia tentáculo	Presente	Dado não informado	Dado não informado	Ausente
Cnidoma				
Tentáculo	Espirocisto; basítrico; p-mastigóforo.	Dado não informado	Dado não informado	Espirocisto
Faringe	Basítrico e holótrico	Dado não informado	Dado não informado	Basítrico
Filamento	Grande holótrico; basítrico, p-mastigóforo e pequeno holótrico	Dado não informado	Dado não informado	Pequeno holótrico, basítrico, p-mastigóforo e grande holótrico (raros)

Análises Filogenéticas

Os resultados filogenéticos dos três marcadores revelaram a formação de um clado contendo as amostras de Pernambuco, que não se agrupa com sequências de *P. variabilis* do Genbank, apesar dos dados morfológicos indicarem que o material de Pernambuco corresponde a esta espécie (Fig. 2, 3, 4). Isso pode ser compreendido pelo fato da sequência do Genbank aparecer identificada como *P. aff. variabilis*, o qual indica que as condições do material impossibilitam a identificação do mesmo, e possivelmente se trate de outra espécie. O depósito de sequências não identificadas em nível de espécie ou de identificação duvidosa (p. ex. espécies identificadas com “sp.”, “aff.” ou “cf.”) prejudica muito o uso das mesmas em estudos com fins taxonômicos. Em Zoanthidea isto é bastante comum e, apesar de parecer que existem muitas sequências disponíveis para determinado gênero, a falta de confiabilidade na identidade do táxon ao qual cada sequência pertence limita o seu uso. Por não conter sequência com descrição confiável no banco de dados do GenBank, as amostras de Pernambuco são as primeiras sequências genéticas depositadas com identificação precisa da espécie *P. variabilis*.

Foram construídas árvores, para os três marcadores, com análise Bayesiana e com valores de Neighbor-Joining. Sequências do gênero *Zoanthus* foram utilizadas como grupo externo e de acordo com as topologias ficaram na base da árvore.

A espécie *Palythoa caribaeorum*, apesar de pertencer a outro gênero apareceu como sequência irmã das espécies de *P. variabilis* de Pernambuco. Pelo fato de ter sido feita apenas uma coleta de *P. caribaeorum* e não ter sido realizada nenhuma análise morfológica dessa amostra, não é possível fazer a comparação do gênero *Palythoa* em relação à *Protopalythoa*, se fazendo necessário novas pesquisas, tanto morfológicas quanto moleculares, a fim de esclarecer a posição taxonômica do gênero *Palythoa*.

COI

O alinhamento das 15 sequências *COI* das amostras de Pernambuco apresentaram resultados claros de distinção em relação às sequências de *Protopalythoa* do GenBank, formando um clado bem suportado (Bootstrap = 1.0) (Fig. 2).

A árvore *COI* também revelou que o morfotipo 4, oriundo do Arquipélago de São Pedro e São Paulo formou um ramo irmão das amostras de Pernambuco com suporte de bootstrap 0.79. Assim como as sequências de *Palythoa caribaeorum* (PE) e as sequências de morfotipo 3 (GPA 274) e morfotipo 1 (GPA 275).

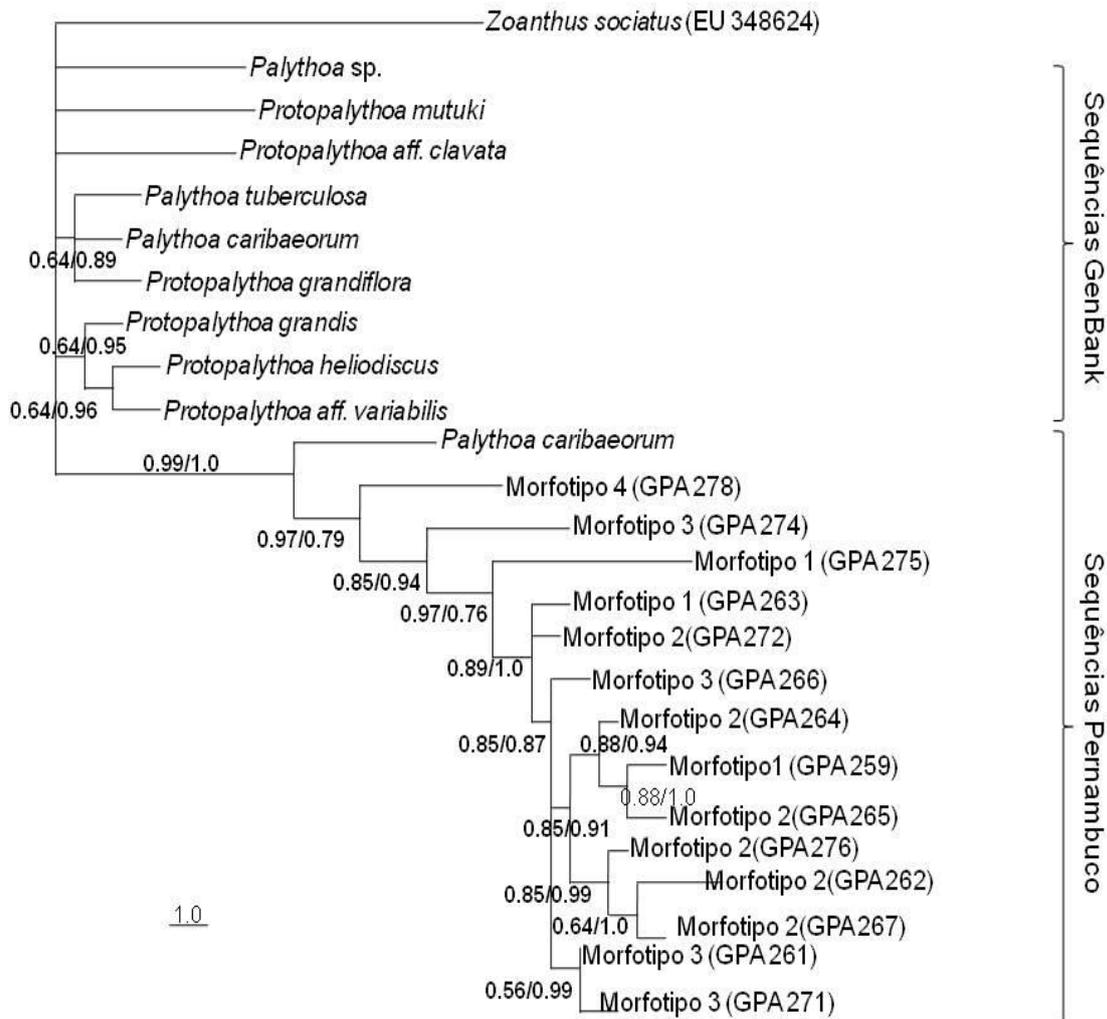


Figura 2. Árvore baseada em sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I, COI. Valores de suporte de bootstrap (Neighborn-Joining/Inferência Bayesiana).

mt 16S rDNA

Foram alinhadas 34 sequências de 16S rDNA, que mostraram a separação do clado das amostras de Pernambuco (Fig. 3) das demais amostras do gênero *Protopalythoa*, armazenadas no GenBank. As sequências do GenBank formam um clado separado do clado de nossas amostras com valores de bootstrap = 0.96.

Talvez, o fato de 16S ser um marcador aparentemente mais conservado para distinguir espécies mais intimamente relacionadas, possa explicar essa diferença em relação ao encontrado em COI, que parece ser mais adequado para comparar com objetividade possíveis relações entre os diferentes clados (SINNIGER *et al.* 2010).

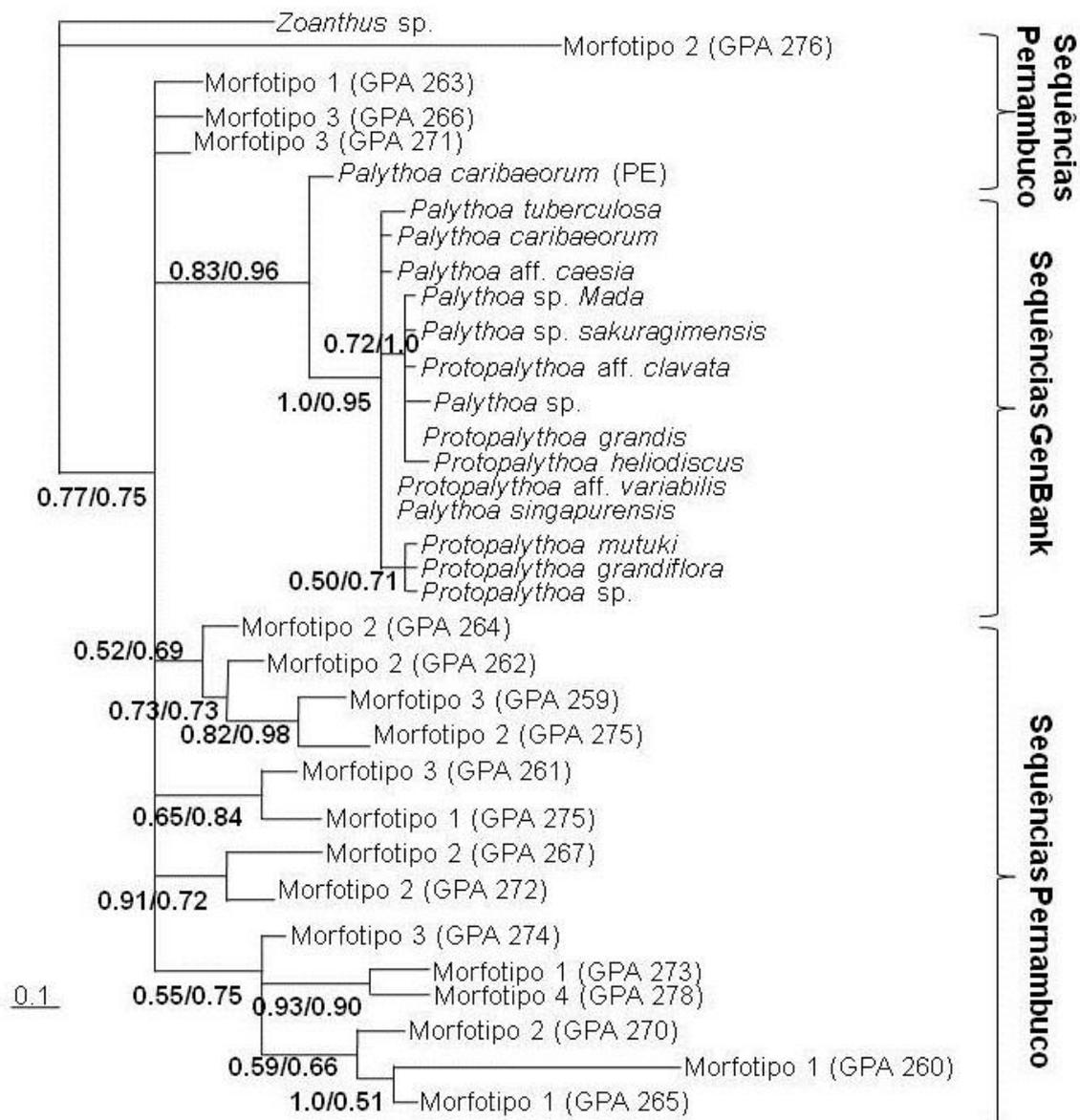


Figura 3. Árvore baseada em seqüências do gene mitocondrial 16S rDNA. Valores de suporte de bootstrap (Neighborn-Joining/Inferência Bayesiana).

Chamamos atenção para o morfotipo 2 (GPA 276) que apareceu como uma seqüência separada das demais. Essa seqüência corresponde a praia de Tamandaré. Embora tenha sido um resultado interessante, no presente trabalho não iremos buscar respostas para isso. Futuras pesquisas serão realizadas no intuito de entender esse resultado.

12S rDNA

Foram utilizadas 24 seqüências para formação da filogenia do marcador 12S (Fig. 4). O marcador 12S mostrou uma distinção mais clara das amostras de Pernambuco (bootstrap

= 1.0) em relação às sequências de *Protopalythoa* obtidas no GenBank. Semelhante ao COI, a topologia 12S apresentou a amostra morfotipo 3 (GPA 274) e a amostra de *Palythoa caribaeorum* (PE) como clado irmã das outras sequências dos morfotipos de Pernambuco.

Semelhante ao encontrado no marcador COI, todas as sequências de espécies de *Protopalythoa* no GenBank possui uma identificação duvidosa.

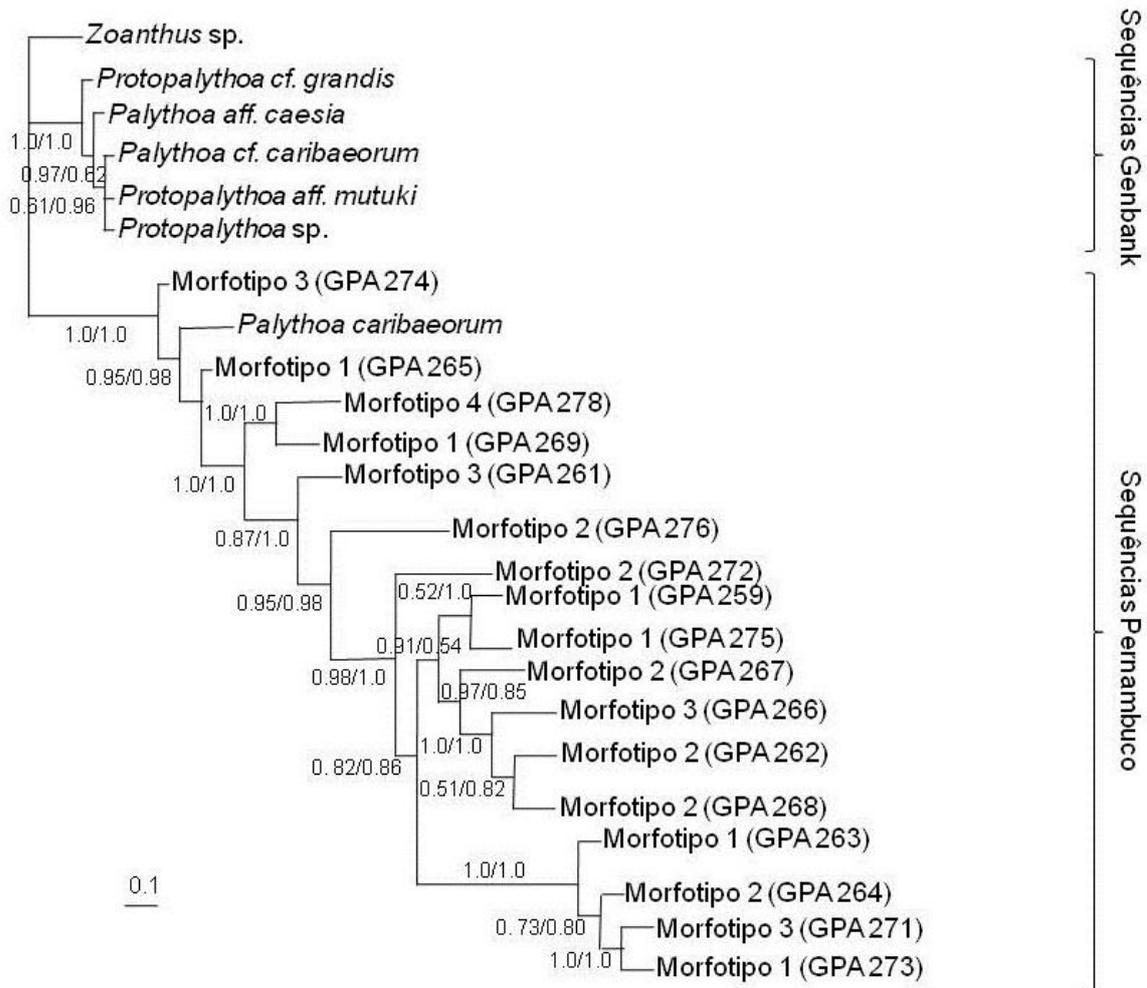


Figura 4. Árvore baseada em sequências do gene mitocondrial 12S rDNA. Valores de suporte de bootstrap (Neighbor-Joining/Inferência Bayesiana).

2.4 Considerações Finais

De maneira geral as relações filogenéticas observadas por valores de Neighbor-Joining e Inferência Bayesiana, mostraram resultados semelhantes colocando as amostras de Pernambuco como uma espécie diferente das encontradas no GenBank. É claro que a correta identificação deveria ser comparando nossas amostras com a espécie tipo, contudo, baseado nos resultados morfológicos que coincidem com a descrição original do holótipo de *P. variabilis* e as sequências de *P. variabilis* do GenBank que não tem uma descrição

confiável (*P. aff variabilis*), consideramos nossas amostras como válidas para *Protopalythoa variabilis*.

Até o presente momento nenhum trabalho utilizou técnicas morfológicas e moleculares para identificação de espécies do gênero *Protopalythoa* no Brasil. Alguns trabalhos citam a existência da espécie *P. variabilis* no nordeste brasileiro (GOLDIM *et al.* 2011; SOARES *et al.* 2011), porém nenhum desses trabalhos realizou uma abordagem taxonômica para correta identificação dessa espécie. Através de estudo morfológico preciso, a espécie *P. variabilis* teve sua descrição revisada e emendada. Os resultados mostram que todas as 20 amostras coletadas no estado de Pernambuco pertencem à espécie *P. variabilis*. E os dados moleculares dos três marcadores utilizados reforçam esse resultado ao agrupar o clado das amostras de *P. variabilis* de Pernambuco, separado do clado de outras amostras de *Protopalythoa* do GenBank.

Um importante resultado obtido foi à clara existência de padrões de variação dentro do grupo *P. variabilis*. Fato esse, que fica evidente pela existência dos três morfotipos de *P. variabilis*, encontrados ao longo da costa de Pernambuco através de análise morfológica, e pelo nível de variabilidade encontrado dentro do clado das sequências de Pernambuco. Essa diversidade de morfotipos encontrada dentro de espécies de zoantídeos é uma característica marcante desse grupo de organismos (REIMER *et al.* 2007a; SINNIGER *et al.* 2010; REIMER *et al.* 2012a), contribuindo para a confusa história taxonômica dessa ordem. Zoantídeos brachycnemina apesar de ocuparem apenas águas rasas, são animais que possuem amplas faixas de distribuição (CARLGREN, 1954), *P. variabilis* pode corroborar essa ideia. Apesar de isso contribuir para a baixa diversidade desse grupo em algumas localidades (REIMER *et al.* 2012a), pode ter favorecido o surgimento de variação intra-específica observada, devido a ocupação de suas colônias em diferentes locais, ao longo de toda costa ficando assim expostas, a diferentes pressões ambientais. É lógico que futuros trabalhos devem ser realizados a fim de comprovar essa hipótese, contudo, se sabe que as pressões ambientais podem favorecer a plasticidade fenotípica desses animais, levando ao surgimento de variação intra específica (COSTA *et al.* 2011; HIBINO *et al.* 2013). Essa variação dos três morfotipos encontrados para *P. variabilis* pode indicar uma futura separação dentro da espécie, ou formação de um complexo de espécies.

Os dados moleculares mesmo agrupando as amostras de *P. variabilis* de Pernambuco em um clado diferente das outras sequências de *Protopalythoa* do GenBank, apresentam diferenças entre os marcadores utilizados. Isso pode ser explicado pelo fato de que marcadores diferentes revelam respostas diferentes. Apesar de marcadores mitocondriais não apresentarem os melhores resultados para Anthozoa (SHEARER *et al.*

2002) os genes (*COI*, 16S rDNA e 12S rDNA) foram utilizados com sucesso em vários trabalhos de taxonomia de zoantídeos (REIMER *et al.* 2006a, 2006b; SINNIGER e HAUSSERMANN, 2009; SWAIN, 2009; KRISHINA e GOPHANE, 2013). Contudo, por serem regiões distintas, os marcadores podem apresentar resultados diferentes (SINNIGER *et al.* 2008). Ainda segundo os autores, entre os genes mitocondriais, a região *COI* parece ser a mais adequada para relações filogenéticas entre diferentes clados, já que o gene 16S rDNA apresenta altos níveis de variação. Isso fica confirmado pelo fato de que a topologia de *COI*, colocou a sequência de *Protopalythoa minima* nov. sp. - morfotipo 4 (GPA 279) – como sequência irmã das amostras de *P. variabilis* de Pernambuco, legitimando essa espécie como nova, corroborando os resultados morfológicos.

Algumas sequências do GenBank não apresentaram uma identificação confiável sendo indicadas como “aff” ou “cf” o que deixa a identificação impossível. Isso é um grande problema para estudos taxonômicos com zoantídeos, pois a identificação incorreta de espécies leva a geração de um status taxonômico errado causando dessa forma uma grande confusão na identificação das espécies (SINNIGER *et al.* 2008). Estudos revelam que erros taxonômicos propagados aumentam não só a confusão dentro de determinados grupos, como também atrapalham resultados de diferentes pesquisas distintas a respeito de determinados táxons (SHEPPAR, 1998).

Esse erro se deve ao fato de muitos trabalhos taxonômicos priorizarem um único método de análise dos dados, segundo Sinniger e colaboradores (2013) isso contribui para o estado caótico na taxonomia de zoantídeos, e que é de vital importância a integração de vários conhecimentos para a produção de resultados satisfatórios (SWAIN, 2009; REIMER *et al.* 2012a; HIBINO *et al.* 2013; KRISHINA e GOPHANE, 2013). Estudos taxonômicos de zoantídeos são sempre cercados de muita confusão devido à falta de caracteres diagnósticos e descrições incorretas. No entanto, com o desenvolvimento de pesquisas taxonômicas integrativas esse quadro de caos tende a diminuir.

De forma geral esse estudo nos permite confirmar a existência de uma nova espécie dentro do gênero *Protopalythoa* e a redescrição da espécie *P. variabilis* englobando os seus diferentes morfotipos. Apesar dos resultados obtidos, novas pesquisas moleculares serão realizadas, a fim de esclarecer melhor a posição filogenética da espécie *P. variabilis*.

REFERÊNCIAS

AMARAL, F.D.; HUDSON, M. M.; SILVEIRA, F.L.; MIGOTTO, A. E.; PINTO, S. M.; LONGO, L. Cnidarians of Saint Peter and St. Paul Archipelago, Northeast Brazil. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*, Bali, Indonesia 23-27, 2000.

ANDRES, A. On a New Genus and Species of *Zoanthina malacodermata* (*Panceria spongiosa*, sp. n.) Quartenarian. *Journal Microcnesi Sei.* p. 221, pi. Xvi, 1877.

BAKER, A. C. Flexibility and specificity in coral–algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 661–689, 2003.

BARRADAS, J. I.; AMARAL, F. D. HERNÁNDEZ, M. I. M.; FLORES-MONTES, M. J.; ANDREA QUIRINO STEINER, A. Q. Spatial distribution of benthic macroorganisms on reef flats at Porto de Galinhas Beach (northeastern Brazil), with special focus on corals and calcified hydroids. *Biotemas*, 23 (2): 61-67, 2010.

BOSCOLO, H. K.; SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria: Anthozoa; Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. *Brazilian Journal Biology*, São Carlos, v. 65, n.1, p. 29-41, 2005.

BURNETT, W. J.; BENZIE, J. A. H.; BEARDMORE, J. A.; RYLAND J. S. High genetic variability and patchiness in a common Great Barrier Reef zoanthid (*Palythoa caesia*). *Marine Biology*, v. 121, p. 153-160, 1994.

BURNETT, W. J.; BENZIE, J. A. H.; BEARDMORE, J. A.; RYLAND J. S. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. *Coral Reefs*, v. 16, n. 1, p. 55–68, 1997.

CARLGREN, O. Zoantharia. *The Danish Ingolf Expedition*. v.5 (4): pp. 1–65. 1913.

CARLGREN, O. Actiniaria and Zoantharia from South and West Australia with comments upon some Actiniaria from New Zealand. *Proceedings of the National Museum*, v. 6, p. 571–595, 1954.

CARREIRO-SILVA, M.; BRAGA-HENRIQUES, A.; SAMPAIO, I.; MATOS, V.; PORTEIRO, F. M.; OCANÃ. O. *Isozoanthus primnoidus*, a new species of zoanthid (Cnidaria: Zoantharia) associated with the gorgonian *Callogorgia verticillata* (Cnidaria: Alcyonacea). *Journal of Marine Science*, v. 68, n.2, p. 408–415, 2011.

CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C.C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F.L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). *Journal of Applied Microbiology*. n.106. p.1818–1826. 2009.

COLLINS, A.G. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 15, n.3, p. 418-32, 2002.

COSTA, D.L.; GOMES, P. B.; SANTOS, A. M.; VALENÇA, N. S.; VIERIRA, N. A.; PÉREZ, C. D. Morphological plasticity in the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum* as an adaptive strategy. *Annals Zoologic. Fennicini*. v.48. p.349-358. 2011.

DALY, M.; BRUGLER, M. R.; CARTWRIGHT, P.; COLLINS, A. G.; DAWSON, M. N.; FAUTIN, D. G.; FRANCE, S. C.; MCFADDEN, C. S.; OPRESKO, D. M.; RODRIGUEZ, E.; ROMANO, S. L.; STAKE, J. L. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, n. 1668, p. 127-182, 2007.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, n. 85, p. 407–415, 2005.

DARRIBA, D.; *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 772, 2012.

DUERDEN, J. E. Jamaican Actiniaria. Part I.- Zoantheae. *Scientific Transactions of the Royal Dublin Society*, v. 6, p. 329–385, 1898.

FAUSTIN, D. G.; MARISCAL, R. N. *Cnidaria: Anthozoa*. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, New York: Liss, Inc, v.2, chapter 6, 1991. pp. 267-358.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle (USA), 2005. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Acesso em: 20 Dez. 2013.

FONSECA, R. S. et al. Ecossistema Recifal da Praia de Porto de Galinhas (Ipojuca, Pernambuco): Biomassa Fitoplanctônica e Hidrologia. *Boletim Técnico Científico, CEPENE*, v.10, n.1, p. 9-26. 2002.

GONDIM, A. I.; DIAS, T. L. P.; CAMPOS, F. F.; ALONSO, C.; CHRISTOFFERSEN, M. L. Macrofauna benthica do Parque Estadual Marinho de Areia Vermelha, Cabedelo, Paraíba, Brasil. *Biota Neotropical*. v. 11, n. 2. p. 75 – 86. 2011.

HADDON, A. C.; SHACKLETON, A. M. Reports on the zoological collection made in Torres Straits. Actiniae: I. Zoantheae. *Scientific Transactions Royal Dublin Society*. Dublin, v. 4, n. 2, p. 673-701, 1890.

HADDON, A. C.; SHACKLETON, A. M. Revision of the British Actiniae. Part II. The Zoantheae. *Scientific Transactions Royal Dublin Society*. Dublin, v. 4, p. 609-672, 1891.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.

HÄUSSERMANN, V.; OFWGEN, L. V. *Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia*. Nature in Focus. Chile: v. 1, 2010.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*. n. 270, p. 313–321, 2003.

HERBERTS, C. *Contribution a l'etude biologique de quelques Zoanthaires temprrh et tropicaux 11. Relations entre la reproduction sexue, la croissance somatique et le bourgeonnement*. Tethys, France. 961-968p. 1972.

HERTOIG, E. Report on the Actiniaria dredged Challenger during the years 1873-1876. *The Zoology of the Voyage of Challenger*. p. 15, 1882.

HIBINO, Y.; TODD, P. A.; YANG, S. Y.; BENAYAHU, Y.; REIMER, J. D. Molecular and morphological evidence for conspecificity of two common Indo-Pacific species of *Palythoa* (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia*, p.13, 2013.

KOCH, G. V. Notizen liber Korallen. *Morphological Jahrbücher*. v. 6, p. 355, p. 16, 1880.

KOEHL, M. A. R. Water flow and morphology of zoanthid colonies. *Proceedings of the 3rd International Coral Reef Symposium*, v. 1, p. 437– 444, 1977.

KRISHNA, J. M.; GOPHANE, A. Cnidarian from the Coast of Goa – Identified to the Species Level. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. v. 2, n. 1, p. 209-218, 2013.

LONGO, L. L.; ARIAS, M. C.; SCHLENZ, E. PCR amplification of the 16S mitochondrial gene of *Zoanthus sociatus* (Zoanthidea, Anthozoa) using heterologous primers. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia*. v. 1, 23-27. 2000.

LONGO, L. L. *Caracterização de Zoanthus Lamarck, 1801 (Anthozoa: Zoanthidea: Zoanthidae) da costa brasileira: análise morfológica e molecular*. Tese: (Doutorado) 87f. 2002. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, p. 87. 2002.

MARQUES, A. C.; COLLINS, A. G. Cladistic Analysis of Medusozoa and Cnidarian Evolution. *Invertebrate Biology*, v. 123, n.1, p. 23 – 42, 2004.

MELO, L. F. A.; CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, L. L. D. S. S.; MODESTO, J. C. A.; PÉREZ, C. D. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. *Biotemas*, v. 25, n. 3, p.145-151, 2012.

MILLER, K. J. Morphological variation in the coral genus *Platygyra*: environmental influences and taxonomic implications. *Marine Ecology Progress Series*. v. 110: 19-28.1994.

OCANÃ, O.; BRITO, A. A review of *Gerardiidae* (Anthozoa: Zoantharia) from the Macaronesian islands and the Mediterranean Sea with the description of a new species. *Revista de La Academia Canaria de Ciencias*, v.15, n. 3-4, p. 159-189, 2004.

OIGMAN-PSZCZOL, S. S.; FIGUEIREDO, M. A. D.; CREED, J. C. Distribution of benthic communities on the tropical rocky subtidal of Armação dos Búzios, southeastern Brazil. *Marine Ecology*, v. 25, n. 3, p. 173–190, 2004.

OPRESKO, D. M. Three new species *Leiopathes oi* (Cnidaria: Anthozoa: Antipatharia) from Southern Australia. *Records of the South Australian Museum*, v. 31, p. 99-111, 1998.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v. 7, n. 16, p. 14, 2010

PAX, F. Studien an westindischen Actinien. *Zoologische Jahrbücher Supplement*, v. 11, p. 157–330, 1910.

PÉREZ, C. D. *Taxonomía, distribución y diversidad de los Pennatulacea, Gorgonacea e Alcyonacea del mar epicontinental argentine y zonas de influencia*. Tese: (Doutorado em Ciências Biológicas) 254f. 1999. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 254p. 1999.

PHILIPP, N. A.; FAUTIN, D. G. Three new species of shallow water, yellow zoanthids (Hexacorallia: Zoanthidea: Epizoanthidae) from southern California, USA, and southern Australia. *Zootaxa*, v. 2058, p. 53–61, 2009.

PLAYFAIR, J.; McMURRICH, M. A. *Invertebrate Morphology*. New York: Second Edition Revised, 1869, 661p.

POLAK, O, LOYA, Y, BRICKNER, I,; KRAMARSKI-WINTER, E,; BENAYAHU, Y . The widelydistributed Indo-Pacific zoanthid *Palythoa tuberculosa*: a sexually conservative strategist. *Bulletin of Marine Science*. v. 87. p. 605–621. 2011

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, p. 1253–1256, 2008.

RABELO, E. F. *Distribuição espacial e interações competitivas em zoantídeos (Cnidaria: Zoanthidae) em um ambiente de recifes de arenito no nordeste do Brasil*. Tese: (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais), 117f. 2007, Universidade Federal do Ceará, p.117. 2007.

REIMER, J. D.; ONO, S.; IWAMA, A.; TAKISHITA, K.; TSUKAHARA, J.; MARUYAMA, T. Morphological and molecular revision of *Zoanthus* (Anthozoa: Hexacorallia) from Southwestern Japan, with descriptions of two new species. *Zoological Science*, v.23, n. 3, p. 261–275, 2006a.

REIMER, J. D.; ONO, S.; TAKISHITA, K.; TSUKAHARA, J.; MARUYAMA, T. Molecular evidence suggesting species in the zoanthid genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) are congeneric. *Zoological Science*, v. 23, p. 87–94, 2006b.

REIMER, J. D.; ONO, S.; TSUKAHARA, J.; TAKISHITA, K.; MARUYAMA, T. Non-seasonal clade-specificity and subclade microvariation in symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa: Hexacorallia) at Kagoshima Bay, Japan. *Phycological Research*, v. 55, p. 58–65, 2007a.

REIMER, J. D.; TAKISHITA, K.; ONO, S.; TSUKAHARA, J.; MARUYAMA, T. Molecular evidence suggesting interspecific hybridization in *Zoanthus* spp. (Anthozoa: Hexacorallia). *Zoological Science*, v. 24, n. 4, p. 346–359, 2007b.

REIMER, J. D.; TAKISHITA, K.; ONO, S.; MARUYAMA, T. Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) based on nuclear ITS-rDNA,” *Coral Reefs*, v. 26, n. 2, p. 399–410, 2007c.

REIMER, J. D.; SINNIGER, F.; HICKMAN JR. C. P. Zoanthid diversity (Anthozoa: Hexacorallia) in the Galapagos Islands: a molecular examination. *Coral Reefs*, v. 27, p. 641–654, 2008a.

REIMER, J. D.; ONO, S.; TSUKAHARA, J.; IWASE, F. Molecular characterization of the zoanthid genus *Isaurus* (Anthozoa: Hexacorallia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) from Japan. *Marine Biology*, v. 153, n. 3, p. 351–363, 2008b.

REIMER, J. D.; FUJII, T. Four new species and one new genus of zoanthids (Cnidaria, Hexacorallia) from the Galápagos Islands. *ZooKeys*. v.42. p. 1–36. 2010.

REIMER, J. D.; HIROSE, M.; WIRTZ, P. Zoanthids of the Cape Verde Islands and their symbionts: previously unexamined diversity in the Northeastern Atlantic. *Contributions to Zoology*, v. 79, p. 147–163, 2010.

REIMER, J. D.; OBUCHI, M.; IREI, Y.; FUJII, T.; NOZAWA, Y. Shallow-Water Brachycnemic zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) from Taiwan: A preliminary survey. *Zoological Studies*, v. 50, n. 3, p. 363-371, 2011.

REIMER, J. D.; FOORD, C.; IREI, Y. Species diversity of shallow water zoanthids (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) in Florida. *Journal of Marine Biology*, v. 1, p. 14, 2012a.

REIMER, J. D.; LI, M.; FUJII, T.; LANE, D. J. W.; HOEKSEMA, B. W. The phylogenetic position of the solitary zoanthid genus *Sphenopus* (Cnidaria: Hexacorallia). *Contributions to Zoology*. v. 81. n.1. 2012b.

REIMER, J. D.; ALBINSKY, D.; YANG, S.Y.; LORION, J. Zoanthid (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia: Zoantharia) species of coral reefs in Palau. *Marine Biology*, p. 8, 2013.

RYLAND, J. S.; MUIRHEAD, A. *Order Zoanthidea*. In: Matter, P.; Bennet, I. (Ed). A Coral Reef Handbook Surrey Beatty and Sous. Chiping Norton, Uk. p. 52-58. 1993

RYLAND, J. S. Reproduction in Zoanthidea (Anthozoa: Hexacorallia). *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 31, p. 177- 188, 1997.

RYLAND, J. S.; LANCASTER, J. E. Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia: Zoanthidea) in the tropical West Pacific. *Invertebrate Systematics*, v. 17, p. 407–428, 2003.

RYLAND, J. S.; LANCASTER, J. E. A review of zoanthid nematocyst types and their population structure. *Hydrobiologia* v. 530/531, p. 179–187, 2004.

ROHLFS DE MACEDO, C.M.R.; BELÉM, M. J. C. The genus *zoanthus* in Brazil:

Characterization and Anatomical revision of *Zoanthus sociatus* (Cnidaria, Zoanthinaria, Zoanthidae). *Iheringia*, 77: 135-144. 1994.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, p. 1572–1574, 2003.

SHEARER, T. L.; VAN OPPEN, M. J. H.; ROMANO, S. L.; RHEIDE, G. W. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*. v.11, p. 2475-2487. 2002.

SHEPPARD, C. R. C. Biodiversity patterns in Indian Ocean corals, and effects of taxonomic error in data. *Biodiversity and Conservation*. v.7, p. 847-868. 1998.

SILVEIRA, F. L.; MORANDINI, A. C. Checklist of Cnidaria from São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropical*. v11. n1. p. 10. 2011.

SINNIGER, F.; MONTOYA-BURGESS, J. I.; CHEVALDONNE, P.; PAWLOWSKI, J. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on mitochondrial ribosomal genes. *Marine Biology*, v. 147, p. 1121–1128, 2005.

SINNIGER, F. *Zoanths of New Caledonia*. In: Payri, C. & B. Richier de Forges (eds), Compendium of Marine Species from New Caledonia. IRD Editions, Noumea: p.127–128, 2006.

SINNIGER, F.; REIMER, J. D.; PAWLOWSKI, J. Potential of DNA sequences to identify zoanths (Cnidaria: Zoantharia). *Zoological Science*, v. 25, n. 12, p. 1253–1260, 2008.

SINNIGER, F.; HAÜSSERMANN, V. Zoanths (Cnidaria: Hexacorallia: Zoantharia) from shallow waters of the southern Chilean fjord region, with descriptions of a new genus and two new species. *Organisms, Diversity, & Evolution*, v. 9, p. 23–36, 2009.

SINNIGER, F.; REIMER, J. D.; PAWLOWSKI, J. The Parazoanthidae (Hexacorallia: Zoantharia) DNA taxonomy: description of two new genera. *Marine Biodiversity*, v. 40, p. 57–70, 2010.

SINNIGER, F.; OCANÃ, O. V.; BACO, A. R. Diversity of Zoanthids (Anthozoa: Hexacorallia) on Hawaiian Seamounts: Description of the Hawaiian Gold Coral and additional zoanthids. *Public Library of Science*, v. 8, n. 1, p. 13, 2013.

SOARES, C. L. S.; PÉREZ, C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S.; MELLO, L. F. A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 16, n. 4, Set-Dez. 2006.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F.; MATHEWS-CASCON, H. Intertidal Anthozoans from the coast of Ceará (Brazil). *Revista Brasileira de Biociências*. v. 9, n. 4, p. 437-443. 2011.

SWAIN, T. D. Phylogeny-based species delimitations and the evolution of host associations in symbiotic zoanthids (Anthozoa: Zoanthidea) of the wider Caribbean region. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 156, n. 2, p. 223–238, 2009.

SWAIN, T. D. Evolutionary transitions in symbioses: dramatic reductions in bathymetric and geographic ranges of Zoanthidea coincide with loss of symbioses with invertebrates. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 2587–2598, 2010.

SWAIN, T. D.; WULFF, J. L. Diversity and specificity of Caribbean sponge–zoanthid symbioses: a foundation for understanding the adaptive significance of symbioses and generating hypotheses about higher-order systematics. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 92, p. 695–711, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: phylogeny analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. *Sunderland, MA: Sinauer Associated Inc.* 2002.

THOMPSON, J.D., *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

VERRILL, A. E. Additions to the Anthozoa and Hydrozoa of the Bermudas. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Science*, v. 10, n. 2, p. 551–572, 1900.

VERRILL, A. E. Hawaiian shallow water Anthozoa. *Bulletin*, v. 49, p. 30, 1928.

WALSH, G. E.; BOWERS, R. L. A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species. *Zoological Journal of Linnean Society*, v. 50, p. 161–180, 1971.

WEILL, R. Contribution a l'étude des cnidaires et de leurs nematocystes. Travaux de la Station. *Zoologique de Wimereux*. 10–11: 1–702. 1934.

WON, J., RHO, B.; SONG, J. A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. *Coral Reefs*, v. 20, p. 39-50, 2001.

