Julia Silva Beneti

**A anêmona-do-mar *Diadumene* Stephenson, 1920:
um cnidário com potencial invasor na Baía de Paranaguá, PR, Brasil.**

**São Paulo
2011**

Julia Silva Beneti

**A anêmona-do-mar *Diadumene* Stephenson, 1920:
um cnidário com potencial invasor na Baía de Paranaguá, PR, Brasil.**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Fábio Lang da Silveira

**São Paulo
2011**

Beneti, Julia Silva

A anêmona-do-mar *Diadumene* Stephenson, 1920: um cnidário com potencial invasor na Baía de Paranaguá, PR, Brasil.

79 páginas - 2011

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

1. Actiniaria 2. Diadumenidae 3. Potencial invasor I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Fábio Lang da Silveira
Orientador(a)

Agradecimentos

Ao meu orientador e “chefe”, Prof. Dr. Fábio Lang da Silveira, por sua enorme contribuição na minha formação científica e por me dar a oportunidade de desenvolver esse projeto.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de Mestrado (processo número 135468/2009-4).

À CAPES/PROAP (2009/2010), pelo auxílio financeiro concedido para a realização das coletas e aquisição do material de laboratório.

Ao Iate Clube de Paranaguá, por permitir a coleta do material dentro de suas dependências.

Ao Enio Mattos por me ensinar a fazer lâminas histológicas.

Ao Sérgio Stampar e ao Max Maronna por realizarem a análise molecular da espécie, no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Zoologia do IBUSP, e ao Prof. Dr. André Morandini pelo financiamento desta parte do trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Ecologia do IBUSP, pelas dicas dadas quando participei dos Seminários da Ecologia. Em especial, à Esther González, à Rachel Werneck, e à Camila Mandai, que fizeram o papel de boas e pacientes amigas e me ouviram explicar mil vezes meus experimentos até decidir que teste estatístico usar!

Aos funcionários da Secretaria da Zoologia e da Pós-Graduação e aos funcionários da Biblioteca do IBUSP.

Ao pessoal do Laboratório de Estudos e Cultivo de Cnidaria: Sérgio Stampar, Jonathan Almeida, Renato Mitsuo, Leandro Santos, Maysa Miceno e André Morandini, pela amizade, pelas sugestões no trabalho e pelos (vários) momentos de descontração no laboratório.

À Leila Longo, minha mãe por partenogênese, pelas fofocas e por ser uma grande amiga desde que cheguei a São Paulo.

Aos meus amigos do IB por me aguentarem falando, reclamando e fofocando no corredor, na cantina e no CA: Loboda, Du, Jomar, Camila, Esther, Denise, Mari, João, Sarah, Denis, Diego, Karla, Maria, Robertinha, Jé, Elaine, Nicolle, Babi e todo mundo que, de diferentes formas, contribuiu para que esse período do mestrado tenha sido tão divertido! E um “thanks” especial à Rach, por ser uma ótima cozinheira e me dar comida – rsrs – e pelos inúmeros passeios, viagens, cafés, monitorias, risadas, cantorias, compras, entre muitíssimas outras coisas, e à Pri, por ser minha companheira pra tomar Coca Cola, pra matar tempo e reclamar da vida!

À Naty, uma pessoa aleatória que surgiu pra morar comigo, mas que, apesar de ter nascido na década de 90 e ser muuuito mais nova e imatura que eu (óbvio!), se tornou uma amiga muuuito especial!

À Profa. Dra. Maria Angélica Haddad pela amizade e o apoio dado desde o início do meu curso de Graduação, na UFPR, e pelo interesse e trocas de idéias sobre esse projeto.

Aos meus ex-colegas do Laboratório de Estudos de Cnidaria e Bryozoa, da UFPR, pela ajuda nas coletas, pela amizade, pelas conversas sobre o projeto (e também pelas que não tinham nada a ver com trabalho): Halina, Luciana, Ariane, Emanuel e Carol. E à Bruna pela ajuda nas coletas e no laboratório (em Curitiba e em São Paulo)!

Ao povo da M11, de Curitiba, por serem meus melhores amigos há tanto tempo, e por me incentivarem, xingarem e zoarem sempre que necessário (e também quando não é necessário!), principalmente ao Diego, ao Wilson, à Karin, ao Márcio, à Rafaela, à Mari Tanaka, à Mari Sella, ao Thiago, ao Monte, ao Miúdo e à Jana.

À Tatiana, a prima e amiga mais querida, que me apóia em todos os momentos, com seu jeito sempre otimista e sua capacidade mágica de estar sempre presente e informada!

À minha família de Santos, especialmente à Bisa Zilé, por serem uma ótima desculpa pra eu fugir de São Paulo às vezes. Aos meus avôs e avós, por sempre me apoiarem e me incentivarem em minhas conquistas.

E, finalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Cesar e Claudia, e aos meus irmãos, Lucas e Sara, por todo o amor, carinho e educação que recebi até hoje, e por serem a família mais linda, especial, incrível e humilde do mundo!

Enfim, muito obrigada a todo mundo que, de uma forma ou outra, contribuiu para a realização deste trabalho!

Resumo

Anêmonas-do-mar do gênero *Diadumene* Stephenson, 1920 foram encontradas em grande abundância fixadas sobre substratos naturais e estruturas artificiais na Baía de Paranaguá. Em 1989, em trabalho realizado no mesmo local, a quantidade de anêmonas deste gênero, não identificadas em nível de espécie, era baixa. Sua grande abundância atual pode ser explicada por sua alta taxa de reprodução assexuada, por fissão longitudinal, um dos fatores que poderiam caracterizar essas anêmonas como sendo uma espécie exótica e invasora. A elucidação dos aspectos sistemáticos dessas anêmonas e a compreensão de alguns de suas características biológicas são essenciais para definir o status da espécie na costa brasileira. Para isso, foram realizadas cinco (5) coletas no Iate Clube de Paranaguá, entre agosto de 2009 e agosto de 2010. Em cada coleta, aproximadamente 200 espécimes foram coletados e levados ao laboratório para serem submetidos aos estudos taxonômicos ou aos experimentos de resposta a parâmetros ambientais. A definição da espécie foi realizada com base em ferramentas taxonômicas comumente utilizadas para a ordem Actinaria (morfologia externa, interna, elementos musculares e cnidoma) e através do seqüenciamento do gene mitocondrial 16s rRNA. Além disso, foi testada a tolerância da espécie a diferentes salinidades, à dessecação e a preferência por locais iluminados, sendo que os dois primeiros testes revelam se existe uma adaptabilidade característica de espécies invasoras, e o último sua capacidade de colonizar um local de águas calmas, mas onde há grande interferência humana por ser um porto movimentado. A análise morfológica mostrou que a espécie de Paranaguá apresentava diferenças, segundo a literatura, em relação a todas as demais espécies do gênero *Diadumene*, sendo os caracteres responsáveis pela diferença: presença de cíncldes na coluna dispostas em fileiras longitudinais, presença de nematocistos do tipo macrobásico p-amastigóforo nos tentáculos e nematocistos do tipo microbásico p-amastigóforo nos acôncios. No entanto, a análise molecular mostrou que a população da Baía de Paranaguá provavelmente é oriunda de uma população da espécie *Diadumene cincta* Stephenson, 1925. Nos experimentos, notou-se uma grande tolerância da espécie aos diversos fatores ambientais, mostrando que a espécie pode apresentar a plasticidade fenotípica característica de espécies invasoras. *D. cincta* já apresenta registros na literatura que a caracterizam como espécie invasora nos mares europeus e na costa atlântica européia, e acredita-se que a sua introdução na Baía de Paranaguá tenha se dado através de incrustação em cascos de navios, já que a região onde a anêmona foi encontrada é próxima ao Porto de Paranaguá. O monitoramento das espécies exóticas encontradas na costa brasileira é de grande importância, já que estas podem vir a causar impactos no ambiente ou nas atividades socioeconômicas que afetam o ser humano. Além disso, é imprescindível que sejam realizados mais estudos sobre as características das populações das espécies marinhas introduzidas no local, inclusive *D. cincta*.

Abstract

A great number of sea anemones of the genus *Diadumene* Stephenson, 1920 were found fixated on natural and artificial substrates at the Paranaguá Bay. In 1989, in a study conducted at the same location, the number of anemones of this genus, not identified to a specific level, was much lower. The great abundance of anemones that has currently been observed may be explained by the population's high rate of asexual reproduction, by longitudinal fission, one of the factors that may characterize these anemones as an exotic and invasive species. The elucidation of the systematic aspects of these anemones and the understanding of some of their biological characteristics are essential for defining the status of this species along the Brazilian coast. For this purpose, approximately 200 specimens were collected in five different dates, between August 2009 and August 2010, at the Iate Club of Paranaguá. The specimens were taken to the laboratory and submitted to taxonomical studies and experiments of response to environmental parameters. The definition of the species was based on the taxonomical features usually used for the order Actiniaria (external and internal morphology, muscle elements and cnidoma) and on the sequencing of the mitochondrial 16S rRNA gene. The species' tolerance to different salinities and to air exposure was tested, as was its preference for illuminated places. The first two tests would reveal if the sea anemone has an adaptability that is characteristic of invasive species, while the latter would test its ability to colonize calm waters with great human interference (due to the proximity to the Paranaguá Port). The morphological analysis revealed that the species from Paranaguá differed from the other species of the genus, because of the presence of the following characteristics: cinclids on the capitulum in longitudinal rows, macrobasic p-amastigophores in the tentacles and microbasic amastigophores in the acontia. However, molecular analysis showed that population of Paranaguá was probably originated from a population of the species *Diadumene cincta* Stephenson, 1925. The experiments showed that the species has a high tolerance to the tested environmental factors, showing that it may present the phenotypic plasticity that is characteristic of invasive species. *D. cincta* is already registered as an invasive species in European seas and the Atlantic coast of Europe, and it is believed that its introduction in the Paranaguá Bay was by fouling on shiphulls, as the species was found in a location near the Port of Paranaguá. The monitoring of alien species found along the Brazilian coast is very important, since these species may cause impacts on the environment or on human socio-economic activities. Moreover, it is necessary to conduct more studies on the characteristics of populations of marine species introduced in the Paranaguá Bay, including *D. cincta*.

Sumário

Introdução.....	1
Sistemática da ordem Actiniaria	3
<i>Anêmonas com acôncios</i>	4
<i>Família Diadumenidae</i>	5
Aspectos taxonômicos em anêmonas-do-mar	10
<i>Morfologia externa e interna</i>	10
<i>Cnidoma</i>	12
Reprodução assexuada em anêmonas-do-mar.....	14
Deslocamento das anêmonas-do-mar	17
Material e Métodos.....	19
Coleta do material	19
Procedimentos para taxonomia	21
Procedimentos para análise de dados moleculares.....	22
Procedimentos para experimentos de tolerância às salinidades e tempos de dessecação	23
<i>Tolerância à variação brusca de salinidade</i>	24
<i>Tolerância à exposição ao ar (dessecação)</i>	25
Procedimentos para experimentos de deslocamento com relação à luminosidade	26
Resultados	29
Análise taxonômica	29
Descrição de <i>Diadumene</i> sp da Baía de Paranaguá.....	41
<i>Morfologia Externa</i>	41
<i>Morfologia interna</i>	43
<i>Cnidoma</i>	43
<i>Observações de habitat</i>	44
<i>Observações em laboratório</i>	45
Análise Molecular	50
Análise dos Experimentos	50
<i>Tolerância a diferentes salinidades e tempos de exposição ao ar (dessecação)</i>	50
<i>Deslocamento</i>	51
Discussão.....	54
Conclusões	59

Referências Bibliográficas	60
Anexos.....	70
Anexo 1: Protocolo para preparação de cortes histológicos.....	70
Anexo 2: Materiais depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo	73
Anexo 3: Tabela comparativa das descrições de cnidoma de <i>Diadumene leucolena</i>	74
Anexo 4: Tabela comparativa das descrições de cnidoma de <i>Diadumene lineata</i>	75
Anexo 5: Seqüência do gene mitocondrial 16S rRNA da espécie de <i>Diadumene</i> da Baía de Paranaguá.	77
Anexo 6: Comparação das seqüências do gene mitocondrial 16S rRNA entre a espécie de <i>Diadumene</i> da Baía de Paranaguá, <i>D. cincta</i> e <i>D. lineata</i>	78

Introdução

As anêmonas do mar estão entre os animais invertebrados mais conhecidos de costões rochosos e praias arenosas e algumas espécies são bastante conhecidas no litoral de algumas regiões. Elas apresentam uma grande diversidade ecológica e morfológica e são encontradas em diversos tipos de habitats marinhos, em todas as profundidades e latitudes, o que faz com que estejam entre os membros mais diversos e bem sucedidos entre os Anthozoa, classe à qual pertencem (Daly *et al.* 2008). São animais exclusivamente solitários, apesar de algumas vezes se reproduzirem assexuadamente formando agregações de indivíduos clonais. Para o Brasil, há registros de 41 espécies (Fautin, 2010), o que é um número pequeno se comparado às 1200 espécies conhecidas e, também, considerando a grande extensão da costa brasileira. Os registros existentes para a costa brasileira são, em sua maioria, de espécies conspícuas de costões rochosos ou praias arenosas, cujos pólipos são facilmente observados devido ao seu tamanho grande. Esse número certamente aumentaria se fossem realizados estudos de anêmonas pequenas, de ambientes crípticos e de maior profundidade (Migotto *et al.*, 1999).

O presente trabalho tem como objetivo elucidar a posição taxonômica de uma espécie de anêmona-do-mar que foi encontrada no Iate Clube de Paranaguá, na Baía de Paranaguá, e descrever alguns de seus aspectos biológicos. Essa anêmona é numerosa e seus indivíduos são freqüentemente observados sobre substratos naturais e artificiais no local, formando grandes aglomerados de pólipos clonais, resultantes de reprodução assexuada por fissão longitudinal e laceração pedal. Uma identificação preliminar mostrou que a espécie pertence à família Diadumenidae Stephenson, 1920. Isso fez com que fosse levantada a suspeita de que esta se tratasse de uma espécie introduzida e, possivelmente, invasora, devido ao fato de esta família conter uma das espécies marinhas conhecidas com maior número de registros de invasões, a anêmona *Diadumene lineata* (Verrill, 1869) (Zabin *et al.*, 2004). Neste mesmo local, Correia & Loyola e Silva (1990) registraram, pela primeira vez para o Paraná, a presença de alguns espécimes do gênero *Diadumene*, sem precisar a espécie, porém em um número muito menor do que encontrado atualmente. Para compreender um pouco da biologia desta espécie de anêmona tão abundante, é necessário que seja realizada uma correta identificação e descrição desta espécie, além de compreender se ela possui a plasticidade fenotípica necessária para tolerar alguns fatores físicos com forte atuação no local. Isso foi realizado analisando-se sua tolerância à exposição temporária a diferentes salinidades e a diferentes tempos de exposição ao ar (dessecação). Adicionalmente, foi analisada sua capacidade de colonizar um ambiente de grande interferência humana, observando sua resposta a ambientes de maior ou menor luminosidade.

Sistemática da ordem Actiniaria

As anêmonas-do-mar estão contidas nas ordens Actiniaria Hertwig, 1882 e Corallimorpharia Carlgren, 1940, sendo que a primeira contém a grande maioria das espécies. A ordem Actiniaria está atualmente dividida em 46 famílias (Daly *et al.*, 2007) organizadas em grupos de acordo com proposta de Carlgren (1949). Das três subordens, Endocoelanthae Carlgren, 1925, Protanthae Carlgren, 1891 e Nynanthae Carlgren, 1899, apenas a última contém mais do que duas famílias. A subordem Nynanthae é dividida nas infraordens Athenaria Carlgren, 1899, Boloceroidaria Carlgren, 1924a e Thenaria Carlgren, 1899, sendo esta última subdividida ainda nas superfamílias Acontiaria Stephenson, 1935, Endomyaria Stephenson, 1921 e Mesomyaria Stephenson, 1921. Stephenson (1935), outro importante estudioso da ordem Actiniaria, considera Athenaria, Boloceroidaria, Acontiaria, Endomyaria e Mesomyaria como estando em um mesmo nível taxonômico, dispensando a utilização do termo Thenaria. Schmidt (1974), por sua vez, propõe que Acontiaria está contido em Mesomyaria (que ele ainda separou em dois grupos: “Early” Mesomyaria e “Late” Mesomyaria) e considera Athenaria como sendo um grupo polifilético que está parcialmente contido em Mesomyaria e Endomyaria. No entanto, nas três classificações, os caracteres escolhidos para separação dos grandes grupos dentro da ordem geraram grupos artificiais (Daly *et al.*, 2008). Segundo Carlgren (1949) sua classificação não é uma proposta filogenética, e, apesar de alguns estudos de filogenia molecular apoiarem a monofilia de Nynanthae, eles também mostraram que pelo menos algumas infraordens deste grupo, assim como as superfamílias contidas nestas, são parafiléticas (*e.g.* Bernston *et al.*, 1999; Won *et al.*, 2001; Daly *et al.*, 2003, 2008). A maioria destes trabalhos testou grupos mais amplos que a ordem Actiniaria, e, portanto não localizam com precisão os erros da classificação. O único trabalho cujo foco foi na ordem é o de Daly *et al.* (2008) que ajudou a evidenciar alguns problemas em nível de superfamília e família.

Existe uma grande falta de correspondência entre a sistemática em nível de infraordem e as características ecológicas, morfológicas e biológicas de seus representantes. Isto se deve principalmente ao fato de as relações entre os representantes do grupo estarem muitas vezes baseadas na ausência de características em vez de sinapomorfias. As famílias de anêmonas-do-mar, principalmente as contidas nas superfamílias Acontiaria e Mesomyaria, apresentam problemas semelhantes aos encontrados nos grupos de hierarquia superior (Daly *et al.*, 2008). Os representantes de cada família são caracterizados por um mosaico de características que se sobrepõem entre os grupos. Poucas famílias tem sido foco de estudos filogenéticos (*e.g.* Gusmão, 2010), e a monofilia não está clara pra a maior parte dos grupos. Além disso, a falta de material tipo e descrições inadequadas de espécies faz com que muitas espécies não possam ser identificadas

de maneira confiável e satisfatória, sendo necessária a redescritção de espécies e o estabelecimento de neótipos. Isso é a realidade tanto para Actiniaria quanto para Corallimorpharia. (Daly *et al.* 2007)

Anêmonas com acôncios

A família Diadumenidae, à qual pertence a espécie de anêmona encontrada na Baía de Paranaguá, está contida na superfamília Acontaria, junto com outras 14 famílias (Fautin, 2010). Hand (1956) coloca que “as Acontaria são geralmente reconhecidos como as mais complexas e evoluídas das anêmonas. Elas apresentam, em geral, um cnidoma mais complexo que os outros grupos além de estruturas notáveis como os *catch-tentacles* e, é claro, os acôncios” (p. 189). As anêmonas-do-mar apresentam diversas estruturas que geralmente caracterizam um determinado táxon. A maioria, como vesículas, *acrorhagii* e cínclides, é caráter de morfologia externa ligado a funções de defesa, ornamentação ou regulação da pressão hidrostática (Hyman, 1940). Já os acôncios são estruturas de origem interna, que podem ser liberados pela boca ou pelas cínclides (perfurações na parede do corpo) quando o animal se contrai bruscamente, e cuja função parece ser de defesa. Morfologicamente, os acôncios constituem a continuação dos filamentos mesentéricos, formando fios (extremidades) livres, e são histologicamente semelhantes às bandas cnidoglandulares dos mesentérios. Esses fios preenchem a parte inferior da cavidade gastrovascular (Hyman, 1940). Carlgren (1949) observou que, em geral, existe apenas um acôncio para cada par de mesentérios, mas que nem todos os mesentérios os possuem.

Os acôncios parecem ser uma estrutura bastante especializada dentro de Actiniaria, porém a presença destes não é um dos caracteres morfológicos levados em conta na separação dos grandes grupos dentro da ordem. Atualmente, as anêmonas com acôncios estão presentes em dois grupos: na superfamília Acontaria dentro da subordem Thenaria e em na subordem Athenaria. Este último grupo contém três famílias de anêmonas com acôncios, mas que não apresentam musculatura basilar, ou seja, não apresentam base definida. Apesar de as anêmonas com acôncios estarem classicamente colocados em grupos distintos, a filogenia molecular de Daly *et al.* (2008) mostrou que a perda de musculatura basilar é uma característica que provavelmente surgiu independentemente algumas vezes na linhagem de Actiniaria. Este trabalho e os de Gusmão (2010) e Gusmão & Daly (2010) mostraram que Acontaria é um táxon parafilético em relação à espécie da família Andvakiidae, que segundo a classificação de Carlgren (1949) se encontra na infraordem Athenaria.

Diadumenidae constitui uma família monogenérica que, atualmente, compreende nove espécies válidas (Fautin, 2010). Muitas características já foram inseridas na descrição da família, como mesentérios não diferenciados em macro- e microcnemes, e a presença de *catch-tentacles* com holótricos em alguns dos representantes (Carlgren, 1945; Manuel, 1981). No entanto na descrição mais atual encontrada, de Daly *et al.* (2007), restaram apenas os seguintes caracteres: dois tipos de nematocistos em seus acônios (basítricos e microbásico p-mastigóforos, segundo Hand, 1956) e ausência de esfíncter marginal. Ambos esses atributos são observados em outras famílias, porém não simultaneamente.

Um caráter controverso da família, não citado por Daly *et al.* (2007), é a musculatura longitudinal ectodérmica. Carlgren (1924) e Manuel (1981) citam a ausência deste caráter na família, mas Hand (1956) inclui a presença do caráter na descrição do gênero *Diadumene*. Outro caráter a ser discutido é a inclusão de presença de esfíncter endodérmico fraco na diagnose da família, como citado por Pinto (2002). Este caráter foi acrescentado por Hand (1956) quando o gênero *Aiptasiomorpha* Stephenson, 1920 foi excluído da família monogenérica Aiptasiomorphidae Carlgren, 1949 e incluído em Diadumenidae. Segundo o autor, o único caráter que posicionava os gêneros em famílias diferentes era a presença de *catch-tentacles* em alguns membros do segundo grupo, o que não deveria ser levado em conta como um caráter suficientemente relevante já que nem todos os espécimes da família apresentam esses tentáculos diferenciados. Porém, atualmente *Aiptasiomorpha* está novamente na família Aiptasiomorphidae (Daly, *et al.*, 2007; Fautin, 2010) devido ao fato de alguns exemplares apresentarem o esfíncter marginal, musculatura relativamente fraca e ausência de certos tipos de nematocistos nos tentáculos.

A presença de *catch-tentacles* é muitas vezes atribuída como característica do gênero. No entanto, como comentado anteriormente, esta estrutura tem pouco valor como caráter diagnóstico, devido ao fato de a presença dos *catch-tentacles* não ser observada em todos os indivíduos e não ser temporalmente constante em um mesmo indivíduo (Hand, 1956). Há registros da formação dessa estrutura em seis das nove espécies do gênero, além de espécies de outras famílias (Williams, 1975, 1991). Os *catch-tentacles* podem ser facilmente reconhecidos por serem mais espessos e opacos que os demais tentáculos quando contraídos, ou por realizarem movimentos peculiares de “varredura”, momento no qual podem chegar a ter comprimento muitas vezes maior que o dos demais tentáculos. Geralmente ocorrem como uma modificação de tentáculos do primeiro ciclo, e microscopicamente se caracterizam pela presença de nematocisto do tipo holótrico. Williams (1991) sugere que a presença deste tipo de tentáculo esteja ligada à defesa, além de alguma outra função ainda desconhecida. Hand (1956) relatou sua observação de espécimes de uma anêmona com

acôncio, *Metridium senile* (Linnaeus, 1761), utilizando estes tentáculos para alimentação. Segundo este autor, as anêmonas juntavam pequenas partículas do substrato, que se aderiam fortemente aos *catch-tentacles*, e eram prontamente transferidos à boca. Já Purcell (1977) observou para a mesma espécie a utilização desses tentáculos somente para agressão intra- e interespecífica.

As análises filogenéticas moleculares de Daly *et al.* (2008) mostraram Diadumenidae formando um grupo monofilético com Aiptasiidae Carlgren, 1924b, Haliplanellidae Hand, 1956, Metridiidae (Carlgren, 1893), e a maioria dos Sagartiidae (Gosse, 1858), que constituem uma família polifilética. Todas essas famílias são caracterizadas por apresentarem basítricos e microbásico p-mastigóforos nos acôncios. O que diferencia Aiptasiidae, Metridiidae e Sagartiidae de Diadumenidae é a presença de esfinter mesogleal fraco nas três famílias. A família Haliplanellidae foi descrita para acomodar a espécie *Haliplanella luciae* Hand, 1956 e o caráter que a diferencia de Diadumenidae é a presença de microbásico p-amastigóforos¹ nos acôncios (Hand, 1956; Daly *et al.*, 2007). Atualmente o gênero *Haliplanella* Hand, 1956 não é considerado válido (Fautin *et al.*, 2007), e a espécie foi sinonimizada para *Diadumene lineata* (Fautin, 2010). Manuel (1981) já havia sugerido a inclusão da representante de Haliplanellidae em Diadumenidae. Atualmente Haliplanellidae contém apenas uma espécie válida: *Tricnidactis errans* Pires, 1988.

As espécies atualmente válidas para o gênero *Diadumene* (Fautin, 2010) são as seguintes: *Diadumene schilleriana*, *D. neozelanica*, *D. crocata*, *D. kameruniensis*, *D. cincta*, *D. leucolena*, *D. franciscana*, *D. lighti* e *D. lineata*. Segue um breve resumo sobre estas espécies, com os principais aspectos levantados sobre cada uma delas.

Diadumene schilleriana (Stoliczka, 1869)

D. schilleriana é a espécie-tipo do gênero *Diadumene*. Stoliczka (1869) a descreveu, inicialmente, como *Sagartia schilleriana* e sua descrição compreende somente dados detalhados de morfologia externa e interna do animal, não incluindo informações sobre o tipo ou tamanho dos nematocistos. *Catch-tentacles* foram observados em alguns pólipos desta espécie (Stoliczka, 1869). Annandale (1907) encontrou alguns espécimes que acreditava ser da mesma espécie que os de Stoliczka, e descreve-os como sendo duas “raças” do gênero *Metridium* Blainville, 1824. Stephenson (1920) revisa o material de ambos os autores anteriores e decide que a espécie de Stoliczka não pertence ao gênero *Metridium* nem *Sagartia* Goose, 1855. Para acomodar a espécie nova, Stephenson descreve o gênero *Diadumene* e insere-o na família Diadumenidae junto com os gêneros *Pelocætes* Annandale, 1915, *Phytocætes* Annandale, 1915 e *Mena* Stephenson, 1920.

¹ Nomenclatura sugerida por Östman (2000), correspondente ao termo *amastigóforo*.

Atualmente estes três últimos gêneros estão inseridos na infraordem Athenaria. *D. schilleriana* ocorre na costa da Índia e em ilhas do Oceano Índico (Fautin, 2010).

Diadumene neozelanica Carlgren, 1924b

Na descrição original de *D. neozelanica*, o autor descreve a anatomia externa e interna desta espécie de forma bastante completa, informando as medidas dos nematocistos, sem, no entanto, identificar os tipos. Nesta descrição são apresentadas duas figuras: uma de morfologia externa do animal e uma secção transversal de um feixe de músculos num mesentério de primeira ordem. Parry (1952) apenas descreve brevemente a anatomia externa e cita aspectos ecológicos da espécie. Carlgren (1929) *apud* William (1975) registra a presença de *catch-tentacles* para esta espécie. A presença da espécie foi registrada exclusivamente no Oceano Pacífico Oeste, no litoral da Nova Zelândia (Fautin, 2010).

Diadumene crocata (Hutton, 1880)

Descrita originalmente como *Diactis crocata* Hutton, 1880, a espécie *D. crocata* foi inserida no gênero *Diadumene* por Parry (1952), pelo fato de a coluna ser dividida nitidamente em duas partes (capítulo e escapo). O trabalho com a descrição original da espécie não foi acessado, no entanto, esta descrição foi inteiramente citada em Parry (1952). A descrição é bastante curta e não apresenta informações suficientes para que se possa concluir se a espécie realmente pertence ou não ao gênero *Diadumene*, pois faltam informações de morfologia interna e do cnidoma. Stuckey (1909) cita a presença da espécie na Nova Zelândia (como *Sagartia crocata*), no entanto, por não ter observado nenhum indivíduo, o autor não acrescenta nenhuma informação sobre a morfologia da espécie. O único registro da espécie é no litoral da Nova Zelândia, Oceano Pacífico Oeste (Fautin, 2010).

Diadumene kameruniensis Carlgren, 1927

A descrição original da anatomia externa e interna de *D. kameruniensis* é bastante completa, no entanto o autor informa as medidas dos nematocistos sem identificar os tipos. Duas figuras são apresentadas no trabalho de Carlgren (1927): uma secção longitudinal de uma cínclide da região superior do corpo e uma secção transversal indicando o 1º, 2º e 3º ciclo de mesentérios na altura da faringe. Carlgren (1929) *apud* William (1975) registra a presença de *catch-tentacles* para esta espécie, e Carlgren (1937) comenta sobre a presença de nematocistos do tipo holótrico,

característico de *catch-tentacles*, nos tentáculos de alguns espécimes. Esta espécie ocorre em Camarões, no Oceano Atlântico Leste (Fautin, 2010).

Diadumene cincta Stephenson, 1925

Stephenson (1925) descreve meticulosamente aspectos de anatomia externa e interna de *D. cincta*, e cita diversos dados de ecologia e comportamento de indivíduos da espécie. No entanto, a descrição original da espécie não apresenta informações sobre seu cnidoma. Carlgren (1940) apresenta uma descrição bastante detalhada do cnidoma da espécie, sendo esta mais completa do que as outras duas descrições encontradas, de Stephenson (1928) e Manuel (1981). A presença de macrobásicos p-amastigóforos nos tentáculos é uma característica compartilhada com *D. lighti*. No entanto, essas cnidas são mais raras que os demais tipos e geralmente são encontradas somente nas pontas dos tentáculos (Carlgren, 1940), portanto pode-se ter certa dificuldade em encontrá-las. A presença de *catch-tentacles* foi registrada para a espécie, mas não ocorre em todos os espécimes, podendo estar completamente ausentes em certas populações (Hand, 1956) ou em certos estágios do desenvolvimento do animal (Carlgren, 1940). Esta espécie ocorre na costa Européia, na porção leste do Atlântico Norte (Fautin, 2010). Há também indicação na literatura de que se trata de uma espécie invasora para os mares contíguos da Europa, com registros relativamente recentes de introdução (no Mar do Norte em 1925, no Atlântico 1963 e no Mediterrâneo em 1993) (Streftaris *et al.*, 2005).

Diadumene leucolena (Verrill, 1866)

A espécie *D. leucolena* foi descrita inicialmente como *Sagartia leucolena* Verrill, 1866, mas foi incluída por Carlgren (1950) no gênero *Diadumene*. Carlgren (1950) e Hand (1956) apresentam descrições bastante completas desta espécie, sendo ambas bastante semelhantes com relação aos aspectos de morfologia externa e interna, havendo poucas divergências na descrição do cnidoma. Dentre as diferenças apontadas, a principal detectada foi que Carlgren (1950) relatou que a maioria dos espécimes que observou apresentava *catch-tentacles* com cnidas do tipo átricos e holótricos, enquanto Hand (1956) observou apenas um *catch-tentacle* em um dos 42 indivíduos que encontrou. Nenhum dos dois autores relatou a presença de macrobásico p-amastigóforos nos tentáculos, apesar de Carlgren (1950) argumentar que provavelmente estão presentes, porém são muito difíceis de encontrar. Alguns outros trabalhos que se referem à espécie são Vassalo (1969) e Cutress (1977), no entanto estes autores fornecem descrições morfológicas bastante superficiais, focando mais em aspectos ecológicos. Sebens (1998) construiu uma chave de identificação que incluiu a espécie, mas

também a descreveu de forma bastante simplificada. A espécie ocorre nas costas leste e oeste da América do Norte, Havaí e na costa leste da África (Fautin, 2010). Vassalo (1969) reporta a espécie como introduzida na Baía de São Francisco (Estados Unidos, costa leste do Oceano Pacífico) e Cutress (1977) e Zabin *et al.* (2004) no Havaí.

Diadumene franciscana Hand, 1956

A descrição original da espécie *D. franciscana* está bastante completa, abrangendo aspectos de morfologia externa, interna e de cnidoma. Hand (1956) comenta que esta espécie parece não ter características que a diferenciem completamente das demais espécies do gênero, e que pode não se tratar de uma nova espécie. O autor sugere que se trata de uma forma de outra *Diadumene* já conhecida e que foi introduzida na Baía de São Francisco. No entanto, o que o fez separá-la das demais espécies foram características como o tamanho e distribuição dos nematocistos, a posição dos tentáculos diretivos, a presença de agregações de nematocistos na coluna e uma área no disco oral livre de tentáculos (Hand, 1956).

Existem outros trabalhos que citam brevemente a espécie (*e.g.* Kostina, 1988; Zabin *et al.*, 2004), no entanto não são feitas novas considerações a respeito de seus caracteres. *D. franciscana* ocorre na Baía de São Francisco, na costa leste do Oceano Pacífico (Fautin, 2010), e foi reportada como espécie introduzida no Havaí por Zabin *et al.* (2004).

Diadumene lighti Hand, 1956

A descrição da espécie *D. lighti* foi realizada de forma bastante minuciosa compreendendo informações de anatomia externa, interna e cnidoma. Hand (1956) coloca que esta espécie se assemelha bastante a *D. cincta* em seus caracteres morfológicos, exceto pelo fato de *D. lighti* ser menor, apresentar menos tentáculos (tampouco foram observados *catch-tentacles*), e de apresentar diferenças no tamanho e na distribuição dos nematocistos. No entanto, uma importante característica que une estas duas espécies é a presença de macrobásicos p-amastigóforos nos tentáculos. Assim como para *D. franciscana*, existem trabalhos que citam *D. lighti* brevemente (*e.g.* Kostina, 1988), mas sem acrescentar informações sobre seus caracteres. Essa espécie, até o momento, apresenta registros somente para a Baía de São Francisco, na costa leste do Oceano Pacífico (Fautin, 2010).

Para a espécie *D. lineata* foi encontrada mais de uma descrição bastante completa incluindo seu cnidoma (e.g. Carlgren, 1951; Hand, 1956; Belém e Monteiro, 1977; Pinto, 2002). A principal característica que distingue esta espécie das demais é a presença de três tipos de nematocistos nos acôncios – basítrico, microbásico p-mastigóforo e microbásico p-amastigóforo. Os dois primeiros tipos são comuns nos acôncios de todas as espécies de *Diadumene*, mas o último está presente exclusivamente nos acôncios de *D. lineata*. Williams (1975) foi o primeiro a registrar a presença de *catch-tentacles* para esta espécie.

Esta espécie é uma conhecida invasora e ocorre em todos os oceanos, entre outros lugares na costa da Indonésia, Nova Zelândia, nas costas leste e oeste da América do Norte, Mediterrâneo e Havaí (Eldredge & Smith, 2001; Zabin *et al.*, 2003; Wonham *et al.* 2005; Fautin, 2010). No Brasil, há registros no litoral de São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Belém & Monteiro, 1977; Pires, 1988; Gomes & Mañal, 1997; Zamponi *et al.*, 1995, 1998). Alguns autores indicam a suposta origem de *D. lineata* como sendo no Japão ou Pacífico oeste (e.g. Shick & Lamb, 1977; Zabin *et al.*, 2004).

Em grande parte dos registros e nos guias de espécies invasoras, esta espécie aparece como *Haliplanella lineata* ou *H. luciae*. Williams (1980) *apud* Fautin (2010) foi o primeiro autor a sugerir que esta espécie fosse incluída no gênero *Diadumene*. *D. lineata* tem sido considerada uma das anêmonas de regiões entremarés mais abundantes e pode ser uma das espécies marinhas mais amplamente distribuídas (Minasian, 1979; Zabin *et al.*, 2004). A sua extensa distribuição latitudinal é acompanhada de uma grande tolerância a parâmetros físico-químicos, além de uma grande variação morfológica e capacidade de reprodução assexuada (Verrill, 1898; Minasian, 1979).

Aspectos taxonômicos em anêmonas-do-mar

Morfologia externa e interna

O pólipode de um actiniário consiste em uma estrutura tubular, a coluna, que na maioria das espécies tem grande capacidade de contração. Na base da coluna, ou região aboral, existe uma estrutura de adesão ao substrato conhecido como disco pedal. Oposta ao disco pedal, na região oral, encontra-se o disco oral, onde está a boca oval ou em forma de fenda, circundada pelo perístoma e por tentáculos. A coluna pode estar dividida em duas ou mais regiões, como escapo, escápulo e capítulo, e também pode ser lisa ou apresentar estruturas como verrugas, vesículas, tentáculos,

esférulas marginais ou cínclides (Hyman, 1940; Corrêa, 1964). Internamente à boca, em sentido oral-aboral, segue uma faringe tubular lateralmente comprimida, denominada actinofaringe, que faz a comunicação do ambiente externo com a cavidade gastrovascular através da boca. A cavidade gastrovascular atua na digestão extracelular, circulação, excreção, reprodução e suporte por esqueleto hidrostático. Os actiniários apresentam simetria corpórea bilateral ou birradial, pelo fato de terem a actinofaringe comprimida e pela presença de uma ou duas sifonoglifes, que são sulcos ciliados que têm início em cantos opostos da boca e que se estendem ao longo do comprimento da actinofaringe (Hyman, 1940). A cavidade gastrovascular possui mesentérios que são dobras longitudinais da gastroderme e mesoglêia, e esses mesentérios dividem a cavidade em câmaras radiais. Os mesentérios ocorrem em pares adjacentes, e podem ser completos, quando se unem à actinofaringe, ou incompletos, quando não se unem à actinofaringe. As câmaras formadas entre dois mesentérios completos de um mesmo par são denominadas endoceles, enquanto as formadas entre mesentérios de diferentes pares são as exoceles. O prolongamento das câmaras radiais dá origem aos tentáculos ocos endocélicos ou exocélicos. Pode existir um ou dois pares de mesentérios diretivos, que estão ligados a uma ou duas sifonoglifes (Hyman, 1940).

As células musculares em Anthozoa em geral ocorrem como uma única camada de fibras ligadas à superfície da mesoglêia. A modificação para a formação de musculatura mais desenvolvida consiste basicamente no espessamento da mesoglêia que permite acomodar um número maior de fibras. Algumas espécies apresentam uma musculatura bem desenvolvida, enquanto outras possuem musculatura fraca (Manuel, 1981). Os principais músculos dos pólipos são: os retratores, que são longitudinais e estão presentes em alguns ou todos os mesentérios; o parietobasilar, oblíquos e também presentes nos mesentérios; o basilar, radial e presente no disco pedal; e o esfíncter, músculo circular e presente na parte superior da coluna. O esfíncter é um caráter taxonômico de grande importância para a ordem Actiniaria e pode ser mesogleal ou endodérmico (Manuel, 1981). Outras informações relevantes a respeito da estrutura do pólio são com relação à presença e localização de gônadas, além de estruturas especializadas como os acôncios (Hyman, 1940).

Os caracteres taxonômicos que se baseiam na estrutura do pólio incluem arranjo e morfologia dos tentáculos e mesentérios, a morfologia e desenvolvimento da musculatura e a presença de estruturas especializadas como os acôncios. No entanto, caracteres de valor taxonômico, incluindo musculatura do esfíncter marginal e morfologia reprodutiva, estão sujeitos a reavaliações ou em alguns casos são difíceis de serem distinguidos, o que faz com que a utilização desses caracteres possa ser bastante problemática. (Daly *et al.*, 2007)

Cnidoma

O fato de as anêmonas apresentarem um pólipó bastante simples, aliado ao fato de ser um grupo rico em espécies, faz com que os taxonomistas de anêmonas tenham certa dificuldade para encontrar caracteres taxonômicos suficientes para serem utilizados na separação dos grupos. O que atrai para o uso de cnidas na separação dos grupos é que estas estruturas são uma das únicas características mensuráveis em um grupo cujos pólipos variam enormemente em suas dimensões (Fautin, 1988). A proposta inicial de que informações pelas cnidas eram de relevância taxonômica foi feita por Carlgren em 1900 (Fautin, 1988), e após a criação de um sistema taxonômico razoável por Weill (1934), Carlgren (1940) começou a utilizar essas informações em suas descrições. Desde então, as famílias de Actiniaria são definidas em parte pelo cnidoma (Carlgren, 1949) e uma descrição dos tipos e tamanhos de cnidas é indispensável para a descrição de espécies de anêmona-do-mar. Apesar da ordem Actiniaria apresentar apenas seis dos aproximadamente 25 tipos de nematocistos descritos para o filo Cnidaria, estas estruturas são de grande importância para a taxonomia do grupo (Fautin, 1988).

Originalmente, Weill (1934) dividiu os nematocistos em 16 categorias, mas seu sistema de classificação sofreu diversas mudanças desde então (*e.g.* Mariscal 1974; England 1991; Östman 2000). Schmidt (1972, 1974) criou uma nova proposta ao realizar um estudo detalhado dos nematocistos de Anthozoa levando em conta as variações dos arranjos dos espinhos na base do túbulo do nematocisto. Alguns autores recomendam que a classificação proposta por Schmidt (1972, 1974) seja utilizada para anêmonas Acontaria (Acuña *et al.*, 2003). No entanto, apesar da grande qualidade da classificação de Schmidt (1972, 1974), a terminologia de Weill, com suas subseqüentes modificações é a mais utilizada em trabalhos recentes de descrição de anêmonas, inclusive para as Acontaria (*e.g.* Rodriguez *et al.*, 2008; Gusmão, 2010). Segundo Östman (2000) a nomenclatura criada por Schmidt é bastante “racional”, mas causa confusão por utilizar sinônimos para nematocistos já bem conhecidos em outras nomenclaturas. Esta autora realizou a mais recente redefinição de categorias de nematocistos, baseando-se principalmente na classificação de Weill e nas posteriores modificações realizadas por Carlgren (1940, 1945), Cutress (1955), Mariscal (1974) e Calder (1977) *apud* (Östman, 2000).

Como sugerido por Weill (1934), as descrições atuais de cnidoma de anêmonas são feitas para cada uma das seguintes regiões do pólipó: tentáculos, coluna, actinofaringe, filamentos e especializações (acôncios, *acrorhagi*, etc.). Williams (1996, 1998, 2000) analisou o tamanho de nematocistos de anêmonas de cinco famílias para tentar determinar o número de medidas e os métodos estatísticos que seriam de melhor utilidade para a taxonomia. Porém, atualmente, para cada

tipo de nematocisto, têm sido informados apenas os seguintes atributos: número de nematocistos medidos, frequência com que foram encontrados, tamanho máximo e mínimo observado (amplitude de variação), média dos valores das medidas e número de animais que foram utilizados nessa análise (*e.g.* Rodriguez *et al.*, 2008; Reft *et al.*, 2009; Gusmão, 2010). Além disso, Fautin (1988) e Ardelean & Fautin (2004) sugerem que o taxonomista explicita em seu texto a forma com que amostrou os nematocistos medidos (de forma randômica ou direcionada). Os espirocistos, tipo de cnida exclusiva de Anthozoa, não são incluídos nestas descrições, mas alguns autores simplesmente registram sua presença (*e.g.* Rodriguez *et al.*, 2008).

O uso de informações qualitativas de nematocistos em descrições de espécies já está, a princípio, bem estabelecido, mas muitos autores discutem a importância dos dados quantitativos, referentes ao tamanho das cnidas. Presume-se que as cnidas tem seu crescimento determinado e, portanto só são reconhecidas depois de estarem prontas, e assim podem ter um tamanho mais ou menos fixo para uma determinada espécie. Esta característica é uma das principais justificativas para se usar as informações quantitativas sobre as cnidas (Fautin, 1988). No entanto, enquanto alguns autores observaram que o tamanho do nematocisto em um mesmo tecido tem tamanhos semelhantes (Ardelean & Fautin, 2004), outros registram a alta variabilidade nos tamanhos dos nematocistos entre indivíduos da mesma espécie (Acuña *et al.*, 2003). Sabe-se que o tamanho da cnida pode variar com a idade ou tamanho dos pólipos (Francis, 2004; Acuña *et al.* 2003) e com a variação em parâmetros ecológicos ou geográficos, como na profundidade ou latitude (Zamponi & Acuña, 1994). Como o tamanho das cnidas pode ser afetado por características intrínsecas ao indivíduo e pelas condições do hábitat, as informações quantitativas das cnidas são as que causam maior desconfiança entre os pesquisadores. Porém, existem outros problemas na utilização de cnidas como caráter taxonômico diagnóstico para táxons de Actiniaria.

O valor dos dados de distribuição qualitativa nos tecidos para definir espécies ou taxas superiores é constantemente questionado, pois se sabe que existem também fatores biológicos que podem afetar as categorias de cnidas que uma espécie ou indivíduo apresenta. Um exemplo disso é o nematocisto do tipo holótrico: algumas espécies são definidas pela presença deste nematocisto em seus tentáculos ou em estruturas especializadas. No entanto, Watson & Mariscal (1983) observaram que em *Haliplanella luciae* (= *Diadumene lineata*) eles aparecem em resposta a condições externas (agressão intra-específica), quando há formação dos *catch-tentacles*. Além disso, há diversos casos de presença de uma determinada cnida em somente parte de uma população (Fautin, 1988).

Outro ponto a ser considerado é o fato de que tantas modificações na classificação das cnidas levaram a conflitos na diagnose do cnidoma de alguns taxa. Além do mais, apesar de todos os sistemas de classificação de cnidas determinarem o tipo com base na morfologia do túbulo de cápsulas disparadas, para a maioria dos grupos, o cnidoma tem sido avaliado basicamente a partir

de cápsulas não disparadas de espécimes preservados, avaliando da melhor forma possível a morfologia da cnida, mas que pode também gerar erros de identificação. Fautin (1988) opina sobre a improbabilidade de que seja criado um sistema nomenclatorial para cnidas que expresse adequadamente a extrema variabilidade de formas, então o que ela sugere que pode ser feito nas descrições para minimizar esse problema é que as descrições tenham fotomicrografias de cada cnida.

Tantos impedimentos levam à conclusão de que não se deve dar um peso taxonômico muito grande para o cnidoma. Fautin (1988) coloca que espécies não devem ser reconhecidas com base somente em informações das cnidas. Segundo a autora, apesar de as cnidas terem valor taxonômico em grande parte dos grupos, é necessário que se conheça melhor as forças que afetam sua formação para que seu valor sistemático ou filogenético seja compreendido, e para que seu potencial como indicadores evolutivos sejam entendidos. Ardelean & Fautin (2004) reforçam a importância da descrição do cnidoma sobre outro aspecto. Opinam que se esta for feita de maneira cuidadosa, mesmo que um determinado tecido tenha muita variação e não possa ser usado para fins taxonômicos, ele pode carregar importantes informações sobre o desenvolvimento do animal ou de outros processos ontogenéticos.

Reprodução assexuada em anêmonas-do-mar

As anêmonas-do-mar são capazes de se reproduzirem de uma grande variedade de formas, sexuada e assexuadamente, e, para uma mesma espécie, a forma de reprodução pode variar entre populações diferentes (Chia, 1976). A reprodução sexuada em cnidários é bastante estudada, mas os processos deste tipo de reprodução podem ser bem menos significativos para a ecologia e evolução dos cnidários do que se acredita, já que em alguns ambientes a reprodução assexuada tem efeitos pronunciados tanto na população quanto na estrutura da comunidade (Clayton, 1985; Fautin, 2002). Assim, se pressupõe que a preferência de realizar a reprodução assexuada em ambientes pouco favoráveis à sobrevivência, em detrimento da sexuada, tem como motivo o envolvimento de menor gasto energético. Enquanto a reprodução vegetativa tem menor exigência de fatores ambientais específicos, os processos como a gametogênese, vitelogênese, fertilização, dispersão, etc. não somente exigem condições específicas, mas também é necessário que estas condições estejam espacial e temporalmente coordenadas (Shick, 1991). Uma das vantagens da reprodução assexuada é o fato de ser uma estratégia de crescimento populacional devido ao aumento da biomassa, apesar da diminuição do tamanho individual (Oliveira & Gomes, 2005). Existem quatro padrões de

reprodução assexuada nas anêmonas-do-mar: fissão longitudinal, laceração pedal, fissão transversal e brotamento (Figura 1).

Figura 1: Padrões de reprodução assexuada em anêmonas-do-mar. A: fissão longitudinal. B: laceração pedal. C: fissão transversal. D: brotamento. (A – C retirados de Shick, 1991; D retirado de Ruppert *et al.*, 2005).

Para o gênero *Diadumene*, estão descritas a reprodução por laceração pedal e por fissão longitudinal (Chia, 1976; Manuel, 1981). A laceração pedal ocorre de duas formas: por constrição ou por *tearing* (“rasgamento”). No primeiro caso, o animal se fixa ao substrato enquanto as margens do disco pedal se constroem em pequenos pedaços, que eventualmente se separam do disco. No segundo caso, algumas áreas marginais do disco pedal ficam firmemente aderidas ao substrato enquanto o animal se distancia lentamente, de tal forma que as partes firmemente aderidas são “rasgadas” do disco principal. Nas duas situações, os pedaços menores resultantes têm em geral de 1 a 10 mm de diâmetro, mas sempre contém ectoderme, endoderme e um pouco de mesoglêia. Esses lacerados sofrem, então, um processo de rearranjo até que se desenvolvam como indivíduos (Chia, 1976). Segundo Cary (1911), o desenvolvimento do lacerado é principalmente um processo de reorganização de tecido e não de síntese.

Já no caso da fissão longitudinal, no início a anêmona forma uma pequena fissura, que pode ser na extremidade aboral ou nos lados da coluna, e esta fissura vai se estendendo a todo o corpo, sempre paralela ao eixo oral-aboral do animal. A última região a se separar geralmente é o disco oral. A vantagem desse tipo de reprodução é que as anêmonas-filhas são grandes e capazes de realizar todas as funções que um adulto realiza. O animal pode inclusive se alimentar durante e logo após o processo, já que sempre apresenta boca, actinofaringe e cavidade gastrovascular, além de apresentar maior eficiência na colonização de novos ambientes (Chia, 1976). Fissão longitudinal é a forma de proliferação vegetativa mais difundida entre as anêmonas (Shick, 1991).

Stephenson (1928) acreditava que cada espécie de anêmona apresentasse no máximo uma forma de reprodução. No entanto, atualmente já se sabe que o padrão de reprodução assexuada pode variar entre populações diferentes de uma mesma espécie. Por exemplo, *Haliplanella luciae* (= *Diadumene lineata*) realiza tanto a laceração pedal quanto a fissão longitudinal; no entanto, esses dois processos não foram observados simultaneamente em um mesmo local (Minasian, 1976; Shick,

1991). Nessa espécie, a fissão longitudinal é a forma de reprodução mais comum e ocorre na situação de alta disponibilidade de recurso alimentar, o que permite não apenas a sobrevivência, mas também a colonização mais rápida de novos habitats do que poderia ocorrer se fosse utilizado qualquer outro método reprodutivo (Minasian, 1976). Já na espécie *Tricnidactis errans*, Pires (1988) observou tanto a ocorrência de laceração pedal quanto de fissão longitudinal, em campo, na Baía de Guanabara (RJ), e em laboratório, ao longo de vários anos. Segundo Shick (1991) as formas particulares de reprodução assexuada dentro de uma mesma espécie podem estar intimamente relacionadas às condições ambientais. Um exemplo são as anêmonas do sublitoral, que geralmente encontram melhores condições de crescimento do que as anêmonas de zona entre-marés, e, portanto, realizam predominantemente a reprodução por laceração pedal (Shick, 1991).

Diversos estudos em laboratório testando diferentes fatores foram realizados com o objetivo de compreender como uma determinada espécie reage em uma situação de estresse. Para *D. lineata* são conhecidos alguns dos fatores que controlam a frequência e a taxa de reprodução assexuada. Sabe-se até o momento que para essa espécie a taxa de fissão está diretamente relacionada à temperatura, aos períodos cíclicos de imersão e à frequência de alimentação (Minasian, 1976, 1979, 1982; Johnson & Shick, 1977; Minasian & Mariscal, 1979). Para *Metridium senile* o efeito da disponibilidade de alimento é o mesmo que para *D. lineata*, pois sua fissão é diretamente relacionada à velocidade da corrente, que também está correlacionada com a disponibilidade de zooplâncton (Shick e Hoffman, 1980) *apud* (Clayton, 1985). Já para uma anêmona Acontíria não identificada (posteriormente identificada por Minasian, 1982 como *Aiptasiogeton comatus*, cujo status é indefinido) e *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835) a alimentação diminui a frequência de reprodução assexuada respectivamente, por laceração pedal e por fissão longitudinal. Fica evidente então que não há um fator comum a todas as espécies que regule a fissão longitudinal (Smith & Lenhoff, 1976; Sebens, 1980) e pouco se sabe a respeito das diferenças de influência dos fatores entre espécies mais proximamente relacionadas, ou seja, dentro do mesmo gênero.

A plasticidade fenotípica é uma característica biológica necessária aos invasores já que organismos colonizadores devem ter a capacidade de suportar as novas condições ambientais, que provavelmente são diferentes das originais (Sakai *et al.*, 2001). Sabe-se que a colonização é altamente favorecida em espécies capazes de realizar autofertilização ou de se reproduzir assexuadamente (Sakai *et al.*, 2001). Além disso, uma das formas que podem ser utilizados para determinar o potencial de colonização e invasão de uma espécie é a quantificação de sua capacidade de reprodução em uma larga faixa de temperatura e salinidade (Ma & Purcell, 2005).

Beneti (2008) realizou alguns experimentos em laboratório com a espécie de *Diadumene* encontrada na Baía de Paranaguá e os fatores testados foram frequência de alimentação e temperatura. Ficou bastante claro que as anêmonas menos alimentadas se reproduziram menos que

as bem alimentadas, indo contra o que já havia sido registrado para *D. lineata*. Já com relação ao fator temperatura, as anêmonas que ficaram em água com temperatura mais alta se reproduziram com maior frequência que as que ficaram em água com temperatura mais baixa, o que, portanto, concorda com os trabalhos anteriores sobre o gênero *Diadumene*.

Deslocamento das anêmonas-do-mar

Poucos estudos foram realizados sobre o deslocamento de anêmonas, pois elas geralmente são consideradas animais sedentários. No entanto, como colocado por Hyman (1940), estes animais nunca estão permanentemente fixados. O trabalho de Parker (1917) foi um dos primeiros trabalhos publicados que era inteiramente dedicado ao que ele chamou de “locomoção pedal” nos actiniários. Segundo Parker (1917) e Hyman (1940), a grande maioria das anêmonas apresenta discos basais que se aderem ao substrato por uma secreção de muco e pela ação muscular. O deslocamento ocorre por ondas de contração muscular, principalmente do músculo basilar, que podem iniciar tanto da porção traseira do disco basal (lado oposto à direção do deslocamento) quanto da porção anterior. A possibilidade de o deslocamento iniciar da porção anterior ou traseira permite que as anêmonas não se desloquem apenas numa direção em relação a um determinado plano do pólip. Assim, para que o indivíduo mude a direção do deslocamento para qualquer lado não há necessidade de girar seu corpo (Parker, 1917).

Segundo Hyman (1940) se uma ou várias anêmonas forem observadas periodicamente, certamente serão notadas variações na posição destas no ambiente. Anêmonas geralmente se movem quando as condições não são favoráveis, mas mesmo sob condições desfavoráveis muitas espécies podem ficar no mesmo local por períodos muito longos. Williams (2003) coloca que uma das razões para o deslocamento é a busca de um substrato estável para proteção, alimentação e reprodução. Se as condições do habitat forem alteradas as anêmonas são forçadas a vagar até encontrar um novo substrato. No entanto, não se sabe se o substrato “novo” escolhido tem como fator atrativo suas características inerentes ou o ambiente que o circunda (Williams, 2003).

São conhecidas pelo menos quatro formas de locomoção entre as anêmonas-do-mar (Robson, 1976): “enterramento”, rastejamento sobre o disco pedal, deslocamento com o uso dos tentáculos e natação. A forma de deslocamento mais bem estudada é a última, realizada por anêmonas como *Stomphia coccinea* (Müller, 1776) (Robson, 1961) e *Bolocerooides* sp (Josephson & March, 1966), o que vai contra a idéia de que as anêmonas geralmente se movem de forma contínua e lenta (MacGinitie & MacGinitie, 1968). Esta é uma forma bastante curiosa de locomoção em anêmonas, no entanto, não é muito usual. As formas de deslocamento podem levar a dois tipos de

estratégias de deslocamento: (a) deslocamento de longo prazo ou migracional, e (b) deslocamento de curto prazo ou local. O deslocamento de longo prazo ocorre com o desprendimento total da anêmona de seu substrato, permitindo então que ela seja levada pela água até outro ponto de fixação. Há indicações de que juvenis e indivíduos em estágios pré-metamórficos utilizam o deslocamento de longo prazo como resposta aos fatores abióticos ou bióticos do meio, se dispersando por longas distâncias (Riemann-Zürneck, 1998) *apud* (Vidolin, 2007). Já o deslocamento de curto prazo é de poucos centímetros e provavelmente ocorre em poucos minutos (Rivadeneira & Oliva, 2001). Essa forma de deslocamento tem sido associada a respostas de escape frente a diversos fatores ecológicos, como agressões alogênicas (interclonal) (Francis, 1973), redução da competição interespecífica (Rivadeneira & Oliva, 2001) e pressão predatória (Dunn, 1977).

A informação existente na literatura com respeito ao deslocamento de espécies do gênero *Diadumene* é bastante escasso e o que foi encontrado são geralmente breves comentários sobre observações esporádicas. Parry (1952), por exemplo, comenta que nos indivíduos da espécie *D. neozelanica* o disco pedal é bastante móvel e os animais tendem a se mover no aquário por meio de atividades musculares. Parker (1917) testa o funcionamento da locomoção de quatro espécies de anêmonas, entre elas *Sagartia luciae* (= *Diadumene lineata*). Suas observações com relação à direção do deslocamento desses animais mostraram que, apesar de apresentarem simetria birradial, a direção do deslocamento das espécies poderia ser para qualquer lado, ou seja, a movimentação não tem necessariamente um ângulo constante em relação aos planos de seu corpo. O autor conclui ainda que a bilateralidade não tem, portanto, relação com a função locomotora, mas, provavelmente está relacionada com as funções de alimentação, excreção ou respiração.

Segundo Hyman (1940), muitas espécies de anêmonas apresentam respostas negativas à luz. Os indivíduos se afastam de locais iluminados e geralmente procuram cantos escuros. Porém, indivíduos de outras espécies parecem ter uma reação positiva à luz, se deslocando em direção a ela ou então simplesmente direcionando seu disco oral para o foco de luz. MacGinitie & MacGinitie (1968) colocam que a locomoção de *Diadumene* sp é inibida pela iluminação. Parker (1917) também observa o fototropismo negativo exibido por *D. lineata*, e coloca ainda que os movimentos dos animais da espécie podem ser facilmente controlados mudando-se a direção da fonte de luz. Segundo as observações de Parker (1917), as anêmonas testadas levaram de 10 a 15 minutos para responder ao estímulo e mudar sua direção, o que ocorria sem que o pólipó mudasse seu eixo. Hand (1956) concorda com ambos os autores quando coloca que *D. leucolena* parece evitar situações onde está diretamente exposta ao sol, sendo encontrada embaixo de rochas ou conchas de bivalves.

Material e Métodos

Coleta do material

A coleta dos espécimes estudados foi realizada no Iate Clube de Paranaguá ($48^{\circ}30'1.04''\text{O}$ $25^{\circ}30'54.73''\text{S}$), situado na foz do rio Itiberê, no interior da Baía de Paranaguá, no Paraná (Figura 2). Neste local a água é caracterizada por grandes variações de salinidade (12 - 29 no verão e 20 - 34 no inverno) e temperatura ($23 - 30^{\circ}\text{C}$ no verão e $18 - 25^{\circ}\text{C}$ no inverno), principalmente nas regiões mais internas (Lana *et al.*, 2001). Trata-se de uma região bastante eutrofizada principalmente devido à liberação do esgoto da cidade de Paranaguá. O Iate Clube localiza-se próximo ao Porto de Paranaguá, que recebe diariamente navios de diversos países, o que torna a região suscetível à introdução de espécies marinhas exóticas (Neves, 2006).

Figura 2. Localização da Baía de Paranaguá no estado do Paraná, Brasil, indicado pela seta. Estrela indica localização do Iate Clube de Paranaguá.

A estrutura principal do clube é construída em concreto, com colunas que sustentam três passarelas de acesso às embarcações (Figura 3A). A partir destas passarelas, rampas dão acesso aos 22 flutuadores constituídos de fibra de vidro e recobertos na parte superior por madeira (Figura 3B). As anêmonas foram encontradas sobre cracas e bivalves que estavam fixados nas colunas de concreto (Figura 3C-D) ou em materiais submersos, como cordas colocadas no local para os experimentos referentes ao projeto realizado por Altvater (2009). Três meses antes de cada coleta

foram colocados substratos artificiais (garrafas plásticas) em doze pontos de um dos píeres, sendo que em quatro deles era conhecida a existência de anêmonas. A intenção era que estes substratos fossem colonizados por anêmonas, permitindo a constatação de que os clones utilizados teriam aproximadamente o mesmo tempo de vida. No entanto, em nenhuma das coletas foram encontradas anêmonas sobre estes substratos. E, devido à limpeza das colunas realizada pelos funcionários do Iate Clube entre a primeira e a segunda coleta, os locais com anêmonas acessíveis para a coleta diminuiu e, portanto, o material acabou sendo retirado sempre de um mesmo flutuador.

Figura 3. A: Colunas de concreto que sustentam as passarelas do Iate Clube com incrustação de cracas e bivalves. B: Estrutura flutuante do Iate Clube de Paranaguá, em cujas extremidades estão presas as cordas de onde são retirados os bivalves e cracas. C: Bivalves com anêmonas epibiontes. D: Cracas com anêmonas epibiontes.

Foram realizadas cinco coletas nas seguintes datas: 21/08 e 23/10 de 2009; 22/02, 24/05 e 23/08 de 2010. Em todas as datas, a triagem do material foi realizada logo após a coleta, já que em coletas anteriores já se havia constatado que os animais chegavam em piores condições ao laboratório caso fossem transportados junto com as cracas e os bivalves. Cerca de duzentos espécimes foram coletados em cada data e o tempo decorrido entre a coleta e o transporte dos animais até o laboratório variou entre um e dois dias. Neste período, os animais foram mantidos em recipientes com água do local, que era parcialmente trocada a cada 5 horas, e aeração constante.

Após o transporte até a sala de cultivo do Laboratório de Cultivo e Estudos de Cnidaria, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, os animais foram separados da seguinte forma:

- 5 a 15 espécimes para taxonomia;
- 120 espécimes para experimentos de tolerância a diferentes salinidades e tempo de exposição ao ar;
- 30 espécimes para o experimento de luminosidade.

Aproximadamente 10 dias depois de cada coleta iniciou-se uma bateria de experimentos. Os procedimentos de taxonomia e os experimentos foram repetidos cinco vezes, sendo cada vez com anêmonas de coletas diferentes.

Procedimentos para taxonomia

O levantamento das descrições de todas as espécies do gênero *Diadumene* foi realizado e as informações obtidas foram compiladas em uma tabela comparativa, com o objetivo de permitir a interpretação e análise dos caracteres observados nos espécimes coletados. Além das características das nove espécies do gênero, incluiu-se na tabela as informações referentes à *Diadumene* sp registrada por Pinto (2002) na costa brasileira.

A identificação do material foi realizada através do estudo de caracteres de morfologia externa, interna, elementos musculares e cnidoma. A morfologia externa foi observada primeiramente em espécimes *in vivo*, logo após as coletas, e em espécimes fixados, todos em microscópio estereoscópio. Foram observados todos os caracteres relevantes para a taxonomia do grupo, como a divisão da coluna em diferentes regiões, presença e posição das cínclides, disposição dos tentáculos, etc. Esses caracteres foram analisados minuciosamente nos 15 espécimes de cada coleta.

Todos os espécimes fixados foram submetidos a um processo prévio de anestesia com Cloreto de Magnésio 7,5 - 8% antes da fixação em formol 4%. Observou-se que os pólipos ficavam mais distendidos quando colocados em recipientes pequenos (aproximadamente 3 cm de diâmetro x 8 cm de altura) com 3 a 5 espécimes, em água marinha natural, dispostos em locais iluminados (parapeito de janela ou luz artificial incidindo diretamente sobre o recipientes). Quando os animais estavam bem distendidos, adicionava-se lentamente, com uma pipeta, duas gotas da solução do anestésico na superfície da água, evitando gerar movimentos na água que fizessem com que os pólipos se contraíssem. Esse procedimento foi repetido de 15 em 15 minutos ao longo de 2 horas. Após a 2ª hora, adicionou-se de 10 a 15 gotas de anestésico ao recipiente, ainda com uma pipeta, e os espécimes foram deixados assim por até 6 horas para completar o processo de anestesia. Depois desse período, confirmava-se se os espécimes estavam devidamente anestesiados, estimulando-os com uma pinça para observar eventuais contrações do pólipo. Caso fosse observada a resposta de algum dos animais ao estímulo, adicionava-se outras 5 a 10 gotas ao frasco e esperava-se mais 2

horas. Se nenhum animal do recipiente respondesse ao estímulo, a água com o anestésico era retirada, e o recipiente era diretamente preenchido com formol 4%.

Para a observação da anatomia interna e dos elementos musculares foram confeccionadas lâminas histológicas de um ou dois espécimes por coleta, que foram fixados em formol 4% por no mínimo um mês antes da confecção das lâminas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mallory. O procedimento para a preparação das lâminas com cortes histológicos está no Anexo 1. Os cortes histológicos foram observados sob microscópio óptico, e os caracteres observados incluíam a presença ou ausência de esfíncter, número e disposição dos mesentérios, e o tipo de musculatura retratora, circular, parietal e basilar.

Por fim, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes para a observação e descrição do cnidoma da espécie. Até uma semana após as coletas foram confeccionadas lâminas, utilizando espécimes vivos, para que fosse feita a correta identificação dos tipos de nematocistos encontrados nos tentáculos e nos acôncios. Para que os nematocistos disparassem, adicionou-se um pouco de saliva nas lâminas antes da realização do esfregaço. Já para os espécimes fixados, foram confeccionadas lâminas de dois ou três espécimes por coleta para cada uma das seguintes regiões do pólip: tentáculos, capítulo, escapo, actinofaringe, filamentos e acôncios. A observação foi feita por varredura da lâmina, e todos os nematocistos encontrados no campo eram identificados e medidos até que se chegasse a 20 nematocistos medidos de cada tipo. Não foi possível montar lâminas para todas as regiões do pólip para cada espécime devido a dificuldades no manuseio do material. Além disso, apenas alguns tipos de nematocistos de cada parte do corpo eram encontrados em número suficiente para que fossem realizadas 20 medidas.

A nomenclatura utilizada para os nematocistos é de acordo com o sistema de classificação de Weill (1934), com as modificações de Carlgren (1940, 1945), Cutress (1955), Mariscal (1974), Calder (1977) *apud* (Östman, 2000), que foram compiladas e ainda modificadas por Östman (2000), já que essa é a nomenclatura utilizada nos mais recentes trabalhos taxonômicos de Actiniaria (*e.g.* Rodriguez *et al.*, 2009; Gusmão, 2010). Espécimes da espécie foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) (Anexo 2).

Procedimentos para análise de dados moleculares

A análise molecular da espécie encontrada em Paranaguá foi realizada por Sérgio N. Stampar e Maximiliano M. Maronna no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Zoologia do IBUSP. Os procedimentos aqui descritos foram adaptados de Rodriguez *et al.* (2011). O DNA foi extraído usando-se o kit de extração Agencourt® DNAdvance™, uma tecnologia de

partículas magnéticas que isola o DNA genômico dos tecidos. Utilizou-se 2 mm de coluna do pólopo e tentáculos de um espécime, e esse material foi macerado em um tubo de PCR de 200µl. O protocolo original foi utilizado para os passos subsequentes.

O gene mitocondrial 16S rRNA foi amplificado usando PCR, e depois purificado com AMPure® (Agencourt®). Foram empregados o iniciador 5' B1 (5' - TCGACTGTTTACCAAAAA CATA - 3') e o iniciador 3' CB2 (5' - ACGGAATGAACTCAAATCATGTAAG - 3') (Cunningham & Buss, 1993) foram utilizados para amplificar o fragmento alvo do DNA mitocondrial. Para o sequenciamento de DNA foram utilizados BigDye® Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) e os mesmo primers do PCR em um Sequenciador ABI PRISM®3100 (Hitachi).

Para a análise do DNA, a sequência obtida foi comparada com as disponíveis no GenBank das espécies *D. cincta* e *D. luciae* (Tabela 1). As sequências foram observadas para que fossem determinados os sítios ambíguos, e depois foram ajustadas em GENEIOUS™ 5.3.4 e alinhadas em *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) implementado em BioEdit© (Hall, 1999). O modelo de dois parâmetros de Kimura para substituição de bases foi utilizado para calcular as distâncias genéticas no software MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) e os resultados foram contrastados com os mesmos procedimentos, só que com a utilização do GENEIOUS™ 5.3.4.

Tabela 1: Número das sequências do GenBank e referências das espécies utilizadas para a comparação molecular

Gênero	Espécie	16 S	Referência
<i>Diadumene</i>	<i>cincta</i>	EU190769.1	Daly <i>et al.</i> , 2008
<i>Diadumene</i>	<i>lineata</i>	EU190774.1	Daly <i>et al.</i> , 2008

Procedimentos para experimentos de tolerância a diferentes salinidades e tempos de dessecação

Os procedimentos de preparação para os experimentos que testaram a tolerância a diferentes salinidades e tempos de dessecação são comuns. Devido a correções que foram feitas no manuseio dos animais a partir do segundo experimento, o primeiro experimento foi considerado um piloto, e, portanto, não teve seus resultados analisados. Os 120 espécimes separados para esses experimentos foram colocados individualmente em placas circulares de poliestireno de dimensões 60 (diâmetro) x 15 mm (altura), numeradas de 1 a 120 (Fig. 4). A partir deste momento até o fim desses experimentos, esses animais foram mantidos no escuro, em uma câmara com temperatura controlada (25°C +/- 1°C), e foram alimentados semanalmente com náuplios de artêmias.

Figura 4. A: Placas utilizadas para os experimentos de reprodução e tolerância a dessecação, cada placa continha uma anêmona. B: Placa de poliestireno utilizada no experimento.

Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de oito dias de aclimação, com o objetivo de que os indivíduos fossem gradativamente submetidos à água artificial de salinidade 30‰ que seria utilizada nos experimentos. A troca de água dos recipientes foi realizada da seguinte forma: dia 1, 100% de água do local de coleta; dias 2 a 4, 50% água do local de coleta e 50% de água artificial 30‰ de salinidade; dias 5 a 8: água 100% artificial 30‰ de salinidade.

Todas as placas foram observadas diariamente durante os oito dias de aclimação e caso fosse observada a presença de mais de uma anêmona por placa, decorrente de fissão longitudinal, a menor das anêmonas era retirada. No último dia do período de condicionamento, foi medido o diâmetro maior e menor do disco pedal de todos os espécimes de forma a estimar o tamanho de cada anêmona. Foram separadas as 96 placas que seriam usadas nos experimentos. Esta seleção excluiu as anêmonas que não estivessem fixadas na placa e espécimes muito grandes ou pequenos, baseando-se no valor médio entre o diâmetro maior e menor do disco pedal de cada espécime. Os indivíduos restantes foram separados de forma casual em dois grupos de 48 anêmonas, um grupo para cada experimento.

Tolerância à variação brusca de salinidade

As 48 placas deste experimento foram separadas em 6 grupos de 8 placas, totalizando 8 anêmonas por tratamento e todos os animais estavam, inicialmente, em água com salinidade 30‰. Em seguida, cada grupo de placas foi colocado, por 2 horas, em água artificial com uma das seguintes salinidades (tratamentos): 45, 25, 15, 5 e 0 ‰. O último grupo foi mantido em água com salinidade 30‰, constituindo o grupo controle. Após o período de 2 horas as placas foram colocadas novamente na salinidade inicial (30‰), na qual eram mantidas até o fim do experimento. A reprodução assexuada dessas anêmonas foi acompanhada por 30 dias e foram realizadas contagens diárias do número de indivíduos presentes em cada placa. Quando houvesse mais de um indivíduo na placa, o evento de fissão longitudinal era registrado e o menor dos espécimes retirado.

Todos os animais foram alimentados semanalmente com náuplios de artêmias, e no dia seguinte à alimentação, a água era trocada. Caso houvesse morte de um indivíduo, o que era nitidamente observado pelas condições do pólip, a placa era retirada do experimento e contabilizava-se um evento de morte. Os dados obtidos foram passados para duas planilhas: uma com relação à reprodução e outra à mortalidade. Estes procedimentos estão resumidos na Figura 5.

Esse experimento foi realizado independentemente com anêmonas das quatro últimas coletas. Para testar se o número de eventos de fissão longitudinal e morte de anêmonas varia com as diferentes salinidades foi usado o teste de Modelos lineares generalizados mistos (Generalized linear mixed models, GLMM, McCullagh & Searle, 2000) implementado no programa R 2.1.1 (R Development Core Team, <http://www.r-project.org>). Foi utilizada a função `glmmML`, e fixou-se os experimentos (2 a 5) assumidos como variável aleatória. Foi utilizada uma distribuição binária para análise dos dados, ou seja, ainda que um mesmo indivíduo tenha se reproduzido mais que uma vez ao longo dos 30 dias de experimento, para a análise estatística contou-se apenas o fato de ele ter ou não realizado fissão. Foram criados modelos univariados e foi calculado o poder explicativo de cada modelo considerando um alfa de 0.05.

Tolerância à exposição ao ar (dessecação)

As 48 placas deste experimento também foram separadas em 6 grupos de 8 placas, totalizando 8 anêmonas por tratamento. Todos os animais estavam, inicialmente, em água com salinidade 30‰ e, em seguida, o conteúdo de água das placas era esvaziado e cada grupo foi exposto ao ar por um dos seguintes períodos de tempo (tratamentos): 0 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 1 hora, 2 horas e 6 horas. No grupo “0 minutos” foi retirada a água das placas, mas em seguida já se adicionou novamente água na placa. Depois de passado o período dessecação em cada um dos grupos, novamente adicionou-se água às placas na concentração inicial (30‰) e os indivíduos foram mantidos nessas condições até o fim do experimento. A reprodução e a mortalidade das anêmonas foram acompanhadas por 30 dias, todos os animais foram alimentados semanalmente com náuplios de artêmias, e no dia seguinte à alimentação, a água era trocada. Estes procedimentos estão resumidos na Figura 5.

E, assim como no experimento de salinidade, esse experimento foi realizado independentemente com anêmonas das quatro últimas coletas. As análises destes experimentos também foram realizadas utilizando-se modelos lineares generalizados mistos (GLMM), com o objetivo de testar se o número de eventos de fissão longitudinal e morte de anêmonas varia com os diferentes tratamentos de tempo de exposição ao ar.

Figura 5. Resumo dos procedimentos adotados nos experimentos de tolerância a salinidade e exposição ao ar.

Procedimentos para experimentos de deslocamento com relação à luminosidade

Os 30 espécimes foram separados em 2 aquários cúbicos de vidro, denominados A e B, de dimensões 25 x 15 x 20 cm, que foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (19°C) e iluminação artificial constante. As anêmonas de ambos os aquários passaram por um período de acondicionamento, com trocas de água realizadas da mesma forma que nos experimentos de tolerância a diferentes salinidades e tempos de dessecação. No último dia deste período, foram retiradas anêmonas dos aquários de modo que só restassem dez anêmonas em cada uma deles. Estas que restavam deveriam estar, necessariamente, fixadas no fundo no aquário.

Na parte externa da base de ambos os aquários fixou-se papel milimetrado para fazer a delimitação de quadrantes de 1 x 1 cm, totalizando 375 quadrantes por aquário. O aquário A foi mantido desta forma, tendo apenas a sua base recoberta, e, portanto, constituiu o aquário de tratamento “Claro”. Já o aquário B foi totalmente recoberto nas laterais e no topo por cartolina preta envolta por um papel adesivo, fazendo com que o interior do aquário fosse inteiramente escuro. Da superfície superior do aquário B, em um dos cantos, foi recortado um pequeno retângulo, de 3 x 4

cm, que permitia a entrada de luz, de forma que uma pequena região (de 3 a 4%) bem delimitada do fundo do aquário estivesse iluminada. Este era, portanto o aquário de tratamento “Escuro”. Sobre ambos aquários foi colocada uma lâmpada “fria”.

A posição das anêmonas nos aquários foi registrada por fotografias de vista “aérea” tiradas com câmera digital desde o “Dia 0”, em que ocorreu o procedimento descrito anteriormente, até o “Dia 30”, último do experimento, permitindo que fosse realizado um acompanhamento diário do deslocamento das anêmonas. Os aquários foram fotografados todos os dias aproximadamente no mesmo horário (± 2 horas), o que resultou em 31 fotografias para cada tratamento.

Para cada fotografia foi registrado o quadrante ocupado por cada anêmona a cada um dos 31 dias. Observando a sequência de fotos, foi possível saber se cada anêmona mudou de quadrante de um dia para o outro, ou seja, se elas se deslocaram. Portanto, o deslocamento diário de cada anêmona poderia ser maior ou igual a zero quadrante, onde zero é não haver nenhum deslocamento.

Como o objetivo era medir apenas o deslocamento por deslizamento das anêmonas, caso uma determinada anêmona fosse encontrada solta no aquário em um determinado dia, as consequências seriam que o deslocamento dela no dia seguinte seria igual a zero e esse dia não seria considerado no cômputo final de seu deslocamento. Isso significa que se uma anêmona foi encontrada solta uma ou três vezes ao longo dos 30 dias, isso equivale a, respectivamente, 29 e 27 dias de observação. Por esse motivo, a análise dos valores de deslocamento de cada anêmona, após o fim dos experimentos, foram dados por um deslocamento médio diário em vez de número total de quadrantes ao longo de 30 dias.

Os resultados foram analisados de duas formas: a) deslocamento das anêmonas no aquário A x aquário B; e b) dentro do aquário B, deslocamento em direção à região iluminada x contra a região iluminada. Esse experimento foi realizado, independentemente, com anêmonas das cinco coletas, sendo que as repetições foram denominadas Experimento 1, 2, 3, 4 e 5. Cada experimento foi analisado individualmente. Estes procedimentos estão resumidos na Figura 6.

A comparação dos tratamentos Claro (aquário A) X Escuro (aquário B) foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Sokal & Rohlf, 1981), para dados não-pareados. Já a análise da comparação do deslocamento a favor ou contra a luz foi realizado utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados. Em ambos os casos, o objetivo era testar se havia diferença entre os valores de deslocamento observados nos dois tratamentos. A hipótese nula é que não há diferença significativa entre os valores de deslocamento nos dois tratamentos; e a hipótese alternativa é que valores de deslocamento observados nos dois tratamentos são diferentes.

Figura 6. Resumo dos procedimentos adotados nos experimentos de deslocamento.

Resultados

Análise taxonômica

As informações presentes nas descrições das nove espécies de *Diadumene* foram sumarizadas em tabelas comparativas, juntamente com as informações referentes à *Diadumene* sp registrada por Pinto (2002) para a costa brasileira. As características de morfologia, externa e interna, levantadas das espécies foram baseadas nos seguintes trabalhos: *D. schilleriana* em Stoliczka (1869); *D. neozelanica* em Carlgren (1924) e Parry (1952); *D. crocata* em Parry (1952); *D. kameruniensis* em Carlgren (1927); *D. cincta* em Stephenson (1925) e Manuel (1981); *D. leucolena* em Hand (1956) e Carlgren (1950); *D. franciscana* em Hand (1956); *D. lighti* em Hand (1956); *D. lineata* em Hand (1956), Verrill (1898), Manuel (1981) e Pinto (2005). A presença de *catch-tentacles* em determinadas espécies está baseada também em Williams (1975).

As informações encontradas nas descrições referentes à coloração das diferentes partes do pólipos, em sua maioria, não foram consideradas relevantes para a separação das espécies, já que foi observado que uma mesma espécie podia apresentar grandes diferenças de coloração entre populações diferentes e até dentro de uma mesma população (e.g. *D. lineata* e *D. leucolena*, em Hand, 1956). Além disso, algumas espécies foram descritas a partir de material de espécimes já fixados (e.g. *D. kameruniensis* e *D. neozelanica*), impossibilitando que o autor do trabalho incluísse uma correta descrição deste tipo de característica. Portanto, optou-se por incluir na Tabela 2, de forma simplificada, apenas as informações referentes à coloração da coluna, o que pode ajudar um pouco na caracterização de cada uma das espécies.

Foi incluída também uma tabela com informações das dimensões dos pólipos (Tabela 8), o que também consiste em um tipo de caráter que não deve ser totalmente levado em conta para a definição de qualquer uma das espécies, já que alguns autores relataram, em suas observações, uma grande variação de tamanho entre pólipos de uma mesma espécie, e até de uma mesma população (e.g. *D. lineata* e *D. leucolena*, em Hand, 1956). Além disso, enquanto alguns autores apresentaram informações de pólipos distendidos (e.g. Hand, 1956), outros só puderam medir pólipos contraídos ou fixados (e.g. Carlgren, 1927).

Uma última consideração a ser feita é que *D. crocata* foi excluída da descrição de morfologia interna (Tabelas 5, 6 e 7), pois sua descrição não contempla nenhum caráter desse tipo. Informações mais detalhadas a respeito de cada espécie podem ser encontradas nas bibliografias consultadas e listadas anteriormente.

Tabela 2: Comparação da morfologia externa das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelanica</i>	<i>D. crocata</i>	<i>D. kamerunensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolela</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Região do pólip/característica										
Disco Pedal										
Bem desenvolvido/aderente	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Fracamente aderente					X			X		
Contorno circular	X					X		X	X	X
Contorno alongado					X			X		
Contorno Irregular	X						X	X		
Ultrapassa diâmetro da coluna	X	X	X		X	X		XXX	X	X
Coluna										
Forma variável	X	X			X	X	X	X	X	
Divisão e proporção capítulo/escapo	X	X	X	X	X	1/4 a 1/3	1/3	1/5	1/3 a 1/2	X
Colarinho	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X
Margem tentaculada	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Baterias de nematocistos no escapo							X			
Inserções dos mesentérios (IM) visíveis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IM formando listras brancas			X			X				
IM formando listras escuras	X								X	
Coloração da coluna										
Coloração variada	X					X	X		X	X
Com ou sem listras longitudinais							X		X	
Transparente/translúcido	X				X	X	X	X	X	X
Alaranjado					X	X		X	X	
Amarelo			X							X
Branco						X			X	
Cinza							X		X	
Marrom			X						X	X
Rosa						X		X		
Verde	X						X		X	
Pálido	X		X		X	X	X	X		

Tabela 3: Comparação da morfologia externa das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelanica</i>	<i>D. crocata</i>	<i>D. kameruniensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leuocolena</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Região do pólipó/característica										
Cíclides										
Capítulo				o	o	o	o		o	
Escapo	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Numerosas		X			X	X				
Conspícuas	O	O		X	X	X	o	o	X	
Em papilas ou elevações				X		X				X
Fileiras longitudinais				X		X				X
Espalhadas	X	X			X	X		X	X	
Faixa no topo do escapo							X			
Pontos escuros					X					
Endoceles				X	X	X	X	X	X	
Exoceles						X	o	X		
Evaginações não-perfuradas								X		
Disco Oral										
Circular			X		X		X	X		X
Oval	X									
Área s/ tentáculos reduzida		X		X	X	X	o			
Área s/ tentáculos ampla (pelo menos 1/2)						o	X	X		
Inserção de mesentérios visíveis	X				X		X	X	X	X
Diâmetro pode ser maior que o da coluna	X		X		X	X			X	
Cor igual à da coluna		X			X	X		X		
Boca										
Saliente	XX					XX			X	
Grande	X									
Pequena			X							
Em forma de fenda	X		X				X	X		X
Pregueada	XXX				XX	XXX	X		X	X

Tabela 4: Comparação da morfologia externa das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

Região do póipo/característica	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelanica</i>	<i>D. crocata</i>	<i>D. kameruniensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolena</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Tentáculos										
Número	160	160 a 200		192	até 200	48 a 200		6 a 107	96	
Longos	X	X			X	X	X		X	X
Curto								X		
Finos										
Cônicos ("tapering")	X			X	X	X	X-	X	X	X
Com poros nas pontas	X				X					
<i>Catch-tentacles</i>	X	X		X	X	X	o	o	X	X
Tentáculos bifurcados ("forked")								X		
Algas na endoderme						X				
Retráteis					XX	X	X	o	XX	X
Musculatura ectodérmica presente					XX		X		X	X
Disposição dos tentáculos										
Regular e hexâmera	X					X	X		X	X
Irregular com tendência a hexâmero					X		X	X	X	
3 ciclos										
4 ciclos	X					X		X	X	
5 ciclos	X				X	X	X	X		X
5 ou mais ciclos						X	X	X		X
6 ciclos						X				
6o ciclo pode estar incompleto					X		X			
7o ciclo pode estar incompleto						X				
Ciclo interno mais longo		X		X		X		X		
1 par de tentáculos diretivos										
Diretivos deslocados para dentro							X			
Diretivos mais longos que os demais									X	

Tabela 5: Comparação da morfologia interna das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

Região do pólio/característica	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelânica</i>	<i>D. kameruniensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolela</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene sp</i>
Disposição dos mesentérios									
Arranjo regular hexâmoro			X		X		X		X
Arranjo irregular		X				X		X	
2 ordens							X		
3 ordens		X	X	X	X		XX	X	
4 ordens		X			X	X	X	XX	X
5 ordens	X								
Mais ordens na porção distal				X	X	X	X	X	X
Mesentérios perfeitos									
3 pares								X	
4 pares						X		X	
5 pares						X	X	X	
6 pares	X	X	X	X	X	XX	XX	XX	X
7 a 9 pares		X				X	X	X	
10 pares							X		
Mesentérios diretivos									
0 pares								X	
1 par						X	X	X	
2 pares		X	X	XX	X	XX	XX	XX	
3 pares						X	X	X	
Sifonoglifes									
0								X	
1				X		X	X	X	
2	X	X	XX	X	X	XX	XX	X	
3						X	X	X	

Tabela 6: Comparação da morfologia interna das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

Região do pólopo/característica	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelânica</i>	<i>D. kamerunensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolela</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Actinofaringe									
Longa	X	X				X			
Curta							X		
Pregueada		X	X	X				X	X
Algas simbiotes					X/o				
Parede espessa e ciliada						X		X	X
Gônadas									
Nos mesentérios de 1a ordem	X	X		X	X	X	X	X	
Nos mesentérios diretivos	X	X		X		X	X	X	
Nos mesentérios de 2a ordem		X		X	X	X	X	X	
Em alguns mesentérios da 3a ordem		X		X					
Outras variações								X	
Em todos os mesentérios									X
Nos mesentérios mais desenvolvidos				X					X
Acôncios									
Bem desenvolvidos	X		X	X	X	X			
Numerosos	X		X		X	X		X	
Nos mesentérios de 1a ordem						X	X		
Nos mesentérios de 2a ordem						X	X		
Nos mesentérios de 3a ordem						X			
Nos mesentérios mais desenvolvidos				X					
Filamentos									
Nos mesentérios de 1a ordem		X							
Nos mesentérios de 2a ordem		X							
Nos mesentérios de 3a ordem		X							
Nos mesentérios mais desenvolvidos				X					

Tabela 7: Comparação da morfologia interna das espécies de *Diadumene*. “X” indica presença. “XX” indica característica conspícua ou reforçada. “o” indica ausência.

Região do pólipos/característica	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelânica</i>	<i>D. kameruniensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolela</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene sp</i>
Musculatura retratora									
Bem desenvolvido	X	X	X		X	X	X	X	X
Razoavelmente desenvolvido							X		
Restritos					X	X	X		X
Difusos	X	X	X			X	X	X	X
Circunscrito	X		X					X	
Mes. de 1ª ordem		X	X		X		X	X	
Mes. de 2ª ordem		X	X		X		X	X	
Todos os ciclos	X							X	
Musculatura parietobasilar	X								
Bem desenvolvido									
Pouco desenvolvido		X	X		X	X	X	X	X
Musculatura basilar									
Presente		X	X	X		X	X	X	
Bem desenvolvido								X	
Pouco desenvolvido		X	X		X	X	X		X
Musculatura circular									
Presente	X	X	X					X	
Bem desenvolvido							X	X	
Pouco desenvolvido		X	X						

Tabela 8: Comparação das dimensões dos pólipos das espécies de *Diadumene*.

Região do pólipo/característica	<i>D. schilleriana</i>	<i>D. neozelânica</i>	<i>D. kameruniensis</i>	<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolena</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Disco Pedal									
Diâmetro (expandido)					0,8 cm	2,0 cm	0,8 cm	2,2 cm	0,2 a 0,5 cm
Coluna									
Altura (expandido)		1,5 a 2,0 cm			3,0 cm	4,0 cm	3,7 cm	3,1 cm	
Altura (contraído)			1,2 cm*						0,3 cm
Diâmetro (expandido)		0,8 - 1,5 cm		1,0 cm	0,5 cm	1,8 cm			
Diâmetro (contraído)			1,0 cm*						0,3 cm
Diâmetro capítulo (expandido)							0,2 cm	1,5 cm	
Diâmetro escapo (expandido)							0,4 cm	1,8 cm	
Disco Oral									
Diâmetro								0,1 a 0,5 cm*	0,2 a 0,4 cm*
Tentáculos									
Comprimento	2,5 cm	0,3 cm			até 2,0 cm			0,6 a 1 cm**	
Coroa de tentáculos									
Diâmetro (expandido)					2,0 cm	2,5 cm	0,9 cm	3,5 cm	

* indica que os espécimes medidos estavam fixados. ** Informação acrescentada e baseada em Verrill (1898).

Para as espécies *D. kameruniensis*, *D. crocata*, *D. neozelanica* e *D. schilleriana* só há informações anatômicas e/ou microanatômicas gerais de morfologia externa e interna. Para as demais espécies, cujos cnidomas foram descritos, as a distribuição das cnidas foi dividida segundo as partes do corpo da anêmona: tentáculos, coluna (que pode ser dividida em capítulo e escapo), actinofaringe, filamentos e acontia. O cnidoma das espécies *D. leucolena*, *D. franciscana*, *D. lighti* e *D. lineata* estão baseados na descrição realizada por Hand (1956). Já o de *D. cincta* está baseado na descrição de Carlgren (1940).

Carlgren (1940), na descrição do cnidoma de *D. cincta*, separou os nematocistos encontrados nos *catch-tentacles* dos encontrados nos demais tentáculos. No entanto, na Tabela 9, os valores destas duas regiões foram mesclados, incluindo-se na amplitude de variação os valores encontrados em ambas as regiões, para facilitar a comparação com as demais espécies. Stephenson (1928) apresenta uma descrição de cnidoma para a espécie, no entanto, esta é bastante confusa, já que, na época em que o trabalho foi realizado, as definições dos tipos de nematocistos estavam pouco estabelecidas. Já Manuel (1981) comenta somente a respeito dos nematocistos encontrados nos acônios e de um dos tipos encontrados nos tentáculos.

Para *D. leucolena* foram encontrados os trabalhos de Carlgren (1950) e Hand (1956) que apresentavam descrições do cnidoma. Em seu trabalho, Carlgren (1950) relata suas dificuldades para analisar o material da espécie ao qual teve acesso, e, sugere que a descrição seja refeita utilizando-se material fresco (não fixado) para identificações dos tipos de nematocistos. Por esse motivo, optou-se por basear a descrição do cnidoma da espécie em Hand (1956), que além de utilizar material fresco, evidenciou as diferenças encontradas por ele e Carlgren no cnidoma de algumas das regiões do pólip. A comparação entre as duas descrições está no Anexo 3.

Apesar de Pinto (2002) ter apresentado uma descrição bastante completa de *H. lineata* (= *D. lineata*) encontrada no litoral brasileiro, optou-se por utilizar a descrição de Hand (1956) na comparação com as demais espécies. Pinto (2002) baseou-se na nomenclatura proposta por Schmidt (1972, 1974) para definir os tipos de nematocistos, o que gerou certa dificuldade em compreender o que foi observado pela autora em determinados tecidos. No entanto, ambos os trabalhos apresentam poucas diferenças. Carlgren (1945) relatou ter dificuldades em determinados aspectos da identificação dos nematocistos por estar trabalhando somente com material fixado, e Manuel (1981) descreve apenas os nematocistos encontrados nos acônios da espécie. Finalmente, a comparação entre as quatro descrições referidas acima poder ser encontrada no Anexo 4.

Tabela 9: Comparação da distribuição e tamanho dos nematocistos das espécies de *Diadumene*.

Espécie		<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolena</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Tecido / Tipo de cnida		Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)
Tentáculos	Átrico	31.0 - 38.0 x 7.0 - 9.0					
	Holótrico	23.0 - 31.0 x 4.0 - 6.5					
	Basítrico	12.0 - 27.0 x 1.5 - 2.5	13.0 - 22.0 x 2.0 - 3.0	14.0 - 19.0 x 2.5 - 3.0	7.5 - 18.5 x 1.5 - 2.0	10.5 - 19.5 x 1.0 - 1.5	12.5 - 22.0 x 2.2 - 3.0
	Microbásico p-mastigóforo	22.0 - 31.0 x 3.0 - 4.5		24.5 - 36.5 x 3.5 - 5.5	18.0 - 30.5 x 3.0 - 4.5	18.5 - 27.0 x 3.5 - 4.5	18.0 - 31.0 x 3.0 - 4.5
	Microbásico p-mastigóforo	9.0 - 14.0 x 3.0 - 4.5					
	Microbásico p-amastigóforo	22.0 - 24.0 x 3.5 - 4.0	18.5 - 30.5 x 3.5 - 4.5	24.5 - 36.5 x 3.5 - 5.5		9.5 - 14.5 x 3.5 - 4.5	
	Macrobásico p-amastigóforo	43.0 - 50.0 x 7.0			41.0 - 52.5 x 6.5 - 8.0		
	Macrobásico p-mastigóforo	42.0 - 52.0 x 7.0 - 12.0					
Cap.	Basítrico		8.5 - 14.0 x 1.5	9.5 - 13.5 x 2.0		9.0 - 12.5 x 1.0 - 1.5	
	Microbásico p-amastigóforo		13.0 - 22.0 x 3.5 - 4.5	11.0 - 19.0 x 2.0 - 4.0		9.5 - 14.5 x 3.5 - 4.5	
Escapo	Basítrico		13.0 - 21.5 x 3.0 - 4.0	15.0 - 22.0 x 3.0 - 4.0		10.5 - 16.5 x 2.0 - 3.5	
	Basítrico		8.5 - 14.0 x 1.5				
	Microbásico p-mastigóforo					12.0 - 16.5 x 3.5 - 4.0	
	Microbásico p-amastigóforo		13.0 - 24.0 x 3.5 - 4.5	15.0 - 24.5 x 3.0 - 4.0			
Coluna	Basítrico	14.0 - 21.0 x 3.0			6.5 - 12.0 x 0.5 - 1.5		8.0 - 21.5 x 1.5 - 4.0
	Basítrico	8.5 - 10.0 x 1.5			12.0 - 21.0 x 3.5 - 4.5		
	Microbásico p-amastigóforo	12.0 - 20.0 x 2.5 - 3.0			11.0 - 24.0 x 4.5 - 6.0		13.5 - 23.5 x 3.5 - 4.5
	Microbásico p-amastigóforo	14.0 x 3.0					
	Microbásico p-mastigóforo	22.0 - 24.0 x 5.0					

Tabela 10: Comparação da distribuição e tamanho dos nematocistos das espécies de *Diadumene*.

Espécie		<i>D. cincta</i>	<i>D. leucolena</i>	<i>D. franciscana</i>	<i>D. lighti</i>	<i>D. lineata</i>	<i>Diadumene</i> sp
Tecido / Tipo de cnida		Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)	Comp. (μ) x larg. (μ)
Actinof.	Basítrico	22.0 - 23.0 x 2.5	15.0 - 24.0 x 2.0 - 3.0	11.0 - 18.5 x 1.5 - 3.5	11.0 - 20.0 x 0.5 - 1.5	12.0 - 21.0 x 2.0 - 2.5	14.0 - 24.5 x 2.0 - 3.0
	Microbásico p-mastigóforo	22.0 - 31.0 x 3.0 - 4.5				18.5 - 25.0 x 3.0 - 4.0	
	Microbásico p-amastigóforo		21.5 - 30.5 x 3.5 - 4.5	20.0 - 26.0 x 3.0 - 4.5	18.5 - 30.0 x 3.5 - 4.5		21.5 - 31.0 x 3.0 - 4.5
Filamentos	Basítrico	14.0 - 15.5 x 1.5 - 2.5	7.5 - 12.5 x 1.0 - 1.5	9.0 - 12.5 x 1.0	9.5 - 16.0 x 0.5 - 1.5	9.0 - 15.0 x 1.0 - 1.5	7.5 - 13.0 x 1.5 - 2.0
	Microbásico p-mastigóforo	17.5 - 25.5 x 4.0 - 4.5	7.5 - 11.0 x 4.5 - 5.0	11.0 - 15.5 x 2.0 - 4.0	15.5 - 23.5 x 3.0 - 3.5	9.0 - 13.5 x 2.5 - 3.5	22.0 - 31.0 x 3.5 - 4.5
	Microbásico p-mastigóforo	9.0 - 10.5 x 4.2	13.0 - 17.0 x 3.5			15.0 - 20.5 x 3.5 - 4.0	
	Microbásico p-mastigóforo	14.0 - 18.5 x 5.0 - 6.0	21.5 - 31.0 x 3.5 - 4.5			21.5 - 27.0 x 3.0 - 4.0	
	Microbásico p-amastigóforo			23.5 - 33.5 x 3.0 - 5.0	8.0 - 14.0 x 3.5 - 4.5	17.0 - 22.5 x 5.0 - 6.0	7.5 - 11.5 x 4.0 - 5.0
	Microbásico p-amastigóforo			15.5 - 22.0 x 1.5 - 2.0			13.5 - 18.0 x 3.0 - 4.0
Acôncios	Basítrico	12.0 - 17.0 x 1.0 - 2.0	10.5 - 20.0 x 1.5	23.0 - 30.5 x 1.5 - 3.0	12.0 - 22.5 x 0.5 - 1.5	13.5 - 20.5 x 2.0 - 3.0	8.0 - 17.0 x 1.5 - 2.8
	Microbásico p-mastigóforo	46.0 - 56.0 x 7.0 - 7.5	22.0 - 52.0 x 6.0 - 8.0	48.0 - 67.5 x 4.5 - 7.5	30.0 - 51.5 x 6.0 - 8.0	29.0 - 47.5 x 5.0 - 6.0	25.0 - 50.0 x 6.0 - 9.5
	Microbásico p-amastigóforo					12.5 - 19.5 x 3.5 - 4.0	
	Microbásico p-amastigóforo	29.0 - 40.3 x 3.5 - 6.3					

Com relação à descrição dos espécimes da anêmona do gênero *Diadumene* da Baía de Paranaguá, dois fatos importantes que devem ser levados em conta: sua variabilidade de coloração e da morfologia. Além de os espécimes perderem a coloração, após serem retirados do ambiente natural e mantidos em condições de laboratório, existem muitos espécimes que em campo já apresentam uma coloração diferente, mais clara. Já a variabilidade morfológica ocorre devido à intensa realização de fissões longitudinais. Para minimizar esse problema o número de tentáculos e mesentérios foi contado nos animais maiores. Pólipos muito pequenos, com diâmetro da coluna menor que 3 mm foram considerados como sendo resultantes recentes de fissões longitudinais, e, portanto, tinham grande chance de ainda terem um número reduzido nesses caracteres.

Superfamília **Acontiaria** Carlgren, *in* Stephenson, 1935: 181

Thenaria com acôncios ou órgãos semelhantes a acôncios. Esfíncter às vezes ausente ou endodérmico, mas geralmente mesogleal.

Família **Diadumenidae** Stephenson, 1920

Diadumenidae Stephenson, 1920: 520; Hand, 1956: 222; Pinto, 2005: 74; Daly *et al.*, 2007: 113

Acontiaria sem esfíncter distinto. Acôncios com basítricos e microbásico p-mastigóforos.

Diadumene Stephenson, 1920: 521; Hand, 1956: 222-223; Manuel, 1981:131; Pinto, 2005: 75

Diadumenidae com disco basal bem desenvolvido. Coluna lisa, dividida em escapo e capítulo. Escapo e capítulo separados por um colarinho, que pode desaparecer quando o animal está distendido. Sem esfíncter distinto. Margem do capítulo tentaculada. Escapo liso, com cíncldes distribuídas ao redor do corpo, que podem estar em pequenas elevações. Tentáculos com arranjo mais ou menos regular, lisos, numerosos, retráteis ou não, com músculos longitudinais ectodérmicos. Tentáculos do primeiro ciclo podem desenvolver *catch-tentacles*, com átricos e holótricos. Seis pares de mesentérios perfeitos, duas sifonoglifas e dois pares de mesentérios diretivos. Devido à reprodução assexuada, este número pode variar. Mesentérios mais numerosos oralmente que aboralmente. Retratores difusos a circunscritos, músculos parietais e basilares fracos. Gônadas nos mesentérios perfeitos e nos imperfeitos mais desenvolvidos. Acôncios com basítricos e microbásico p-mastigóforos. Cnidoma: espirocistos, basítricos, microbásico p-amastigóforos, microbásico p-mastigóforos, macrobásico p-

amastigóforos, átricos e holótricos. O macrobásico p-amastigóforo é encontrado nos tentáculos de algumas espécies, e os átricos e holótrico somente nos *catch-tentacles*.

Descrição de *Diadumene* sp da Baía de Paranaguá

Morfologia Externa

Disco pedal: aderente e geralmente com contorno circular. Coloração bege, sempre mais clara que a coluna. Diâmetro geralmente igual ou pouco maior que o da coluna (até 1,5 vezes maior). Quando o pólipo expande lateralmente para realizar fissão longitudinal o contorno do disco basal se torna irregular e seu diâmetro pode ficar até quatro vezes maior que o da coluna. Diâmetro em animais vivos: 0,1 a 1,5 cm. Diâmetro em animais fixados em formol 4%: 0,1 a 1,3 cm.

Coluna: forma varia de estendida e colunar a baixa e cilíndrica. Quando bem estendida tem forma de cálice e é possível notar uma nítida separação entre capítulo, onde a parede do pólipo é fina, e escapo, de parede espessa. Quando o animal está contraído, o capítulo fica inteiramente retraído dentro do escapo. Tanto no ambiente natural quanto no laboratório, é possível observar nitidamente as inserções dos mesentérios quando os animais estão distendidos, resultando em um aspecto listrado. As listras são mais claras do que o restante do tecido, podendo ser brancas. O esfíncter marginal é ausente.

O tecido do capítulo é fino e transparente, através do qual se observa as inserções dos mesentérios e a faringe. Quando o animal não está completamente distendido, o capítulo é translúcido. Sua coloração no espécime vivo é verde ou marrom e é mais claro que o escapo. Após perder a coloração em laboratório, o escapo apresenta uma coloração laranja claro ou róseo. O capítulo é desprovido de cíncclides. O escapo é mais espesso e translúcido que o capítulo, mas ainda podem-se observar as inserções dos mesentérios quando o animal está bem distendido. No escapo, as cíncclides são conspícuas no animal bem distendido, quando são vistas como pequenas elevações dispostas em fileiras longitudinais. Estas são endocélicas e desprovidas de coloração.

Uma característica bastante observada nesses animais é a presença de nítidas faixas longitudinais, temporariamente sem coloração, que constituem a região do animal em processo de regeneração após um evento de fissão longitudinal. Outra característica decorrente da reprodução assexuada é a constante variação nas dimensões da coluna, já que durante este processo o diâmetro pode chegar a ser várias vezes maior que a altura. Altura em animais vivos

estendidos: 0,5 a 2,0 cm. Altura em animais fixados estendidos: 0,4 a 1,9cm. Diâmetro em animais vivos estendidos: 0,1 a 1,1 cm. Diâmetro em animais fixados estendidos: 0,1 a 1,0 cm.

Disco oral: circular e com margem tentaculada. Pelo menos metade da área do disco oral é desprovida de tentáculos (perístoma). Boca em forma de fenda que pode estar localizada no centro do disco oral ou estar deslocada para o lado que está sendo regenerado após a fissão longitudinal. Lábios em geral fortemente pregueados e salientes, mas podem estar retraídos.

Em ambiente natural apresentam o disco oral marrom, com manchas brancas próximas às bases dos tentáculos. Algumas vezes apresentam manchas brancas mais fortes nas endocelas diretivas. Geralmente a região mais próxima à boca é mais escura. A boca apresenta coloração marrom clara e pálida, semelhante à dos tentáculos. Após serem mantidos em laboratório, o disco oral torna-se laranja pálido ou rósea e a inserção dos mesentérios é visível. A boca torna-se laranja clara ou rósea.

Quando o animal está bem distendido e em forma de cálice, o diâmetro do disco oral é um pouco maior que o da coluna. Diâmetro em animais vivos: 0,1 a 1,0 cm. Diâmetro em animais fixados: 0,1 a 0,9 cm.

Tentáculos: Longos, cônicos, contráteis e retráteis. O número de tentáculos é bastante variável devido ao fato de estes animais estarem sempre crescendo e fissionando. Nos indivíduos maiores são observados entre 48 e 80 tentáculos arranjados em 3 a 6 ciclos pouco regulares. Nos dois primeiros ciclos, os mais antigos, nota-se uma tendência a um arranjo hexâmico, sendo que há 6 tentáculos em cada um deles. A partir do terceiro ciclo há 12 ou mais tentáculos. São translúcidos no exemplar recém coletado, com coloração marrom ou verde e com manchas brancas esparsas. Não apresentam algas simbiotes na endoderme. Em laboratório, os tentáculos perdem a coloração, geralmente ficando quase transparentes.

É rara a existência de tentáculos dos últimos ciclos (5º ou 6º) desenvolvidos. Geralmente ainda estão em formação, são bem menores que os tentáculos dos demais ciclos e apresentam comprimentos variados. Em anêmonas pequenas (diâmetro de coluna menor que 0,5 cm) é comum existir menos de 20 tentáculos, de tamanhos variados e dispostos de maneira irregular em apenas 2 ciclos. Os tentáculos diretivos estão ligeiramente deslocados para o interior do disco oral, em relação aos demais tentáculos do primeiro ciclo e também podem ser mais longos.

Os tentáculos do primeiro ciclo podem formar *catch-tentacles*, que podem ser mais espessos e apresentar coloração branco-leitosa, ou podem ser bastante longos, alcançando um comprimento maior que o triplo de um tentáculo normal. Esses tentáculos foram frequentemente observados até uma semana após a coleta. Depois de um tempo maior que esse, poucos animais

formavam *catch-tentacles*. Os tentáculos maiores apresentam até 0,8 mm de comprimento em indivíduos bem desenvolvidos, enquanto os *catch-tentacles* podem ter até 1,5 cm em indivíduos menores. Não apresentam poros nas pontas. A musculatura ectodérmica dos tentáculos é ausente.

Morfologia interna

Actinofaringe: pregueada e curta, se estendendo 1/3 a 1/2 da coluna quando o animal está distendido. Coloração geralmente igual à da boca, podendo também ser um pouco mais clara. Em laboratório geralmente torna-se transparente. Sua parede é bastante espessa e ciliada. Em geral apresentam duas sifonoglifas, mas espécimes com menos de seis pares de mesentérios completos podem ter apenas uma.

Mesentérios: 6 pares de mesentérios perfeitos com arranjo regular, em espécimes maiores. Os mesentérios são dispostos em 3 ciclos, sendo o segundo e o terceiro imperfeitos. O terceiro ciclo é pouco desenvolvido e está ausente em algumas das anêmonas muito pequenas (diâmetro da coluna menor que 3 mm). São em mesmo número distal e proximalmente. Não foram observados mesentérios férteis. Há dois pares de mesentérios diretivos. Os filamentos mesentéricos estão presentes nos mesentérios de 1ª e 2ª ordem.

Musculatura: Músculos retratores difusos bem desenvolvidos nos mesentérios de 1ª e 2ª ordem. Musculatura parietobasilar pouco desenvolvida. Músculo basilar fraco.

Acôncios: brancos, delgados, emitidos pelas cínclides e pela boca quando o animal é importunado. São bastante numerosos, e formados a partir dos filamentos dos mesentérios de 1ª e 2ª ordem.

Cnidoma

Foram observados espirocistos e nematocistos átricos, holótricos, basítricos, microbásicos p-mastigóforos, macrobásico p-amastigóforo e macrobásico p-amastigóforo.

Tabela 11. Distribuição e tamanho dos nematocistos de *Diadumene* sp. N = número de cápsulas medidas. P = número de espécimes em que foram encontradas as cnidas em relação ao número de espécimes analisados. F = frequência de cada cnida (+++ = muito comum; ++ = comum; + = pouco comum).

Tecido / Tipo de cnida	Comprimento da cápsula x largura (µm)	N	P	Frequência
Tentáculos				
Átrico	25.8 - 34.2 (31.02) x 7.2 - 11.4 (9.94)	30	1/8	++
Holótrico	21.6 - 27.6 (25.34) x 4.8 - 7.2 (6.16)	40	2/8	++
Basítrico	7.2 - 21.2 (14.03) x 1.2 - 3.6 (2.33)	80	8/8	+++
Microbásico p-amastigóforo	19.8 - 26.4 (22.75) x 3.6 - 6.0 (4.68)	60	8/8	+++
Macrobásico p-amastigóforo *	36.0 - 46.2 (41.01) x 6.0 - 8.4 (7.29)	40	8/8	++
Actinofaringe				
Basítrico	16.8 - 21.28 (19.67) x 1.2 - 3.7 (2.67)	30	5/5	+
Microbásico p-amastigóforo	15 - 22.8 (17.84) x 3 - 4.2 (3.64)	39	5/5	++
Capítulo				
Basítrico	9.6 - 13.5 (10.85) x 1.2 - 2.4 (2.04)	26	5/5	+
Microbásico p-amastigóforo	15.1 - 23.4 (17.8) x 2.4 - 4.8 (3.60)	18	5/5	+
Escapo				
Basítrico	15,2 - 20.7 (18.14) x 2.4 - 4.2 (3.04)	59	5/5	++
Microbásico p-amastigóforo	9.9 - 15.6 (12.78) x 3.0 - 4.8 (4.05)	14	5/5	+
Filamentos				
Basítrico	10.8 - 19.2 (15.50) x 1.2 - 3.0 (1.86)	39	6/6	+++
Microbásico p-amastigóforo	39.0 - 51.6 (46.46) x 6.0 - 8.4 (7.07)	37	6/6	++
Microbásico p-amastigóforo	7.2 - 12.9 (11.20) x 2.8 - 4.8 (4.06)	62	6/6	++
Microbásico p-amastigóforo	12.0 - 22.8 (16.16) x 3.0 - 4.8 (3.77)	40	6/6	++
Acôncios				
Basítrico	10.2 - 19.2 (15.50) x 1.2 - 3.6 (1.96)	71	8/8	+++
Microbásico p-amastigóforo	35.9 - 57.5 (44.65) x 5.1 - 7.4 (6.18)	85	8/8	++
Microbásico p-mastigóforo	41.1 - 57.0 (46.59) x 5.4 - 8.4 (6.56)	11	8/8	+
Microbásico p-mastigóforo	19.2 - 26.4 (22.42) x 3.0 - 6.0 (4.42)	18	2/8	+

Observações de habitat

Os espécimes encontrados estavam em sua maioria fixados sobre cracas ou bivalves, que, por sua vez, estavam fixados sobre as estruturas artificiais do Iate Clube de Paranaguá. Outros estavam diretamente sobre as colunas de concreto ou estruturas metálicas. Eles formavam sempre grandes aglomerados de indivíduos de tamanhos bastante variados. Em alguns espécimes notavam-se nítidas marcas longitudinais resultantes de uma fissão longitudinal recente.

Quando estimulados, nem todos os animais se retraíam prontamente. Muitos demoravam ou nem se fechavam completamente, deixando alguns tentáculos à mostra. A contração dos animais geralmente ocorria com a expulsão de água pela boca e pelas cíncides, e às vezes de acôncios. Muitas vezes a contração ocorria de forma assimétrica, ou seja, um lado da coluna ficava mais contraído que o outro. Quando coletados, a maioria dos espécimes era retirada

facilmente do substrato. No entanto, em alguns ocorria a ruptura da parede da coluna ou do disco basal, com uma liberação intensa de acônchos.

Observações em laboratório

Para sobreviverem em laboratório, logo após a coleta os espécimes já eram separados de seu substrato (cracas e bivalves), colocados em recipientes com grupos menores de anêmonas e já no dia seguinte à coleta, os animais já podiam ser normalmente alimentados. Para que fossem mantidos por um período maior que uma semana, os animais tinham que ser separados em grupos ainda menores. A maioria dos espécimes se fixou rapidamente ao novo substrato. Em um a dois dias os espécimes cuja coluna ou disco pedal houvessem sido danificados durante a coleta estavam regenerados. No entanto, as condições dos animais se deterioraram rapidamente quando em laboratório. Após 30 dias, estes já apresentavam tamanho consideravelmente menor do que quando foram coletados, tanto pela diminuição do tamanho dos indivíduos quanto pela intensa atividade de fissão longitudinal. Isso foi observado de forma mais intensa nos espécimes mantidos em água artificial.

Um fato interessante observado foi a reação positiva à luz exibida pelos animais. Para que fossem fixados de forma satisfatória para a realização de cortes histológicos, os animais deveriam estar com o pólipó inteiramente distendido no momento de serem anestesiados. Para induzir essa distensão, os animais eram colocados em frascos pequenos em grupos de três indivíduos e postos na janela sob a luz natural ou sob a luz de uma lâmpada. Após aproximadamente cinco minutos, os animais se esticavam, e podiam ser anestesiados.

Figura 7. A – D: *Diadumene* sp *in vivo*. A: Espécime distendido com coloração típica da espécie. B: Espécimes contraídos, mostrando variação de coloração entre indivíduos da espécie. C: Anêmona contraída, indicando capítulo retraído dentro do escapo (seta indicando colarinho). D: Coluna em anêmona distendida (linha tracejada marcando o colarinho e indicando divisão em capítulo – superior – e escapo – inferior; setas indicando as fileiras longitudinais de cínclides). E – G: *Diadumene* sp fixadas. E: Aspecto geral de um espécime fixado em formaldeído 4% a 1 mês. F e G: Aspecto de um espécime fixado em formaldeído 4% a 8 meses. Escala: 5 mm.

Figura 8. A – G: *Diadumene* sp *in vivo*. A: Disposição dos tentáculos e coloração do disco de um espécime mantido em laboratório a um mês. B: Coloração de um espécime recém coletado (seta indicando lábio pregueado e saliente). C: Espécime recém-coletado, com *catch-tentacles* mais opacos (indicados pela seta) que os demais tentáculos não especializados. D: Espécime com *catch-tentacle* bastante distendido, após uma semana em laboratório. E: Espécime mantido em laboratório a mais de um mês sendo alimentado (seta indicando final da actinofaringe). Escalas: 5 mm. F: Liberação de acôncio pela boca (Escala: 1 mm). G: Liberação de acôncio por uma cínclide.

Figura 9. A – H: Cortes histológicos de *Diadumene* sp. A: Corte longitudinal. B – E: Cortes transversais na altura da actinofaringe. B: Indivíduo com apenas um ciclo de mesentérios imperfeitos. C: Indivíduo com dois ciclos de mesentérios imperfeitos. D: Sifonoglifo ciliada e músculos retratores dos mesentérios diretivos. E: Mesentérios imperfeitos do terceiro ciclo. F: Corte transversal na altura da cavidade gastrovascular. G: Corte longitudinal de tentáculo. H: Corte transversal de tentáculo. Siglas: a – acônrios; af – actinofaringe; b – boca; md – mesentérios diretivos; mi – mesentérios imperfeitos; mp – mesentérios perfeitos; mr – músculos retratores; pc – parede da coluna; t – tentáculos.

Figura 10: Cnidas de *Diadumene sp.* Espirocisto: f. Átrico: b. Holótrico: c. Basítricos: e, h, j, l, p, t. Macrobásico p-amastigóforo: a. Microbásico p-amastigóforo: d, g, i, k, m, n, o, r. Microbásico p-mastigóforo: q, s.

Análise Molecular

A sequência obtida para o gene mitocondrial 16S rRNA da espécie de Paranaguá encontra-se no Anexo 5. A comparação desta sequência com a de *D. cincta* mostrou que existem 356 congruências e 1 transição. Já a comparação desta sequência com a de *D. lineata* evidenciou a existência de 349 congruências, 3 transições e 4 transversões. E, por fim, a comparação entre as sequências de *D. lineata* e *D. cincta* mostraram haver 350 congruências, 3 transições e 3 transversões. Os alinhamentos com as modificações evidenciadas estão no Anexo 6. A distância genética encontrada entre a espécie de Paranaguá e *D. cincta* foi igual a zero (0,0000000) e entre a primeira e *D. lineata*, a distância foi igual a 0,0129727.

Análise dos Experimentos

Tolerância a diferentes salinidades e tempos de exposição ao ar (dessecação)

Nos espécimes de todas as coletas não foram observadas gônadas, e, portanto, infere-se que estes animais neste período não tenham realizado reprodução sexuada. Além disso, a única forma de reprodução assexuada observada foi fissão longitudinal. Apesar de a laceração pedal ter sido observada em campo, no laboratório, nenhum dos indivíduos novos era formado apenas a partir de uma parte do disco pedal, mas sim continha pelo menos alguns tentáculos e uma parte da boca. Observou-se em duas anêmonas a realização de duas fissões longitudinais, quase simultâneas, que deram origem a 3 indivíduos, sendo que, em ambos os casos, a anêmona iniciou uma segunda fissão longitudinal antes que a primeira tivesse sido finalizada. Notaram-se também alguns casos em que a anêmona passava um longo tempo, aparentemente, preparada para realizar a fissão (o diâmetro aumentava bastante, deixando a anêmona totalmente esticada), no entanto, após um ou dois dias ela voltava à sua forma normal sem ter se dividido.

O número total de eventos de fissão longitudinal observados ao longo dos experimentos de tolerância a salinidade foi 61 eventos, enquanto nos experimentos de tolerância à exposição ao ar 89. O número total de mortes em diferentes salinidades foi de quatro indivíduos: dois eventos de mortes em salinidade 0 e outros dois eventos em salinidade 45. No experimento de dessecação 67 indivíduos morreram. Os resultados para cada experimento estão representados na figura 11.

Com relação à salinidade, não houve diferença no número de reproduções entre os tratamentos (coeficiente do modelo = - 0.009525; $p = 0,416$). O número de mortes de anêmonas também não foi diferente entre os tratamentos (coeficiente do modelo = 0.01079; $p = 0,741$). Este segundo resultado já era esperado após uma observação dos resultados já que em todos os

experimentos houve somente 2 eventos de mortes em salinidade 0 e outras duas em salinidade 45. Uma observação interessante é que no período em que as anêmonas estavam em suas respectivas salinidades, notou-se nitidamente uma intensa produção de muco principalmente nas anêmonas colocadas na salinidade 0 e 5. Estas, em sua maioria, por alguns dias após os experimentos, adquiriam o aspecto de que iriam morrer, no entanto, após 3 dias já aparentavam estar totalmente recuperadas.

Para os experimentos de tolerância à exposição ao ar, a diferença entre os tratamentos foi significativa. O número de eventos de fissão longitudinal apresentou uma correlação negativa com o tempo de exposição ao ar (coeficiente do modelo = - 0.02460; $p = 1.21 \times 10^{-5}$), ou seja, as anêmonas se reproduziam menos quanto mais tempo elas passaram fora da água. O poder explicativo do modelo para esses dados foi de 26,5%. Já o número de mortes de anêmonas por tratamento aumentou na medida em que se aumenta o tempo de exposição ao ar (coeficiente do modelo = 0.0266; $p = 3.31 \times 10^{-8}$). O poder explicativo do modelo para esses dados foi de 47,4%. Observando-se a Figura 11 (B e C), nota-se realmente que para o número tanto de fissões quanto de mortes há uma mudança mais brusca a partir 1 hora de exposição ao ar.

Deslocamento

Foram diferenciados os dois tipos de deslocamentos: por deslizamento do disco pedal e por soltura. Estes correspondem, respectivamente, ao deslocamento local e migracional. É importante ressaltar que só se considerou a ocorrência de deslocamento por soltura quando o animal foi observado solto na placa em um dia entre dois em que esteve fixado. Há possibilidade de que tenham ocorrido outros eventos de soltura entre duas observações consecutivas, que não foram observados.

Os resultados de cada experimento foram analisados individualmente, tanto para a comparação entre o deslocamento claro e escuro, quanto para o deslocamento em direção a favor ou contra a luz. Os valores de deslocamento médio em cada caso estão representados na Figura 12.

A comparação entre os deslocamentos médios diários no aquário claro e escuro pelo teste de Mann-Whitney mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos em nenhum dos experimentos, ou seja, em todos eles a hipótese nula foi aceita, mostrando que não houve uma tendência de os animais se deslocarem mais em ambiente claro ou escuro. Já para a comparação entre os deslocamentos em direção a favor ou contra a região iluminada, o teste de Wilcoxon mostrou nos Experimentos 1 a 4 que não há diferença

significativa entre o número de deslocamentos em direção no deslocamento, enquanto no Experimento 5 houve diferença significativa entre as direções ($p = 0,02715$).

Figura 11. Resultados dos experimentos. A: Número de espécimes que se reproduziram (fissão longitudinal) por tratamento de salinidade em cada experimento. B: Número de espécimes que se reproduziram (fissão longitudinal) por tratamento de tempo de dessecação em cada experimento. C: Número de mortes por tratamento de tempo de dessecação em cada experimento. Não há representação do número de mortes por tratamento de salinidade, pois esse número foi muito baixo.

Figura 12. Resultados dos experimentos referentes ao deslocamento. A: Deslocamento médio das 10 anêmonas presentes nos aquários com tratamento claro (C) e escuro (E) em cada um dos cinco experimentos. B: Deslocamento médio em direção a/a favor da luz (F) ou em direção contrária a/contra a luz (C) das 10 anêmonas presentes nos aquários com tratamento escuro em cada um dos cinco experimentos. ● representa o valor médio de deslocamento de cada anêmona; ● média dos deslocamentos do tratamento; — representa o desvio padrão.

Discussão

Em sua morfologia externa, a espécie de *Diadumene* encontrada no Iate Clube de Paranaguá assemelha-se enormemente com fotos ou figuras da espécie *D. cincta*. No entanto, um caráter de morfologia externa é suficiente para diferenciá-las: as cínclides de *D. cincta* não estão dispostas em fileiras, mas sim espalhadas na coluna. Já *D. leucolena* apresenta as cínclides também dispostas longitudinalmente na coluna, apesar de estas serem endo- e exocélicas.

Apesar de muitos autores opinarem que o cnidoma não deveria ser utilizado como uma forma de separar espécies de anêmonas (Fautin, 1988; Acuña *et al.*, 2003; Francis, 2004), dentro da superfamília Acontiarina e família Diadumenidae essa é a forma com a que as diagnoses de muitas espécies têm sido feitas até o momento. No caso desta espécie, duas das três características utilizadas para separá-la das demais já existentes são referentes ao cnidoma.

O cnidoma dos tentáculos e dos acônchos são de extrema importância para a identificação do material, já que a análise das Tabelas 2 a 10 evidenciou que são basicamente os tipos de nematocistos nestas duas regiões que são mais relevantes para a diferenciação das espécies de *Diadumene*. Nesse aspecto, a espécie deste trabalho apresenta características em comum com as espécies *D. cincta*, *D. lighti* e *D. lineata*. A presença de macrobásico p-amastigóforo nos tentáculos é uma importante semelhança com as duas primeiras espécies (Hand, 1956). Já com a terceira, a semelhança vem do fato de ambas as espécies apresentarem cnidas do tipo basítrico, microbásico p-mastigóforo e microbásico p-amastigóforo no acônchos. A presença dos dois primeiros tipos é comum a todas as espécies do gênero, no entanto a presença do último era exclusiva de *D. lineata* (Hand, 1956). Outras diferenças no acônchos observadas com relação a esta espécie é a presença de duas classes de tamanho de microbásico p-mastigóforo na espécie de Paranaguá, enquanto *D. lineata* apresenta apenas uma (Hand, 1956). E, numa última comparação com respeito às cnidas, a espécie da Baía de Paranaguá apresenta uma segunda característica em comum com *D. leucolena*: a ausência de microbásico p-mastigóforos nos tentáculos (Hand, 1956). Ou seja, esta espécie não apresenta nenhuma característica exclusiva, mas sim um conjunto de caracteres que não é encontrado em nenhuma das outras espécies de *Diadumene*.

A irregularidade na anatomia da espécie devido à reprodução assexuada não é incomum e já foi citada por outros autores para o gênero (*e.g.* Dunn, 1982), assim como a contração assimétrica (Hand, 1956; Manuel, 1981). No entanto, a presença de números diferentes de tentáculos e mesentérios nos diferentes espécimes pode não se dever à reprodução assexuada e sim ao tamanho ou idade dos animais. Segundo Hyman (1940) o número de mesentérios, endocelos e tentáculos aumenta com a idade do animal.

Pinto (2002) registrou a presença de uma espécie de *Diadumene* para o Brasil, no entanto sua identificação não alcançou o nível de espécie. Seus espécimes não apresentavam microbásico p-amastigóforos nos acônios, portanto não se tratava de *D. lineata*, já registrada para a costa brasileira por Belém & Monteiro (1977). Além disso, ela reportou a presença de mesentérios geralmente dispostos em 4 ciclos, e observou mesentérios férteis, além da ausência de macrobásico p-amastigóforo nos tentáculos, o que mostra que não se trata da mesma espécie aqui descrita.

Fautin *et al.* (2008) registraram na Austrália, na Baía de Moreton, a presença de uma espécie de *Diadumene* também não identificada em nível de espécie. Nesse trabalho nada é comentado sobre o cnidoma ou organização interna do animal, no entanto a aparência externa e coloração dos espécimes fotografados são muito semelhantes aos da Baía de Paranaguá. Em um dos espécimes dessa localidade foi observado um *catch-tentacle*.

A presença de *catch-tentacles* é algo que aproxima a espécie da Baía de Paranaguá de *D. cincta*, *D. leucolena*, *D. lineata*, *D. kameruniensis*, *D. neozelancia* e *D. schilleriana*, no entanto, como já foi comentado por alguns autores, não deve ser considerada uma característica diagnóstica devido à sua efemeridade (Hand, 1956). Nos espécimes da Baía de Paranaguá muitos indivíduos pareciam apresentar *catch-tentacles*, devido à aparência externa dos tentáculos, que assumiam um aspecto de serem mais robusto e de coloração opaca. No entanto, em oito de dez indivíduos analisados quanto ao cnidoma dos tentáculos não foi observada a presença de átricos e holótricos mesmo que o tentáculo tivesse a aparência externa de *catch-tentacle*.

Portanto, a espécie da Baía de Paranaguá apresenta três características principais que em conjunto a diferencia das demais espécies do gênero *Diadumene*: cíncilides endocélicas conspicuas no escapo em fileiras longitudinais, nematocistos do tipo macrobásico p-amastigóforo nos tentáculos e microbásico p-amastigóforo nos acônios. É importante ressaltar que a comparação com as outras espécies do gênero foi feita somente com base em bibliografia, o que é uma limitação deste trabalho. Uma revisão do gênero *Diadumene* é necessária, e está sendo realizada por Daphne Fautin, Meg Daly e Cadet Hand (póstumamente) (Fautin, comunicação pessoal).

A análise molecular da sequência do gene mitocondrial 16S rRNA evidencia que a espécie de Paranaguá deve ser oriunda de alguma população de *D. cincta*. A diferença encontrada entre a sequência da espécie de Paranaguá e a de *D. cincta* é praticamente nula. A mesma comparação para outra espécie dentro do mesmo gênero, *D. lineata*, evidencia uma distância genética muito maior. Avaliações de distância e topologia vêm sendo utilizadas para delimitar espécies em alguns grupos de cnidários (*e.g.* Sinniger *et al.*, 2008). Portanto, com base na análise de distância e topologia, pode-se concluir que a espécie de Paranaguá deve mesmo ser uma

espécie exótica neste local. Outras análises ainda são necessárias, mas os comportamentos dos marcadores em Cnidaria têm apresentado boa coesão de um modo geral (Stampar, comunicação pessoal). Esse resultado evidencia quão complicada é a definição de espécies de anêmonas-do-mar, principalmente entre as famílias representantes da superfamília Acontiarina, e reforça o que alguns autores já comentaram a respeito da inadequação de se utilizar somente informações de morfologia do póipo e cnidoma na definição das espécies (Fautin, 1988; Daly *et al.*, 2007).

Já com relação aos experimentos, a espécie mostrou-se bastante tolerante à flutuação de condições e na maioria dos casos, voltou logo a se reproduzir após ser exposta às condições adversas. O fator salinidade não teve influência na frequência de reprodução da espécie nem em sua mortalidade e a capacidade de recuperação dos animais parece ser bem grande, mesmo após uma exposição por duas horas a salinidades baixíssimas como 0 e 5. Isso mostra que a espécie apresenta uma capacidade de rápido crescimento populacional acompanhado de uma grande tolerância a esse parâmetro físico, o que já havia sido observado para *D. lineata* (Verrill, 1898; Minasian, 1979).

Em uma última visita ao local de coleta, realizada no início de Abril de 2011, num período de maré baixa, no Iate Clube de Paranaguá fui surpreendida pela completa ausência da espécie nos locais onde sempre eram encontradas. Após uma intensa busca de espécimes pelas estruturas do Iate Clube, constatei que, pelo menos até a pouca profundidade que eu conseguia enxergar, não havia anêmonas no local. Uma possível explicação para este fato são as intensas chuvas do mês de Março, que causaram enchentes no litoral do Paraná. A chuva acumulada para este mês foi 510,8 mm, enquanto para este mesmo mês nos últimos dez anos este valor, em média, foi 316,7 (SIMEPAR, www.simepar.br). Esses dados são da estação meteorológica de Guaratuba, cidade situada a 50 km de Paranaguá. Acredita-se que, caso a causa do desaparecimento das anêmonas seja realmente a ocorrência das chuvas intensas, somente as anêmonas das camadas mais superficiais da água, onde provavelmente houve uma baixa de salinidade que persistiu por alguns dias, morreram, enquanto anêmonas que estivessem numa profundidade maior não tenham sido afetadas.

Com relação à sua tolerância à dessecação é bastante surpreendente que uma anêmona de parede da coluna tão fina e que não possui esfíncter muscular, que a princípio seria seu melhor mecanismo para um eficiente isolamento do ambiente externo e evitar a perda de água, consiga sobreviver e ainda por cima se reproduzir após ser submetida a condições tão adversas. Vale ressaltar que um dos indivíduos do experimento 2 se manteve vivo mesmo após ser exposto ao ar por seis horas. Ou seja, apesar de ter sido observada uma diminuição no número de eventos de reprodução e um aumento da mortalidade com o aumento do tempo de exposição ao ar, esses

animais mostraram ter uma inesperada capacidade de recuperação após passarem por condições bastante extremas.

Nos experimentos, as anêmonas não responderam aos diferentes regimes de iluminação, ou seja, não houve inibição do deslocamento pela presença ou ausência de luz. Já nas observações em laboratório, os espécimes tiveram uma resposta semelhante à que foi comentada por Hyman (1940), que as anêmonas podem ter reação positiva à luz, se deslocando em direção à ela ou então simplesmente virando seu disco oral em direção à luz. A ausência de zooxantelas no pólipos faz com que as anêmonas não tenham uma necessidade direta de ficar próximas à luz, e pode ser um dos motivos pelos quais a espécie sobreviva tão bem em ambientes com água com alta sedimentação (matéria orgânica) como a Baía de Paranaguá. No entanto, elas parecem ter alguma resposta à luz que pode estar relacionada a algum estímulo ou necessidade fisiológica ainda não esclarecida.

A grande tolerância a parâmetros ambientais, a intensa reprodução assexuada e ausência de reprodução sexuada observada na espécie da Baía de Paranaguá é um conjunto de características bastante parecido com o que tem sido detectado em populações da invasora *D. lineata*. Já foi constatado que populações desta espécie apresentam tolerância a diferentes salinidades e temperaturas, além de já terem sido observados alguns indivíduos que sobrevivem à alta exposição solar (e, portanto à dessecação) em períodos de maré baixa (Shick & Lamb, 1977). E, apesar de *D. lineata* se reproduzir sexualmente no local que é considerado sua localidade nativa (Fukui, 1991), populações que foram estudadas em outros locais parecem realizar somente reprodução assexuada ou estarem compostas apenas de indivíduos estéreis (Zabin *et al.* 2004). A invasão mediada por incrustação em cascos de navio e movimento de ostras para cultivo são consideradas as formas mais prováveis de introdução de *D. lineata* (Verrill, 1898; Stephenson, 1935; Zabin *et al.*, 2004) ou de seu movimento ao redor do mundo.

Streftaris *et al.* (2005) já consideram *D. cincta* como sendo espécie exótica e invasora no Mar do Norte, no Mediterrâneo e em determinados locais do Oceano Atlântico, portanto esse não seria o primeiro registro de invasão para esta espécie. E, apesar de Correia & Loyola e Silva (1990) terem registrado a presença de *Diadumene* sp para a Baía de Paranaguá, não há como afirmar que se trata da mesma espécie, o que impede que seja feita uma estimativa do momento em que esta espécie foi introduzida no costa brasileira.

Segundo a terminologia adotada por Lopes (2009) a espécie *D. cincta*, na Baía de Paranaguá, trata-se de uma espécie **exótica**, pois foi registrada fora de sua área de distribuição original, e **contida**, pois sua presença foi detectada apenas em ambientes artificiais controlados, isolados total ou parcialmente do ambiente natural. No entanto, deve-se levar em conta que as categorias sugeridas não são imutáveis para uma determinada espécie, e, dependendo das

características da espécie, do ambiente em que ela foi inserida, e das medidas de prevenção/contenção tomadas, elas podem passar rapidamente para outras categorias mais preocupantes como espécie **exótica estabelecida** ou **invasora**. Essas duas últimas categorias significam que as espécies são, respectivamente, observadas de forma recorrentes mais ainda não causam impactos ecológicos ou socioeconômicos aparentes, ou a causa de impactos mensuráveis no ambiente e/ou em atividades socioeconômicas humanas (Lopes, 2009)

Devido às vantagens competitivas em relação às espécies residentes e à ausência de predadores, parasitas e doenças, as espécies invasoras geralmente conseguem direcionar o uso dos recursos para crescimento e reprodução (Bax *et al.*, 2001). Lopes (2009) chama a atenção para importância do monitoramento de espécies exóticas principalmente em locais de maior risco potencial, como áreas portuárias e marinas, já que essa ação é imprescindível para a prevenção ou controle da dispersão destes animais. O alto fluxo de embarcações no Iate Clube e os Portos de Paranaguá e Antonina faz com que a Baía de Paranaguá seja um local bastante propício à introdução de espécies. O intenso tráfego de embarcações comerciais, ou de recreio, na área são fatores que aumentam as chances de introdução e dispersão de organismos não-nativos (Neves, 2007; Altvater, 2009), e acredita-se que grande parte das espécies introduzidas no local, inclusive, *D. cincta*, tenha se dado por esse meio. Além disso, estruturas artificiais construídas pelo homem parecem atrair e promover espécies exóticas, pois a falta de história evolutiva compartilhada entre as espécies e os substratos artificiais acaba anulando a vantagem competitiva das espécies nativas (Tyrrel & Byers, 2007) *apud* (Altvater, 2009). Altvater (2009) e Neves (2007) já registram a presença de alguns cnidários introduzidos no Iate Clube de Paranaguá, entre eles hidróide *Garveia franciscana* (Torrey, 1902).

É pouco provável que as espécies introduzidas na Baía de Paranaguá sejam completamente erradicadas, no entanto, estudos sobre as espécies podem ajudar no controle de suas populações (Neves, 2007). Por esse motivo, é imprescindível que, além do monitoramento constante das populações de espécies introduzidas na Baía de Paranaguá, sejam realizados mais estudos sobre as características das populações das espécies marinhas introduzidas no local, inclusive *Diadumene cincta*.

Conclusões

A anêmona-do-mar que foi encontrada na Baía de Paranaguá, provavelmente, se trata de *Diadumene cincta*, apesar de os dados morfológicos não concordarem em absoluto com os resultados da análise molecular. Este resultado ressalta a importância de que sejam realizadas revisões na ordem Actiniaria, envolvendo caracteres de caráter morfológico e molecular como ferramentas para que se possa chegar a uma compreensão da questão evolutiva do grupo. Além disso, comprova-se que a anêmona encontrada em Paranaguá trata-se de uma espécie exótica.

A espécie *D. cincta* de Paranaguá mostrou apresentar uma grande capacidade de tolerar e se reproduzir em condições adversas de salinidade e exposição ao ar, além de se adaptar tanto a locais iluminados quanto a locais com baixa luminosidade. Estas observações indicam que a espécie tem uma forte capacidade de se manter em áreas de alta interferência humana, como as águas escuras de uma região portuária, e essa adaptabilidade fenotípica a coloca com uma espécie com alto potencial invasor.

O local onde a espécie foi encontrada leva a entender que sua introdução tenha se dado por meio de sua incrustação em navios que aportaram no Porto de Paranaguá, vindos de outras regiões, como *D. cincta* já apresentou registros de invasão para a costa nordeste do Oceano Atlântico. A prevenção e o controle das espécies exóticas encontradas na costa brasileira são de grande importância, já que estas podem vir a causar impactos no ambiente ou nas atividades socioeconômicas que afetam o ser humano.

Referências Bibliográficas

- Acuña, F. H.; Excoffon, A. C.; Zamponi, M. O. & Ricci, L. 2003. Importance of nematocysts in taxonomy of acontiarian sea anemones (Cnidaria, Actiniaria): a statistical comparative study. *Zoologischer Anzeiger* 242: 75 – 81.
- Altvater, L. 2009. Composição e sazonalidade de cnidários em substrato artificial, na foz do Rio Itiberê, Baía de Paranaguá, Paraná. Dissertação de Mestrado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 151 pp.
- Annandale, N. 1907. The fauna of brackish ponds as port Canning, lower Bengal. part III – An isolated Race of the Actinian *Metridium schillerianum*. *Records of the Indian Museum* (1): 47 - 74.
- Annandale, N. 1915. Fauna of the Chilka Lake. The coelenterates of the lake, with an account of the Actiniaria of brackish water in the Gangetic Delta. *Memoirs of the Indian Museum* 5: 65 – 114.
- Ardelean, A. & Fautin, D. G. 2004. Variability in nematocysts from a single individual of the sea anemone *Actinodendron arboretum* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Hydrobiologia* 530/531: 189 – 197.
- Bax, N.; Carlton, J. T.; Mathews-Amos, A.; Haedrich, R. L.; Howarth, F. G.; Purcell, J. E.; Riese, A. & Gray, A. 2001. The control of biological invasions in the world's oceans. *Conservation Biology* 15 (5): 1234 – 1246.
- Belém, M. J. C. & Monteiro, D. C. 1977. Contribuições ao conhecimento da fauna de Cnidários do Rio de Janeiro. II. *Haliplanella luciae* (Verrill, 1898) (Actiniaria, Acontiarina), uma nova ocorrência no Brasil. *Papéis avulsos de Zoologia* 26: 1-19.
- Beneti, J. S. 2008. Estudo em laboratório do comportamento e reprodução da anêmona-do-mar *Diadumene* sp (Cnidaria, Anthozoa, Diadumenidae) do Rio Itiberê, Paranaguá, Paraná. Monografia de Bacharel – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 39 pp.
- Berntson, E. A.; France, S. C. & Mullineaux, L. S. 1999. Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 417 – 433.
- Blainville, H. M. D. 1824. *Dictionnaire des Sciences Naturelles, volume 30*. Strasbourg: F. G. Levrault. 470 pp.
- Brandt, J. F. 1835. *Prodromus Descriptionis Animalium AB H. Mertensio in Orbis Terrarum Circumnavigatione Observatorum*. Petropoli: Sumptibus Academiae. 75 pp.

- Carlgren, O. 1891. *Protanthea simplex* n. gen. n. sp., eine eigentümliche Actinie. Vorläufige Mitteilung. *Öfversigt af Kongliga Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar* 48 (2): 81 – 89.
- Carlgren, O. 1893. Studien über nordische Actinien. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 25 (10): 1 – 148.
- Carlgren, O. 1899. Zoantharien. *Hamburger Magalhaensische Sammelreise* 4 (1): 1 – 48.
- Carlgren, O. 1924a. On *Bolocerooides*, *Bunodeopsis* and their supposed allied genera. *Arkiv för Zoologi* 17A (1): 1 – 20.
- Carlgren, O. 1924b. Actiniaria from New Zealand and its Subantarctic Islands, Papers from Dr. Th. Mortensen's Pacific Expedition 1914-16]. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening* 77: 179-261.
- Carlgren, O. 1925. Zur Kenntnis der Hexacorallen. *Zoologischer Anzeiger* 65 (3/4): 87 – 99.
- Carlgren, O. 1937. On a larval Actinian parasitic within Pleurobrachia. *Kungliga Fysiografiska Sällskapet i Lund Förhandlingar* 7 (13): 1 – 7.
- Carlgren, O. 1940. A contribution to the knowledge of the structure and distribution of the cnidae in the Anthozoa. *Kungliga Fysiografiska Sällskapet Handlingar* 51 (3): 1 – 62.
- Carlgren, O. 1945. Further contributions to the knowledge of the cnidom in the Anthozoa especially in the Actiniaria. *Kungliga Fysiografiska Sällskapet Handlingar* 56 (9): 1 – 24.
- Carlgren, O. 1949. A Survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 1(1): 1 – 121.
- Carlgren, O. 1950. A revision of some Actiniaria described by A.E. Verrill. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 40 (1): 22 - 28.
- Carlgren, 1951. Actiniaria from North America. *Arkiv för Zoologi* 3 (30): 373 - 390.
- Cary, L. R. 1911. A study of pedal laceration in actinians. *The Biological Bulletin* 20: 81-108.
- Chia, F. S. 1976. Sea anemone reproduction: patterns and adaptive radiations In: Mackie, G. O. *Coelenterate ecology and behavior: Selected Papers*. New York: Plenum Press. p. 261 – 270.
- Clayton, W. S. 1985. Pedal laceration by the anemone *Aiptasia pallida*. *Marine Ecology Progress Series* 21: 75 – 80.
- Corrêa, D. D. 1964. Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste Tropical. Tese de Cátedra – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 139 pp.

- Correia, M. D. & Loyola e Silva, J. 1990. Caracterização das comunidades incrustantes e a fauna associada em painéis experimentais na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *In: II Simpósio de ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira*, 3, São Paulo – SP. p: 89 - 110.
- Cunningham, C. W. & Buss, L. W. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology* 21 (1): 57 – 69.
- Cutress, C. E. 1977. Corallimorpharia, Actiniaria, Ceriantharia *In: Devaney, D. M. & Eldredge, L. G. (Eds.). Reef and Shore Fauna of Hawaii*. Honolulu: Bishop Museum Press. p. 130 – 147.
- Daly, M.; Fautin, D. G. & Cappola, V. A. 2003. Systematics of the Hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 139: 419 – 437.
- Daly, M.; Brugler, M. R.; Cartwright, P.; Collins, A.G.; Dawson, M. N.; Fautin, D.; France, S. C.; McFadden, C.S.; Opresko, D. M.; Rodriguez, E.; Romano, S. & Stake, J. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *In: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A. (Eds). Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa* 1668: 127 - 182.
- Daly, M.; Chaudhuri, A.; Gusmão, L. & Rodríguez, E. 2008. Phylogenetic relationships among sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 292 – 301.
- Dunn, D. F. 1977. Locomotion by *Epiactis prolifera* (Coelenterata: Actiniaria). *Marine Biology* 39: 67-70.
- Dunn, D. F. 1982. Cnidaria. *In: Parker, S. P (Ed.). Synopsis and Classification of Living Organisms*, vol. 1. New York and other cities: McGraw-Hill Book Co. p. 669 - 706.
- Eldredge, L. G. & Smith, C. M. 2001. *A Guidebook of introduced species in Hawaii*. Manoa, Hawaii: Bishop Museum, XI + 60p.
- England, K. W. 1991. Nematocysts of sea anemones (Actiniaria, Ceriantharia and Corallimorpharia: Cnidaria): nomenclature. *Hydrobiologia* 216/217: 691 – 697.
- Fautin, D. G. 1988. Importance of nematocysts to actinian taxonomy. *In: Hessinger, D. A. & Lenhoff, H. M (Ed.). The Biology of Nematocysts*. San Diego and other cities: Academic Press. p. 487 – 500.
- Fautin, D. G. 2002. Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology* 80 (10): 1735-1754.

- Fautin, D. G., Zelenchuk, T. & Raveendran, D. 2007. Genera of orders Actiniaria and Corallimorpharia (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia), and their type species. *Zootaxa* 1668: 183 - 244.
- Fautin, D. G.; Crowther, A. L. & Wallace, C. C. 2008. Sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) of Moreton Bay. *Memoirs of the Queensland Museum – Nature* 54 (1): 35 - 64.
- Fautin, D. G. 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* 54: 1054-1064.
- Fautin, D. G. 2010. Hexacorallians of the World. Disponível em: <<http://geoportal.kgs.ku.edu/hexacoral/anemone2/index.cfm>> [Acesso em 28/02/2011]
- Francis, L. 1973. Clone specific segregation in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *The Biological Bulletin* 144: 64 – 72.
- Francis, L. 2004. Microscaling: Why larger anemones have longer cnidae. *Biological Bulletin* 207: 116 - 129.
- Gomes, P.B. & Mayal, E.M. 1997. Histórico dos estudos das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no Brasil. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco* 25: 111 - 119.
- Gosse, P. H. 1855. Description of *Peachia hastata*, a new genus and species of the class Zoophyta; with observations on the family Actiniadae. *Transactions of the Linnean Society (London)* 21: 267 – 276.
- Gosse, P. H. 1858. Synopsis of the families, genera and species of the British *Actiniae*. *Annals and Magazine of Natural History*. 1 (3): 414 – 419.
- Gusmão, L. C. 2010. Systematics and evolution of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria: Hormathiidae) symbiotic with hermit crabs. Tese de doutorado - The Ohio State University. 337 pp.
- Gusmão, L. C. & Daly, M. 2010. Evolution of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria: Hormathiidae) symbiotic with hermit crabs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 868 – 877.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 - 98.
- Hand, C. 1956. The sea anemones of central California Part III. The acontiarian anemones. *Wasmann Journal of Biology* 12 (3): 189 - 251.
- Hertwig, R. 1882. Report on the Actiniaria dredged by H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. In: Thomson, C. W. & Murray, J. *Report of the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873-76 under the command of Captain*

George S. Nares and Captain Frank Tourle Thomson, *Zoology* - Vol. VI. London, Edinburgh, Dublin. 328 pp.

- Hutton, F. W. 1880. Contributions to the coelenterate fauna of New Zealand. *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute* 12: 274 – 276.
- Hyman, L. H. 1940. *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. New York: McGraw-Hill Book Company. 726 pp.
- Johnson, L. L. & Shick, J. M. 1977. Effects of fluctuating temperature and immersion on asexual reproduction in the intertidal sea anemone *Haliplanella luciae* on laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 28: 141 – 149.
- Josephson, R. K. & March, S. C. 1966. The swimming performance of the sea-anemone *Bolocerooides*. *Journal of Experimental Biology* 44: 493 – 506.
- Kostina, E. E. 1988. Biogeographical characteristics of sea anemones of the Pacific boreal region. *Biologiya Morya* 3: 14-21.
- Lana, P.C.; Marone, E.; Lopes, R. M. & Machado, E. C. 2001. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. *Ecological Studies* 144: 131-145.
- Linnaeus, C. 1761. *Fauna Svecica*. Stockholm: Laurentii Salvii. 578 pp.
- Ma, X. & Purcell, J. E. 2005. Effects of temperature, salinity and predators on mortality of and colonization by the invasive hydrozoan *Moerisia lyonsi*. *Marine Biology* 147: 215 – 224.
- Lopes, R. M. (Ed.). 2009. *Informe sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil – Ministério do Meio Ambiente*. Brasília: MMA/SBF. 439 pp.
- MacGinitie, G.E. & MacGinitie, N. 1968. *Natural history of marine animals (2a ed.)*. New York: McGraw-Hill Book Co. 523 pp.
- Manuel, R. L. 1981. *British Anthozoa - Synopses of the British Fauna: new series* 18. London: Academic Press. 241 pp.
- Mariscal, R. N. 1974. Nematocysts. In: Muscatine, L. & Lenhoff, H. M. (Eds.). *Coelenterate Biology. Reviews and New Perspectives*. New York: Academic Press. p. 129 – 178.
- McCullagh, P & Searle, S. R. 2000. *Generalized linear and mixed models*. New York: John Wiley and Sons. 375p.
- Migotto, A. E.; Silveira, F. L. da; Schlensz, E. & Freitas, J. 1999. Cnidaria. In: Migotto, A. E. & Tiago, C. G. *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, 3: Invertebrados Marinhos*. São Paulo: FAPESP. xxiv + 310pp.

- Minasian Jr, L. L. 1976. Characteristics of asexual reproduction in the sea anemone *Haliplanella luciae* (Verrill), reared in the laboratory *In: Mackie, G. O. Coelenterate ecology and behavior: Selected Papers*. New York: Plenum Press. p. 289 – 298.
- Minasian Jr, L. L. 1979. The effect of exogenous factors on morphology and asexual reproduction in laboratory cultures of the intertidal sea anemone *Haliplanella luciae* (Verrill) (Anthozoa: Actiniaria) from Delaware. *Journal of experimental marine biology and ecology* 40: 235 – 246.
- Minasian, L. L. 1982. The relationship of size and biomass to fission rate in a clone of the sea anemone *Haliplanella luciae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58: 151 – 162.
- Minasian Jr, L. L. & Mariscal, R. N. 1979. Characteristics and regulation of fission activity in clonal cultures of the cosmopolitan sea anemone, *Haliplanella luciae* (Verrill). *The Biological Bulletin* 157: 478-493.
- Müller, O. F. 1776. *Zoologiae Danicae Prodrum, seu Animalium Daniae et Norvegiae Indigenarum Characteres, Nomina, et Synonyma Imprimis Popularium*. Havniae, Copenhagen: Hallageriis. 274 pp.
- Neves, C. S. 2006. Bioinvasão mediada por embarcações de recreio na Baía de Paranaguá, PR e suas implicações para a Conservação. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 71 pp.
- Oliveira, T. G. L. & Gomes, P. B. 2005. Primeira descrição do comportamento de *Bellactis ilkalyseae* (Cnidaria: Actiniaria) durante o processo de reprodução assexuada. *Tropical Oceanography* 33 (1): 67 – 72.
- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina* 64 (Supl. 1): 31 – 46.
- Östman, C.; Kultima, J. R. & Roat, C. 2010. Tentacle cnidae of the sea anemone *Metridium senile* (Linnaeus, 1761) (Cnidaria: Anthozoa). *Scientia Marina* 74(3): 511 – 521.
- Parker, G. H. 1917. Pedal Locomotion in Actinians. *Journal of Experimental Zoology* 22: 111 - 124.
- Parry, G. 1952. The Actiniaria of New Zealand. A check-list of recorded and new species a review of the literature and a key to the commoner forms, Part 2. *Records of the Canterbury Museum* 2 (6): 121 – 141.
- Pinto, S. M. 2002. Anêmonas do mar com acônchos (Anthozoa: Actiniaria, Mesomyaria): análise morfológica e molecular. Tese de doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 185 pp.

- Pires, D. O. 1988. *Tricnidactis errans* n. gen., n. sp. (Cnidaria, Actiniaria, Haliplanellidae), from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 48(3): 507 – 516.
- Purcell, J. E. 1977. Aggressive function and induced development of catch tentacles in the sea anemone *Metridium senile* (Coelenterata, Actiniaria). *Biological Bulletin* 153: 355 – 368.
- R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em [http://www.R-project.org/].
- Reft, A. J.; Westfall, J. A. & Fautin, D. G. 2009. Formation of the apical flaps in nematocysts of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria). *Biological Bulletin* 217: 25 - 34.
- Rivadeneira, M. M. & Oliva, E. 2001. Patrones asociados a la conducta de desplazamiento local de *Phymactis clematis* Dracton (Anthozoa: Actiniidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 855 - 863.
- Robson, E. A. 1961. Some observations on the swimming behaviour of the anemone *Stomphia coccinea*. *Journal of Experimental Biology* 38: 343 - 363.
- Robson, E. A. 1976. Locomotion in sea anemones: the pedal disk. In: Mackie, G. O. *Coelenterate Ecology and Behavior*. New York and London: Plenum Press. p. 479 – 489.
- Rodríguez, E.; López-González, P. J. & Daly, M. 2009. New family of sea anemones (Actiniaria, Acontiaria) from deep polar seas. *Polar Biology* 32: 703 - 717.
- Rodríguez, C. S.; Marques, A. C.; Stampar, S. N.; Morandini, A. C.; Christiansen, E.; Genzano, G. N. & Mianzan, H. W. 2011. The taxonomic position of the pelagic ‘staurozoan’ *Tessera gemmaria* as ceriantharian larva. *Zootaxa* 2971: 49 – 58.
- Sakai, A. K.; Allendorf, F. W.; Holt, J. S.; Lodge, D. M.; Molofsky, J.; With, K. A.; Baughman, S.; Cabin, R. J.; Cohen, J. E.; Ellstrand, N. C.; McCauley, D. E.; O’Neil, P.; Parker, I. M.; Thompson, J. N. & Weller, S. G. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305 – 332.
- Schmidt, H. 1972. Die nesselkapseln der Anthozoen und ihre bedeutung für die phylogenetische systematik. *Helgolander wiss. Meeresunters* 23: 422 – 458.
- Schmidt, H. 1974. On evolution in Anthozoa. *Proceedings of the 2nd International Coral Reef Symposium* 1: 533 – 560.
- Sebens, K. P. 1980. The regulation of asexual reproduction and indeterminate body size in the sea anemones *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *The Biological Bulletin* 158: 370 – 382.

- Sebens, K. P. 1998. Anthozoa: Actiniaria, Zoanthidea, Corallimorpharia, and Ceriantharia In: Pearce, J. B. (Ed.). *Marine Flora and Fauna of the Eastern United States* v. 141. Seattle: National Marine Fisheries Service. p. 1 – 67.
- Shick, J. M. 1991. *A Functional Biology of Sea Anemones*. London: Chapman and Hall. 395 pp.
- Shick, J. M. & Lamb, A. N. 1977. Asexual reproduction and population structure in the colonizing sea anemone *Haliplanella luciae*. *The Biological Bulletin* 153: 604 - 617.
- Sinniger, F.; Reimer, J. D. & Pawlowski, J. 2008. Potential of DNA sequences to identify Zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). *Zoological science* 25: 1253 – 1260.
- Smith, N. S. & Lenhoff, H. M. 1976. Regulation of frequency of pedal laceration in a sea anemone. In: Mackie, G. O. *Coelenterate ecology and behavior: Selected Papers*. New York: Plenum Press. p. 117 – 125.
- Stephenson, T. A. 1920. On the classification of Actiniaria. Part I. Forms with acontia and forms with a mesogleal sphincter. *Quarterly Journal of Microscopical Sciences* 64: 425 – 574.
- Stephenson, T. A. 1921. On the classification of Actiniaria. Part II. Consideration of the whole group and its relationships, with special reference to forms not treated in Part I. *Quarterly Journal of Microscopical Sciences* 65: 493 - 576.
- Stephenson, T. A. 1925. On a new british sea anemone. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 13: 880 - 890.
- Stephenson, T. A. 1928. *The British Sea Anemones 1*. London: The Ray Society. 148 pp.
- Stephenson, T. A. 1935. *The British Sea Anemones 2*. London: The Ray Society. 426 pp.
- Stoliczka, F. 1869. On the anatomy of *Sagartia schilleriana* and *Membranipora bengalensis*, a new coral and a bryozoan living in brackish water at Port Canning. *Journal of the Asiatic Society of Bengal* 38 (2): 28 – 63.
- Streftaris, N.; Zenetos, A. & Papathanassiou E. 2005. Globalization in marine ecosystems: the story of non-indigenous marine species across European seas. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 43: 419 - 453.
- Stuckey, F. G. A. 1909. A review of the New Zealand Actiniaria known to science, together with a description of twelve new species. *Transactions of the New Zealand Institute* 41: 374 - 398.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 – 1599.

- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673 – 4680.
- Torrey, H. B. 1902. The Hydroida of the Pacific coast of North America. *University of California Publications in Zoology* 11: 1 - 104.
- Vassallo, Marilyn T. 1969. A report on the sea anemone *Diadumene leucolea* (Verrill). *Wasmann Journal of Biology* 27 (1): 121 - 123.
- Verrill, A. E. 1866. On the polyps and echinoderms of New England, with descriptions of new species. *Proceedings of the Boston Society of Natural History* 10: 333 – 357.
- Verrill, A. E. 1869. Synopsis of the polyps and corals of the North Pacific Exploring Expedition, under Commodore C. Ringgold and Capt. John Rodgers, U.S.N., from 1853 to 1856. Collected by Dr. Wm. Stimpson, naturalist to the Expedition. Part IV. Actiniaria. *Proceedings of the Essex Institute* 6: 17 – 69.
- Verrill, A. E. 1898. Descriptions of new American actinians, with critical notes on other species, I. *American Journal of Science* 6: 493 – 498.
- Vidolin, D. 2007. Tolerância à variação de parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas-do-mar na zona entremarés de um costão rochoso no sul do Brasil. Tese de Doutorado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 61 pp.
- Watson, G. M. & Mariscal, R. N. 1983. The development of a sea anemone tentacle specialized for aggression: morphogenesis and regression of the catch-tentacle of *Haliplanella luciae* (Cnidaria, Anthozoa). *Biological Bulletin* 164 (3): 506 – 517.
- Weill, R. 1934. Contribution à l'étude des cnidaires et leurs nématocytes I e II. *Travaux de la Station Zoologique de Wimeraux* 10 - 11: 1 - 701.
- Williams, R. B. 1975. Catch-tentacles in sea anemones: occurrence in *Haliplanella luciae* (Verrill) and review of current knowledge. *Journal of Natural History* 9: 241 – 248.
- Williams, R. B. 1991. Acrorhagi, catch-tentacles and sweeper tentacles: a synopsis of 'agression' of actiniarian and scleractinian Cnidaria. *Hydrobiologia* 216/217: 539 – 545.
- Williams, R. B. 1996. Measurements of cnidae from sea anemones (Cnidaria: Actiniaria): statistical parameters and taxonomic relevance. *Scientia Marina* 60 (2 - 3): 339 - 351.
- Williams, R. B. 1998. Measurements of cnidae from sea anemones (Cnidaria: Actiniaria), II: further studies of differences amongst sample means and their taxonomic relevance. *Scientia Marina* 62 (4): 361 - 372.

- Williams, R. B. 2000. Measurements of cnidae from sea anemones (Cnidaria: Actiniaria): ranges and other measures of statistical dispersion, their interrelations and taxonomic relevance. *Scientia Marina* 64 (1): 49 - 68.
- Williams, R. B. 2003. Locomotory behaviour and functional morphology of *Nematostella vestensis* (Anthozoa: Actiniaria: Edwardsiidae): a contribution to a comparative study of burrowing behaviour in athenarian sea anemones. *Zoologische Verhandelingen* 345: 437-484.
- Won, J. H.; Rho, B. J. & Song, J-I. 2001. A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. *Coral Reefs* 20: 39 – 50.
- Wonham, M. J.; O'Connor, M. & Harley, C. D. G. 2005. Positive effects of a dominant invader on introduced and native mudflat species. *Marine Ecology Progress Series* 289: 109 – 116.
- Zabin, C. J.; Carlton, J. T.; Godwin, L. S. 2004. First report of the Asian sea anemone *Diadumene lineata* from the Hawaiian Islands. *Occasional Papers of Bernice Pauahi Bishop Museum* 79: 54 - 58.
- Zamponi, M. O. & Acuña, F. H. 1994. La variabilidad de los cnidocistos y su importancia en la determinación de clines. *Physis* 49: 7 – 18.
- Zamponi, M. O.; Belém, M. J. C.; Schlenz, E. & Acuña, F. H. 1995. *Anemofauna de águas rasas do Atlântico Sul Ocidental*. Resúmenes VI COLACMAR, Mar del Plata, p. 207.
- Zamponi, M. O.; Belém, M. J. C.; Schlenz, E. & Acuña, F. H. 1998. Distribution and some ecological aspects of Corallimorpharia and Actiniaria from shallow waters of the South American Atlantic coasts. *Physis, Secc. A* 55: 31 - 45.

Anexos

Anexo 1: Protocolo para preparação de cortes histológicos

Baseado em Pantin (1948), com adaptações sugeridas por Enio Mattos

- 1) Preparação do material: retirar sedimentos que estejam a superfície do pólipó ou em sua actinofaringe.
- 2) Desidratação do material:
 - 1 x Álcool 70% (15 min – 1h)
 - 1 x Álcool 80% (± 15 – 30 min)
 - 1 x Álcool 96% (± 15 – 30 min)
 - 3 x Álcool 100% (± 15 min; última vez pelo menos 30 min)
- 3) Diafanização do material e preparação para dissolução em parafina:
 - 3 x Xilol (cobrir os animais, não precisa de excesso) (± 15 min cada)
- 4) Infusão em parafina:
 - 1 x $\frac{1}{2}$ Parafina $\frac{1}{2}$ Xilol (tampar o frasco) (1h)
 - 2 x Parafina pura (sem tampar) (pelo menos 1h)
- 5) Blocos de parafina: Montar “caixas” retangulares de papel alumínio para emblocar as anêmonas. A “caixa” deve ter, em seu comprimento, largura e altura, pelo menos o dobro do tamanho do material. Antes de incluir as anêmonas na “caixa”, colocar uma pequena camada de parafina líquida, para que o material não se fixe na borda do bloco de parafina. Quando esta camada de parafina estiver suficientemente rígida, posicionar o material na posição correta, dependendo do tipo de corte que se deseja realizar. Espera aproximadamente três horas para que o bloco de parafina seque bem. Quando o material estiver seco, colar o bloco de parafina no bloco de madeira, que será utilizado o micrótomo, com parafina derretida. Moldar o bloco de parafina, retirando o excesso de parafina principalmente dos lados, de forma que a base ligada ao bloco seja maior que superfície que será cortada, fazendo com que o bloco de parafina tenha um formato de “prisma”. Para moldar, pode-se utilizar uma faca ou lâmina aquecidas em um bico de Bunsen. É interessante que se retire o máximo possível de parafina (sem expor o material) para caibam mais cortes histológicos em cada lâmina.
- 6) Prender o bloco de madeira com o bloco de parafina no micrótomo. Fazer os ajustes no aparelho para que os cortes sejam realizados na posição que se deseja. Os cortes realizados

formarão uma tira de parafina, que devem ser sustentados por um pincel ou pinça à medida que são feitos. Cortar as tiras no tamanho desejado (que caiba na lâmina). Durante a realização dos cortes, limpar sempre o bloco de parafina e a mesa do micrótomo com um pincel, para que as tiras não sejam cortadas em regiões indesejadas. Pode-se marcar o bloco de parafina, fazendo uma marcação em alguma das arestas do bloco, para facilitar a observação da separação entre os cortes.

7) Simultaneamente à produção dos cortes histológicos, deve-se preparar as lâminas histológicas onde os cortes serão colocados. Colocar uma gota de solução de albumina e glicerina (1:1) e espalhar bem na lâmina, com o dedo, retirando o excesso. Fazer isto até que seja formada uma camada bem fina desta solução sobre a lâmina e acrescentar água destilada com um pisquete. Após colocadas as tiras de cortes histológicos nas lâminas, adicionar um pouco mais de água destilada, para fazer com que as tiras estiquem e para facilitar seu posicionamento na lâmina. Após esticadas as tiras, tirar o excesso de água da lâmina e colocar as tiras em sua posição definitiva. Colocar as lâminas sobre uma superfície quente, para que seque toda a água e as tiras de parafina colem nas lâminas.

8) Colocar as lâminas em uma estufa, para retirar o excesso de parafina, colando o material definitivamente nas lâminas.

9) Coloração das lâminas:

9.1) Desparafinar:

- Manter lâminas na estufa por cerca de 10 minutos
- 1 x Xilol ($\pm$ 5 min)
- Verificar se a lâmina está livre de parafina. Caso não esteja, recolocar na solução de Xilol.

9.2) Hidratação do material:

- 2 x Álcool 100% (2 min)
- 1 x Álcool 96% (2 min)
- 1 x Álcool 90% (2 min)
- 1 x Álcool 80% (2 min)
- 1 x Álcool 70% (2 min)
- 1 a 4 x Água destilada (2 min)

9.3) Coloração do material:

- 1x solução de Hematoxilina (20 a 40 min)
- Retirar excesso de Hematoxilina:
 - 1 x Água da torneira corrente (10 min)
 - 1 x Álcool Ácido 5% (Álcool 70% e HCL) (rápido: $\pm$ 3 segundos)

- 1 x Água da torneira corrente (10 a 15 min)
- 1 x solução de Eosina (3 min)
- “Lavar” um pouco na água destilada (3 segundos)

9.4) Desidratação do material:

- 1 x Álcool 70% (retirar quando lâmina não estiver borrada - $\pm$ 2 min)
- 1 x Álcool 80% (2 min)
- 1 x Álcool 90% (2 min)
- 1 x Álcool 96% (2 min)
- 2x Álcool 100% (2 min)

9.5) Manter lâminas em solução de Xilol até que o momento de montagem das lâminas.

Deixar no xilol de novo, por pelo menos 20 a 30 min antes de montar.

10) Montagem das lâminas: manter as lâminas em solução de Xilol por pelo menos 30 minutos antes da montagem. Retirar as lâminas uma a uma da solução, na medida em que elas forem montadas.

- Retirar a lâmina do Xilol e pingar com uma pipeta 5 ou 6 gotas de cola ENTELLAN.
- Posicionar a lamínula sobre a lâmina e observar se a cola preenche todo o espaço entre os dois vidros. Caso não preencha, colocar a lâmina novamente no Xilol (com a lamínula) e esperar que a cola seja totalmente dissolvida (dependendo do tempo decorrente, a dissolução pode levar de alguns minutos a algumas horas). Após a dissolução completa da cola, repetir este procedimento, no entanto, acrescentando mais gotas de cola à lâmina.
- Retirar eventuais bolhas que tenham sido formadas no espaço entre a lâmina e a lamínula.
- Deixar as lâminas secarem.

Para a coloração com Tricrômico de Mallory, substituir o tópico 9.3 por:

- 1 x Solução A do Tricrômico de Mallory (10 min)
- 1 x Solução B do Tricrômico de Mallory (20 min)

Referência: Pantin, C. F. A. 1948. *Notes on microscopical technique for zoologists*. England: Cambridge University Press. 77 pp.

Anexo 2: Materiais depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

Número	Coleta	Data de coleta	Número de espécimes	Conservante	Usado em experimento
MZUSP 001533	1	21/08/2009	1	Formol	Sim
MZUSP 001534	2	23/10/2009	3	Formol	Não
MZUSP 001535	2	23/10/2009	3	Álcool	Não
MZUSP 001536	3	22/02/2010	3	Formol	Sim
MZUSP 001530	4	24/05/2010	1	Formol	Não
MZUSP 001531	4	24/05/2010	1	Formol	Não
MZUSP 001532	4	24/05/2010	6	Formol	Não
MZUSP 001537	5	23/08/2010	6	Formol	Sim

Anexo 3: Tabela comparativa das descrições de cnidoma de *Diadumene leucolena*

Bibliografia	Hand, 1956	Carlgren, 1950
Localidade	Pacífico Nordeste	Atlântico Noroeste
Tecido / Tipo de cnida	Comprimento (µm) x largura (µm)	Comprimento (µm) x largura (µm)
Tentáculos		
Espirocisto	10.0 - 23.0 x 2.0 - 4.5	
Átrico	X	22.6 - 28.2 x 6.3 - 7.0
Holótrico	X	17.6 - 24.7 x 3 - 4.2
Basítrico	13.0 - 22.0 x 2.0 - 3.0	15.5 - 18.3 x 2 - 2.8
Microbásico p-mastigóforo		19.7 - 26.2 x 4.0 - 4.5
Microbásico p-amastigóforo	18.5 - 30.5 x 3.5 - 4.5	
Capítulo		
Basítrico	8.5 - 14.0 x 1.5	
Microbásico p-amastigóforo	13.0 - 22.0 x 3.5 - 4.5	
Escapo		
Basítrico	13.0 - 21.5 x 3.0 - 4.0	
Basítrico	8.5 - 14.0 x 1.5	
Microbásico p-amastigóforo	13.0 - 24.0 x 3.5 - 4.5	
Coluna		
Basítrico		12.7 - 19.0 x 2.0
Microbásico p-amastigóforo		12.7 - 19.7 x 3.5 - 4.2
Actinofaringe		
Basítrico	15.0 - 24.0 x 2.0 - 3.0	14.8 - 18.3 x 2.0
Microbásico p-mastigóforo		21.0 - 24.0 x 3.5 - 4.5
Microbásico p-amastigóforo	21.5 - 30.5 x 3.5 - 4.5	
Filamentos		
Basítrico	7.5 - 12.5 x 1.0 - 1.5	
Microbásico p-mastigóforo	7.5 - 11.0 x 4.5 - 5.0	8.5 - 14.1 x 3.5 - 4.0
Microbásico p-mastigóforo	13.0 - 17.0 x 3.5	
Microbásico p-mastigóforo	21.5 - 31.0 x 3.5 - 4.5	
Microbásico p-amastigóforo		24.0 - 28.2 x 4.2 - 5.0
Acôncios		
Basítrico	10.5 - 20.0 x 1.5	13.0 - 16.2 x 1.5
Microbásico p-mastigóforo	22.0 - 52.0 x 6.0 - 8.0	26.8 - 39.5 x 7.0 - 8.5

Obs: As regiões das colunas marcadas com cor cinza indicam tecidos que não foram contemplados nas descrições dos autores.

Anexo 4: Tabela comparativa das descrições de cnidoma de *Diadumene lineata*

Bibliografia Localidade Tecido / Tipo de cnida	Hand, 1956 Pacífico Nordeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Carlgren, 1945 Atlântico Noroeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Manuel, 1981 Atlântico Nordeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Pinto, 2005 Rio de Janeiro Comprimento (µm) x largura (µm)
Tentáculos				
Espirocisto	13.5 - 22.5 x 3.5 - 4.5			8.8 - 17.0 x 1.5 - 4.0
Holótrico				14.0 - 18.8 x 2.0 - 3.6
Basítrico	10.5 - 19.5 x 1.0 - 1.5	11.5 - 15.5 x 2.5 - 2.8		8.5 - 17.5 x 1.4 - 2.5
Microbásico p-mastigóforo	18.5 - 27.0 x 3.5 - 4.5	16.9 - 25.4 x 3.5 - 4.2		16.0 - 25.0 x 2.0 - 5.0
Microbásico p-amastigóforo	9.5 - 14.5 x 3.5 - 4.5			7.5 - 11.5 x 2.4 - 4.0
Capítulo				
Basítrico	9.0 - 12.5 x 1.0 - 1.5			
Microbásico p-amastigóforo	9.5 - 14.5 x 3.5 - 4.5			
Escapo				
Basítrico	10.5 - 16.5 x 2.0 - 3.5			
Microbásico p-mastigóforo	12.0 - 16.5 x 3.5 - 4.0			
Coluna				
Holótrico				12.0 - 16.0 x 2.5 - 4.5
Basítrico		10.0 - 12.0 x 1.5		9.5 - 16.0 x 1.0 - 2.5
Basítrico		15.5 - 19.7 x 2.5 - 2.8		
Microbásico p-mastigóforo				14.0 - 18.5 x 3.5 - 4.5
Microbásico p-amastigóforo		12.7 - 16.9 x 1.5 - 4.2		10.0 - 13.5 x 2.0 - 4.8
Actinofaringe				
Basítrico	12.0 - 21.0 x 2.0 - 2.5	19.7 - 25.0 x 3.5 - 4.2		16.5 - 20.0 x 1.3 - 2.5
Microbásico p-mastigóforo	18.5 - 25.0 x 3.0 - 4.0			
Microbásico p-amastigóforo				19.0 - 22.7 x 2.8 - 4.0

Obs: as regiões das colunas marcadas em cinza e que não possuem valores de amplitudes de variação indicam tecidos que não foram contemplados nas descrições dos autores. As demais células cujos valores de amplitude estão marcados em cinza indicam confusões na definição do tipo de nematocisto. Em Carlgren (1950) e Pinto (2002) o problema encontrado foi na definição de microbásico p-mastigóforo e microbásico p-amastigóforo. Carlgren (1950) identificou-os da forma que estão colocados na tabela, no entanto, comenta que estes tipos podem ter sido mal determinados devido a problemas do material fixado. Já Pinto (2002) utilizou a nomenclatura de Schmidt (1972, 1974), e o tipo p-rhabdoid B2a pode ser referir a ambos esses tipos de nematocistos na nomenclatura utilizada no presente trabalho.

Bibliografia Localidade Tecido / Tipo de cnida	Hand, 1956 Pacífico Nordeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Carlgren, 1945 Atlântico Noroeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Manuel, 1981 Atlântico Nordeste Comprimento (µm) x largura (µm)	Pinto, 2005 Rio de Janeiro Comprimento (µm) x largura (µm)
Filamentos				
Basítrico	9.0 - 15.0 x 1.0 - 1.5	18.3 - 22.6 x 2.8		8.8 - 12.3 x 1.3 - 2.7
Microbásico p-mastigóforo	9.0 - 13.5 x 2.5 - 3.5			11.2 - 15.2 x 2.8 - 4.3
Microbásico p-mastigóforo	15.0 - 20.5 x 3.5 - 4.0	9.2 - 12.7 x 2.8 - 3.5		16.5 - 19.0 x 3.5 - 5.0
Microbásico p-mastigóforo	21.5 - 27.0 x 3.0 - 4.0	22.6 - 28.2 x 3.5 - 4.2		19.7 - 27.0 x 3.5 - 5.0
Microbásico p-amastigóforo	17.0 - 22.5 x 5.0 - 6.0	18.3 - 21.0 x 4.2 - 4.9		12.0 - 13.6 x 2.5 - 4.0
Acôncios				
Basítrico	13.5 - 20.5 x 2.0 - 3.0	14.0 - 18.3 x 2.2		8.8 - 17.0 x 1.4 - 2.4
Microbásico p-mastigóforo	29.0 - 47.5 x 5.0 - 6.0	32.4 - 48.0 x 4.2 - 6.5	29.0 - 48.0 x 5.0 - 6.0	38.0 - 46.8 x 4.5 - 8.0
Microbásico p-amastigóforo	12.5 - 19.5 x 3.5 - 4.0		12.0 - 20.0 x 3.0 - 4.5	10.0 - 17.9 x 2.4 - 4.5
Microbásico b-mastigóforo			12.0 - 21.0 x 2.0 - 3.0	

Obs: as regiões das colunas marcadas em cinza e que não possuem valores de amplitudes de variação indicam tecidos que não foram contemplados nas descrições dos autores. As demais células cujos valores de amplitude estão marcados em cinza indicam confusões na definição do tipo de nematocisto. Em Carlgren (1950) e Pinto (2002) o problema encontrado foi na definição de microbásico p-mastigóforo e microbásico p-amastigóforo. Carlgren (1950) identificou-os da forma que estão colocados na tabela, no entanto, comenta que estes tipos podem ter sido mal determinados devido a problemas do material fixado. Já Pinto (2002) utilizou a nomenclatura de Schmidt (1972, 1974), e o tipo p-rhabdoid B2a pode ser referir a ambos esses tipos de nematocistos na nomenclatura utilizada no presente trabalho. Manual (1981) apresenta alguns conceitos diferentes em seu trabalho (ver Introdução do livro deste autor), no entanto, o que ele chamou de microbásico b-mastigóforo provavelmente é o nematocisto do tipo basítrico.

Anexo 5: Sequência do gene mitocondrial 16S rRNA da espécie de *Diadumene* da Baía de Paranaguá.

1	10	20	30	40	50
TTGTTGGCCGGTATGAATGGCATTACGAAGGCCCCACTGTCTTAAGAGGA					
CTCTCCATGAAATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTCCATATTGTAAG					
ACGAAAAGACCCCATTTGAGCTTTACTAAAGACTTGTATGGCTCGAGATAA					
CTTAAATAAAAAGTTTAGATAATGTGGGATCCGTTTTTGGTTAATGAAAC					
ACCACTCTTTTATTTTAAGAGAGCTAACCTTGTAGGGAGAATGCAAGTTG					
GATAGTTTGGTTGGGGCGACCACCTTTTAAAAGGTAACGAAGGTGAGCTT					
AAGGTCCGTAGTTAATAACTAGTGGCCTGACTGCAAGGGAAACATCCCGA					
GCAGACACTGGG					

Anexo 6: Comparação das seqüências do gene mitocondrial 16S rRNA entre a espécie de *Diadumene* da Baía de Paranaguá, *D. cincta* e *D. lineata*

	1	10	20	30	40	50	60
<i>Diadumene</i> _Paranaguá	TTGTTGGCCGGTATGAATGGCAT	T	ACGAAGGCCCCACTGTCTTAAGAGGACTCTCCATGA				
<i>D. cincta</i> _EU190769	TTGTTGGCCGGTATGAATGGCAT	T	ACGAAGGCCCCACTGTCTTAAGAGGACTCTCCATGA				
<i>D. lineata</i> _EU190774	TTGTTGGCCGGTATGAATGGCAT	C	ACGAAGGCCCCACTGTCTTAAGAGGACTCTCCATGA				
 <i>Diadumene</i> _Paranaguá	 AATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTCCATATTGTAAGACGAAAAGACCCCATTTGAGC						
<i>D. cincta</i> _EU190769	 AATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTCCATATTGTAAGACGAAAAGACCCCATTTGAGC						
<i>D. lineata</i> _EU190774	 AATTGAATTCGTAGTGAAGATGCTACGTCCATATTGTAAGACGAAAAGACCCCATTTGAGC						
 <i>Diadumene</i> _Paranaguá	 TTTACTAAAGACTTGTATGGCTCGAGAT	A	AACTTAAATAAAAAAGTTTAGATAATGTGGGAT				
<i>D. cincta</i> _EU190769	 TTTACTAAAGACTTGTATGGCTCGAGAT	A	AACTTAAATAAAAAAGTTTAGATAATGTGGGAT				
<i>D. lineata</i> _EU190774	 TTTACTAAAGACTTGTATGGCTCGAAAT	G	AACTTAAATAAAAAAGTTTAGATAATGTGGGAT				
 <i>Diadumene</i> _Paranaguá	 CCGTTTTTGGTTAATGAAACACCACTCTTTTATTTTAAGAGAGCTAACCTTGTAGGGAGA						
<i>D. cincta</i> _EU190769	 CCGTTTTTGGTTAATGAAACACCACTCTTTTATTTTAAGAGAGCTAACCTTGTAGGGAGA						
<i>D. lineata</i> _EU190774	 CCGTTTTTGGTTAATGAAACACCACTCTTTTATTTTAAGAGAGCTAACCTTGTAGGGAGA						
 <i>Diadumene</i> _Paranaguá	 ATGCAAGTTGGATAGTTTGGTTGGGGCGACCACCTTTTAAAAGGTAACGAAGGTGAGCTT						
<i>D. cincta</i> _EU190769	 ATGCAAGTTGGATAGTTTGGTTGGGGCGACCACCTTTTAAAAGGTAACGAAGGTGAGCTT						
<i>D. lineata</i> _EU190774	 ATGCAAGTTGGATAGTTTGGTTGGGGCGACCACCTTTTAAAAGGTAACGAAGGTGAGCTT						

*Diadumene*_Paranaguá
*D. cincta*_EU190769
*D. lineata*_EU190774

AAGGTCCGTAGTTAATAA**A**CTAGTGGCCTGACTGCAAGGG**AA**ACATCCCGAGCAGACACTG
AAGGTCCGTAGTTAATAA**A**CTAGTGGCCTGACTGCAAGGG**AG**ACATCCCGAGCAGACACTG
AAGGTCCGTAGTTAATA**G**CTAGTGGCCTGACTGCAAGGG**GG**ACATCCCGAGCAGACACTG

*Diadumene*_Paranaguá
*D. cincta*_EU190769
*D. lineata*_EU190774

GG
GG
GT