



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

OS BOTRYLLINAE (TUNICATA: ASCIDIACEA) DA COSTA TROPICAL BRASILEIRA

**GLEDSON FABIANO DE ARAÚJO FERREIRA
PROF. DR. TITO MONTEIRO DA CRUZ LOTUFO
Orientador**

**FORTALEZA-CE
AGOSTO/2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**OS BOTRYLLINAE (TUNICATA: ASCIDIACEA)
DA COSTA TROPICAL BRASILEIRA**

GLEDSON FABIANO DE ARAÚJO FERREIRA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE.

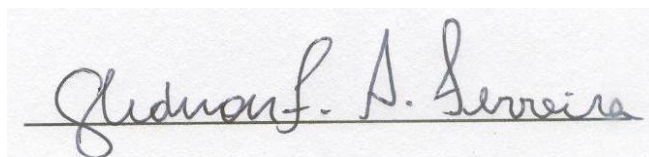
PROF. DR. TITO MONTEIRO DA CRUZ LOTUFO
Orientador

FORTALEZA-CE
AGOSTO/2007

Ferreira, Gledson Fabiano A.

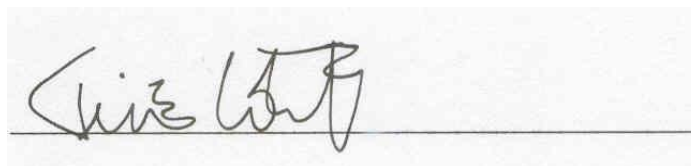
2007 Os Botryllinae (Tunicata: Ascidiacea) da
Costa Tropical Brasileira. / Gledson Fabiano de A.
Ferreira – Fortaleza: UFC / Instituto de Ciências do
Mar, Orientador : Tito Monteiro da Cruz Lotufo.
85p.
1. Ascidiacea. 2. Botryllinae. 3 Filogenia

Esta dissertação foi submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Labomar da Referida Universidade.

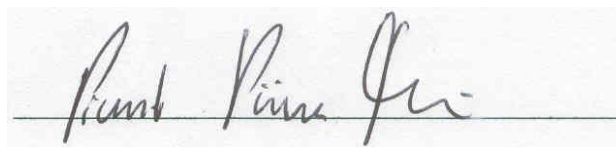


Gledson Fabiano de Araujo Ferreira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13 / 08 / 2007



Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo
Orientador da Dissertação
Presidente



Dr. Vicente Vieira Faria
Membro externo



Profª. Dra. Helena Matthews Cascon
Membro Interno

Dedico
a meus pais José Augusto e Maria José bem como
a meus grandes amigos Adilson Chaves, Andrea Karla e
Múcio Banja que me enveredaram pelos caminhos da ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de uma forma ou de outra não só neste trabalho mas também durante minha formação acadêmica nesta instituição, em especial:

A Deus por me conceder paciência, proteção e bênçãos durante todo o curso e na realização deste trabalho.

A minha família, meu firme alicerce, sempre me apoiando apesar da distância, meus pais José Augusto e Maria José, meus irmãos Geraldo, Augusto e minha irmã Gleicy, muito obrigado pela compreensão, carinho e amor dedicados.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Tito Monteiro da Cruz Lotufo, por ter me aceito como orientando, pela amizade, paciência e confiança ao longo deste curso, pela acolhida no laboratório e pelas oportunidades que me ofertou.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais por me conceder a oportunidade de realizar o curso e pela atenção prestada.

Aos professores do curso de Mestrado pela atenção e de dedicação durante as aulas.

Aos amigos e colegas do curso de mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, turma 2005.1, Anay, Cleyton, Edivar, Emanuela, Franze, Gustavo, Hassan, Rafaela, Raquel, Tecia, Ocilene, Samara e Sheila.

À Professora Dra. Cristina de Almeida Rocha Barreira do Laboratório de Zoobentos, por permitir o uso de suas instalações no início do curso e pela acolhida em seu laboratório.

A todos os amigos do zoobentos pela acolhida e ajuda em minha adaptação nos primeiros meses de minha chegada à Fortaleza.

À Professora Dra. Helena Mathews Cascon por permitir o uso das instalações do laboratório de malacologia sempre que necessário.

À amiga Jaqueline pelo auxílio sempre pronto, quando necessário.

Ao amigo Buda, pela confecção do mapa.

Ao meu compadre colombiano Gustavo Guarín Yunda pela amizade e companheirismo.

A minha amiga Sandra Velásquez pela amizade, companheirismo e aulas de espanhol.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Animal, Andréa, Arihana, Carol, Douglas, Eduardo, Fred, Natália, Ronaldo, Sula, Tereza e Wander pela amizade e conversas agradáveis.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia pelo carinho e atenção.

Aos amigos funcionários do Labomar pela acolhida e amizade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no Projeto Ascídias do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

À Marinha do Brasil pelo treinamento Pré-arquipélago preparatório para participar das expedições no arquipélago de São Pedro e São Paulo.

Enfim a todos o meu mais sincero obrigado!

A verdadeira riqueza do homem
é o bem que ele faz por seus
semelhantes (Gandhi).

RESUMO

A subfamília Botryllinae é um táxon de ascídias coloniais com ampla distribuição, ocorrendo em praticamente todos os mares do planeta. Os animais desta subfamília formam colônias incrustantes, com zoóides raramente alcançando 3mm de comprimento. O táxon compreende somente dois gêneros, *Botryllus* e *Botrylloides*, mas a validade deste último gênero ainda é discutida. O presente trabalho teve por objetivo descrever os Botryllinae da costa brasileira, estudando suas relações filogenéticas com base em dados morfológicos. Todos os lotes de botrilíneos da Coleção de Ascidiacea do Instituto de Ciências do Mar (Labomar, UFC) foram examinados, e as espécies encontradas foram identificadas. Para a reconstrução filogenética, 20 caracteres informativos foram selecionados, com base na estrutura da colônia e morfologia dos zoóides. O gênero *Symplegma* foi usado como grupo externo. O exame dos exemplares da coleção revelou a presença das seguintes espécies: *Botrylloides giganteum*, *Botrylloides nigrum*, *Botryllus humilis*, *Botryllus planus*, *Botryllus* cf. *primigenus*, *Botryllus* cf. *tuberatus*, *Botryllus schlosseri*, *Botryllus tabori* e *Botryllus* sp. n. Destas 9 espécies, somente a já conhecida *Botryllus tabori* e uma espécie nova de *Botryllus* são consideradas endêmicas. A análise cladística gerou 3 árvores igualmente parcimoniosas, nas quais a única diferença foi a posição da espécie *Botryllus schlosseri*. Foi observada a monofilia para o gênero *Botrylloides*, que teve como sinapomorfia o ovário localizado em posição ventral aos testículos. Para os *Botryllus* se observou a parafilia com a divisão em três grupos distintos.

ABSTRACT

The subfamily Botryllinae is composed of colonial ascidians present in all oceans circunglobally. The botryllinids form thin encrusting sheets, with zooids seldom reaching 3mm in length. Botryllinids comprise two genera, *Botryllus* and *Botrylloides*, but the validity of the later is currently questioned. The present work aimed to describe the Botryllinae from the Brazilian coast, studying their phylogenetic relationships based on morphological characters. All lots of botryllids from the Ascidiacea Collection of the Marine Sciences Institute (Institute de Ciências do Mar, Labomar, UFC) were examined. Twenty informative characters based on colony structure and zooid morphology, were selected for phylogenetic reconstruction. The genus *Symplesma* was used as outgroup. The survey on the collection revealed the following species from Brazilian coast: *Botrylloides giganteum*, *Botrylloides nigrum*, *Botryllus humilis*, *Botryllus planus*, *Botryllus* cf. *primigenus*, *Botryllus* cf. *tuberatus*, *Botryllus schlosseri*, *Botryllus tabori* e *Botryllus* sp. n. Among the nine species recorded, only *Botryllus tabori* and a new species of *Botryllus* are considered endemic. The cladistic analysis yielded three equally parsimonious trees, where only *Botryllus schlosseri* changed its position in the different topologies. The monophily of the genus *Botrylloides* was observed, with the ovaries located ventrally in relation to the testicles as supporting synapomorphy. *Botryllus* seems to be a paraphyletic genus, with three diverging clades.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos Botryllinae coletados ao longo do litoral tropical brasileiro.....	29
Figura 2. Colônia de <i>Botryllus giganteum</i>	30
Figura 3. Zoóide de <i>Botrylloides giganteum</i> : A. Zoóide inteiro (escala 2 mm), B. Aparelho digestivo (escala 0,4mm), C. Manto com a musculatura.....	32
Figura 4. A-B larva com suas papilas alongadas. C-D larva apresentando retração das papilas.	33
Figura 5. A. Transição de larva para zoóide. B-D. Desenvolvimento do zoóide e crescimento de suas ampolas. E. jovem zoóide com a cesta branquial desenvolvida. F. Zoóide adulto retirado da colônia.	34
Figura 6. Colônia de <i>Botrylloides nigrum</i>	35
Figura 7. Zoóide de <i>Botrylloides nigrum</i> de uma colônia do estado de Pernambuco (escala 1,2mm): A, lado esquerdo; B, lado direito.....	37
Figura 8. Zoóide de <i>Botrylloides nigrum</i> de uma colônia do estado de Alagoas (escala 1,2mm): A, lado esquerdo; B, lado direito; C Aparelho digestivo (escala 0,25mm).	37
Figura 9. Zoóide de <i>Botrylloides nigrum</i> de uma colônia do estado do Rio de Janeiro (escala 0,6mm): A, lado esquerdo; B, lado direito C- Musculatura.	38
Figura 10. Colônia preservada <i>Botryllus humilis</i>	38
Figura 11. <i>Botryllus humilis</i> , A: forma da colônia (escala 1 mm); B: Zoóide (escala 0,8mm); C: Manto com musculatura; D: larva encubada (escala 0,3 mm); E: Vista superior do zoóide.....	40
Figura 12. Colônia de <i>Botryllus planus</i>	41
Figura 13. Zoóides de <i>Botryllus planus</i> : A: lado esquerdo; B: lado direito; C: Musculatura presente no manto do zoóide; D: Zoóide com um brotamento acima dos folículos testiculares.	43
Figura 14. A: zoóide de <i>Botryllus cf. primigenus</i> (escala 0,6mm), B: musculatura do zoóide.....	45
Figura 15. Colônias de <i>Botryllus schlosseri</i>	47
Figura 16. A: Zoóide de <i>B. schlosseri</i> (escala 1,2mm); B: Zoóide com feixes musculares (escala 0,3mm).	48
Figura 17. Fotografia de colônias de <i>Botryllus tabori</i>	49
Figura 18. Zoóide de <i>Botryllus tabori</i> , A: lado esquerdo; B: lado direito, com dois ovos; C: manto com a musculatura.	50
Figura 19. Colônia de <i>Botryllus cf. tuberatus</i>	51
Figura 20. <i>Botryllus cf. tuberatus</i> , A: Forma dos sistemas da colônia (escala 4 mm), B-C: zoóide 0,5mm; D: zoóide incubador de larvas.	53
Figura 21. Colônia preservada de <i>Botryllus sp.n.</i>	53
Figura 22. A: Zoóide de <i>Botryllus sp. n.</i> (escala 0,8mm); B: Musculatura do manto.	55
Figura 23. Caracteres dos zoóides utilizados na análise filogenética: A, Zoóide e respectivas estruturas morfológicas; B, musculatura sobre o manto; C, linhas indicando ovos e abertura atrial.	58
Figura 24. Topologia dos três cladogramas mais parcimoniosos encontrados na análise.	73
Figura 25. Cladograma de consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosa. ...	74

Figura 26. Um dos cladogramas mais parcimoniosos (clad. C), seus caracteres e respectivas mudanças de seus estados. Números em negrito correspondem aos nós, os demais aos caracteres e seus estados para cada táxon. 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista atual das espécies de Botryllinae que ocorrem em todo o mundo.	22
Quadro 2. Características dos Botryllinae utilizadas pelos diferentes autores na identificação dos gêneros (adaptado de Monniot & Monniot, 1987).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracteres e seus respectivos estados utilizados na análise filogenética.	57
Tabela 2. Matriz polarizada de estados de caracteres morfológicos das espécies analisadas. Os números dos caracteres correspondem àqueles do item 4.2.1. Sinais de ? indicam incertezas quanto ao estado do caráter.....	69

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral:	25
2.2 Objetivos específicos:	25
3 - MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material examinado:	26
3.2 Análise cladística	27
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....	28
4.1 Revisão dos Botryllinae:.....	28
4.2 Análise filogenética:	56
4.2.1. Descrição dos caracteres:	58
4.2.2. Filogenia	70
5 - CONCLUSÕES	81
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS.....	90

1 - INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é conhecido por abrigar uma grande diversidade faunística e florística em seus vários ecossistemas. Neste ambiente estão inseridas as ascídias, como são comumente conhecidos os representantes da classe Ascidiacea do subfilo Tunicata (=Urochordata). Dentre os tunicados a classe Ascidiacea é a que contém a maior diversidade, com cerca de 2500 espécies em todo mundo (C. Lambert, 2005). Os representantes deste grupo são animais exclusivamente marinhos, e estão presentes desde regiões costeiras rasas (região entremarés), até grandes profundidades. Constituem um grupo de animais sésseis, incrustantes, essencialmente bentônicos e de hábito filtrador, alimentando-se do fitoplâncton e de partículas orgânicas presentes na água (Van Name, 1945; Millar, 1971). Todas as ascídias são hermafroditas, mas muitas não podem fertilizar seus próprios ovos por serem protândricas ou protóginas, apresentando maturação gonadal em épocas distintas (G. Lambert, 2005). Elas podem reproduzir-se basicamente de três formas: por reprodução assexuada através de brotamento, que ocorre somente em algumas famílias; fissão de colônias, um processo registrado em algumas espécies e reprodução sexual, que ocorre universalmente em todo o grupo (Millar, 1971).

Os Ascidiacea possuem características extremamente importantes em diferentes aplicações: por serem animais filtradores, são especialmente afetadas por poluentes presentes na água do mar e por esta razão podem ser utilizados como bioindicadores no monitoramento da qualidade de água em regiões potencialmente impactadas (Papadopoulou & Kaniyas, 1977; Carballo & Naranjo, 2002). Outra característica importante deste grupo animal é a habilidade de sintetizar substâncias bioativas de grande interesse farmacológico e medicinal, possuindo algumas substâncias com potentes atividades antitumorais já isoladas a partir de extratos destes animais (Jimenez et al. 2003; Nieves, 1995). Além disso, são constituintes de uma importante comunidade ecológica incrustante denominada "*fouling*", estando presentes em várias etapas da sucessão ecológica (Rocha, 1991). Como organismo incrustante, representa também graves

problemas à maricultura, crescendo sobre organismos cultivados (Delby & Young, 1993), à navegação, aumentando o arrasto das embarcações e crescendo em outras estruturas submersas causando danos principalmente em tubulações metálicas em portos (Silva, 2003).

Uma preocupação recente não só com as ascídias, mas também com outros grupos, tem sido com a introdução de espécies exóticas, pois algumas espécies podem apoiar longos deslocamentos, sendo transportadas de um lugar a outro por ação humana (por meio de água de lastro, fixados em casco de embarcações ou sobre sementes de animais cultiváveis) (Lambert, 2002). Essas espécies podem colonizar essas novas localidades, adaptando-se bem às condições ambientais do novo ambiente, competindo e dominando estes locais por ausência de seu predador natural, e com isso comprometendo a sobrevivência de espécies nativas (Lambert, 2002; 2007; Tyrrell & Byers, 2006).

Apesar dessas características, não é fácil reconhecer uma ascídia como tal, uma vez que são animais que possuem uma aparência incomum, com uma grande diversidade de formas e cores, sendo muitas vezes confundidos com outros grupos animais como Porífera, Cnidária e Mollusca. Elas se apresentam sob duas formas de vida, podendo ser solitárias, onde há um único indivíduo que mantém uma túnica envolvendo todo o corpo, e coloniais ou compostas, onde vários indivíduos, conhecidos como zoóides, estão presentes sob uma túnica comum (Millar, 1971). Essas diferentes formas e cores, aliadas ao pouco conhecimento do grupo, geraram problemas de classificação no passado, quando o grupo foi considerado pelos antigos naturalistas como pertencente ao filo Mollusca (Van Name, 1945; C. Lambert, 2005). No entanto, estudos publicados por Kowalevsky (1867 apud C. Lambert, 2005) demonstraram uma outra realidade. Em seu trabalho, o referido autor apresentou detalhadamente o desenvolvimento e estrutura dos ovos e larvas de *Ciona intestinalis* e *Phallusia mammillata* e apontou suas afinidades com os cordados, principalmente pela presença de estruturas muito características como notocorda, tubo dorsal oco e uma ampla faringe repleta de fendas. A partir destes estudos muitos outros se seguiram até que as ascídias foram incluídas no filo Chordata (mesmo filo que os

vertebrados) dentro do Subfilo Tunicata (=Urochordata). Porém, a discussão sobre a real posição taxonômica dos Tunicata não parou por aí. Estudos mais recentes sobre a reconstrução filogenética dos cordados, como os de Swalla (2001) e Zeng & Swalla (2005), baseados em dados moleculares, analisando a região 18s rDNA dos cordados e no plano corporal de tunicados adultos, tem sugerido que os Tunicata deveriam ser elevados à categoria de filo, separando-os assim do filo Chordata, uma vez que os Tunicata apresentariam muitas divergências em relação aos demais cordados. Por outro lado, Delsuc et al. (2006) não concordam com esta visão dos tunicados separados dos cordados. Os autores (op. cit.) utilizando-se de métodos de estudos genômicos de treze representantes dos Cordados, (incluindo Cephalochordado, Tunicados e Vertebrados), apontaram em seus estudos que os tunicados seriam mais próximos dos vertebrados que os cefalocordados, considerando assim os tunicados como grupo irmão dos vertebrados, diferente do que têm sido mostrado em outros trabalhos. Por tanto não há ainda um consenso sobre a posição dos tunicata em relação aos Chordata. Além disso, poucos trabalhos abordam aspectos relacionados à biologia, ecologia e sistemática dos Ascidiacea (maior representante dos tunicados) como um todo. Entre as revisões mais relevantes que abordam esses aspectos podem ser citados trabalhos envolvendo desenvolvimento embrionário (Berril, 1936, 1940, 1941), taxonomia (Van Name, 1945; Tokioka, 1953, 1967; Millar, 1966, 1970; Kott, 1985, 1990, 1992; Monniot et al., 1991), biologia (Millar, 1971), Fisiologia (Goodbody, 1974; Sawada *et al.*, 2001) e sínteses recentes sobre aspectos de biologia reprodutiva (C. Lambert, 2005) e ecologia e historia de vida (G. Lambert, 2005).

Apesar de estarem presentes em quase todos os mares, as ascídias são ainda muito pouco conhecidas em algumas regiões do planeta. A costa brasileira tem aproximadamente 8.500 km de extensão, dois terços dos quais estão nos trópicos, com uma grande variedade de habitats para as ascídias (Rocha & Berlinck, 2001). O Brasil representa ainda uma grande lacuna no que se refere ao conhecimento da fauna de ascídias (Lotufo, 2002). A literatura a respeito do grupo ainda é escassa para essa região, resumindo-se aos trabalhos de Van Name (1945), Moure et al. (1954), Björnberg (1956), Millar (1958, 1961, 1977), Rodrigues

(1962, 1964, 1966, 1977), Monniot (1969/70, 1994), Simões (1981), Rocha (1988, 1991, 1995b, 2002a, 2002b), Aron & Solé-Cava (1991), Rocha & Monniot (1993, 1995a), Rodrigues & Rocha (1993), Lotufo (1997, 2002), Rocha & Nasser (1998), Rocha *et al.* (1999), Rocha & Moreno (2000), Rocha & Berlinck (2001), Dias & Rodrigues (2004), Rocha & Kremer (2005) Rocha *et al.* (2005) e Lotufo & Silva (2006).

Além do pouco conhecimento da fauna, existem também muitos problemas relativos à sistemática e taxonomia do grupo a serem solucionados. No Brasil, os grupos de pesquisa em Ascidiacea têm dado sua contribuição para tentar solucionar alguns destes problemas.

Lotufo (2002) realizou em seu trabalho um dos levantamentos mais extensos sobre os Ascidiacea, ao longo da região tropical brasileira, contabilizando um total de 98 espécies distribuídas em 2 ordens, 3 subordens, 31 gêneros incluídos em 14 dentre as 23 famílias propostas atualmente. Além disso, foram também registradas 9 novas ocorrências para o litoral brasileiro, com a descrição de um novo gênero, 10 espécies novas e 8 espécies tiveram sua situação alterada por sinonímia ou separação. O autor (*op. cit.*) verificou que há um padrão de distribuição em Ascidiacea para este litoral, semelhante àquele observado em outros grupos bentônicos sésseis, com a divisão da região estudada em duas províncias, a Província Brasileira e a Província Paulista.

Couto (2003) realizou uma revisão sobre o gênero *Symplegma* (Styelidae), analisando espécies coletadas em São Sebastião-SP e estado da Flórida, EUA. A autora analisou 83 colônias com 15 padrões diferentes de pigmentação que foram reunidas em 4 possíveis espécies, duas já registradas para a região: *S. brakenhielmi* e *S. rubra*; e duas outras novas. Além disso, foi realizada também uma revisão dos caracteres que poderiam diferenciar as espécies.

Moreno (2004) reconstruiu pela primeira vez a filogenia da ordem Aplousobranchia com suas 14 famílias, utilizando caracteres morfológicos. A autora observou que Aplousobranchia, tal como definida por Kott (1969, 1990, 1992), não constituiria um grupo monofilético, uma vez que, *Perophora*, mesmo tendo sido definido como grupo externo por tradicionalmente pertencer à ordem

Phlebobranchia, apareceu no cladograma como parte do grupo interno. A referida autora verificou que muitas das famílias propostas por Kott constituíram grupos monofiléticos. Sendo assim, a autora propõe que a ordem passe então a ser constituída por 17 famílias (duas novas), e mais alguns táxons com posição incorreta, além de realizar também uma extensa discussão sobre a validade dos caracteres analisados.

Estudos em regiões portuárias brasileiras a fim de monitorar a introdução de espécies exóticas também são escassos, contando apenas com um trabalho realizado por Rocha & Kremer (2005), na região portuária da Baía de Paranaguá, estado do Paraná. Foram registradas a presença de três espécies consideradas nativas, uma com indicação de introdução inter-regional, duas possivelmente introduzidas e 12 criptogênicas.

Em face do pequeno volume de informações disponíveis até o momento, se faz necessário maior empenho e incentivo para estudo dos Ascidiacea no litoral brasileiro, no intuito de aumentar o conhecimento sobre grupo nessa extensa e diversa região.

Dentre os diversos táxons de Ascidiacea, a família Styelidae Sluiter, 1895 é certamente uma das mais diversificadas e uma das únicas a incluir tanto espécies solitárias como coloniais (Kott, 2005). Os representantes desta família apresentam tentáculos orais simples, cesta branquial com 4 pregas e uma lâmina dorsal simples, não dividida em lingüetas. A região pilórica do intestino é expandida no estômago, e sua parede é formada por dobras longitudinais paralelas. Existe freqüentemente um ceco gástrico, mas nenhum divertículo hepático. Geralmente há mais de uma gônada em cada lado do corpo. Os stielídeos consistem de três subfamílias: Styelinae, Polyzoinae e Botryllinae, que são diferenciadas principalmente pela forma de vida (solitária ou colonial), presença e número de dobras no cesto branquial, e a formação de sistemas cloacais. A subfamília Styelinae apresenta formas solitárias com quatro pregas branquiais nítidas em cada lado da cesta branquial. Polyzoinae agrupa espécies coloniais que não formam sistemas, e geralmente possuem pregas branquiais reduzidas ou ausentes. Os Botryllinae também apresentam espécies coloniais, sempre sem

pregas branquiais, mas geralmente apresentando três vasos longitudinais na cesta branquial. Além disso, os Botryllinae formam sistemas com uma cloaca comum (Kott, 1985).

Dentre os Styelidae, os Botryllinae são aqueles que mostram maior grau de integração entre os zoóides, estando todos embutidos na túnica comum e formando sistemas com cloacas, de maneira que apenas o sifão branquial de cada zoóide abre-se na superfície da colônia. Os membros deste pequeno grupo possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo tanto em mares tropicais como em temperados (Kott, 2005).

Todas as espécies do grupo são coloniais, com crescimento modular clonal por meio de ampolas vasculares entre os zoóides e nas margens das colônias. Os zoóides medem geralmente cerca de 2 mm de comprimento, não possuem pregas na cesta branquial, mas apenas três vasos longitudinais de cada lado da cesta. A forma da colônia e dos sistemas, o número de fendas na cesta branquial e a forma e posição das gônadas têm sido os caracteres mais importantes na identificação das espécies desta subfamília (Kott, 1985).

A subfamília Botryllinae foi criada por Adams & Adams (1858 *apud* Kott, 1985), e incluídas dentro da família Styelidae. No entanto, os botrilídeos foram descritos pela primeira vez por Carl Friedrich Von Gaertner em 1774, com parte de uma publicação de P. S. Pallas intitulada “Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur. fasc:X, Berlin.” (Monniot, comunicação pessoal). Alguns autores referem-se aos Botryllinae como família Botryllidae, seguindo classificação de Van Name (1945), e essa classificação tem sido seguida por Okuyama & Saito (2001, 2002), Hirose (2003) e Saito & Nagasawa (2003). No entanto, a maioria dos especialistas continuam aceitando Botryllinae como subfamília de Styellidae, como Monniot (1972), Kott (1985, 2003), Monniot & Monniot (1987), Monniot (1988), Shenkar & Monniot (2006). Segundo Zeng & Swalla, (2005) e Zeng et al. (2006) esta é a filogenia que mais se adéqua aos Botryllinae, e por tanto, foi assim utilizada neste trabalho.

Nesta subfamília atualmente são considerados válidos dois gêneros, *Botryllus* Gaertner, 1774 e *Botrylloides* Milne-Edwards, 1841. Estes possuem espécies distribuídas por todos os mares, do Ártico ao Antártico. Em todo mundo estima-se que existam cerca de 35 espécies de Botryllinae (Quadro. 1).

Quadro 1. Lista atual das espécies de Botryllinae.

Espécies	Referências
<i>Botrylloides aureum</i> Sars, 1815 sensu Skalkin, 1959	Nishikawa, 1991
<i>Botrylloides diegensis</i> Ritter & Forsyth, 1917	Van Name, 1945
<i>Botrylloides fuscus</i> Saito & Watanabe (1985)	Saito & Watanabe (1985)
<i>Botrylloides giganteum</i> (Peres, 1949)	Aron & SoleCava, 1991
<i>Botrylloides lateritium</i> Beniaminson, 1975	Nishikawa, 1991
<i>Botrylloides leachi</i> (Savigny, 1816)	Millar, 1970
<i>Botrylloides lenis</i> Saito & Watanabe, 1985	Saito & Watanabe, 1985
<i>Botrylloides magnicoecum</i> (Hartmeyer, 1912)	Monniot, 1972
<i>Botrylloides nigrum</i> Herdman, 1886	Van Name, 1945
<i>Botrylloides perspicuum</i> Herdman, 1886	Kott, 1985
<i>Botrylloides sacus</i> Kott, 2003	Kott, 2003
<i>Botrylloides simodensis</i> Saito & Watanabe, 1981	Saito & Watanabe, 1981
<i>Botrylloides violaceus</i> Oka, 1927	Monniot, 1988
<i>Botryllus anomalus</i> Millar, 1962	Millar, 1962
<i>Botryllus arenaceus</i> Monniot, 1988	Monniot, 1988
<i>Botryllus compositus</i> Tokioka, 1967	Tokioka, 1967
<i>Botryllus delicatus</i> Okuyama & Saito, 2001	Okuyama & Saito, 2001
<i>Botryllus eilatensis</i> Monniot & Shencar, 2006	Monniot & Shencar, 2006
<i>Botryllus gracilis</i> Michaelsen, 1927	Monniot, 1988
<i>Botryllus horridus</i> Saito & Okuyama, 2003	Saito & Okuyama, 2003
<i>Botryllus humilis</i> Monniot, 1988	Monniot, 1988
<i>Botryllus leptus</i> (Herdman, 1899)	Monniot, 1988
<i>Botryllus ovalis</i> Monniot, 1988	Monniot, 1988
<i>Botryllus planus</i> (Van Name, 1902)	Van Name, 1945
<i>Botryllus primigenus</i> Oka, 1928	Van Name, 1945
<i>Botryllus promiscuus</i> Okuyama & Saito, 2002	Okuyama & Saito, 2002
<i>Botryllus puniceus</i> Saito & Nagasawa, 2003	Saito & Nagasawa, 2003
<i>Botryllus purpureus</i> (Oka, 1932)	Kott, 1985
<i>Botryllus scalaris</i> Saito & Mukai, 1981	Saito & Mukai, 1981
<i>Botryllus schlosseri</i> (Pallas, 1766)	Van Name, 1945
<i>Botryllus stewartensis</i> Brewin, 1958	Kott, 1985
<i>Botryllus tabori</i> Rodrigues (1962)	Rodrigues (1962)
<i>Botryllus tuberatus</i> Ritter & Forsyth, 1917	Van Name, 1945
<i>Botryllus tyrius</i> (Herdman, 1886)	Tokioka, 1967

No Brasil sabe-se da ocorrência de seis espécies de Botryllinae: duas do gênero *Botrylloides* (*Botrylloides giganteum* e *Botrylloides nigrum*) e quatro do gênero *Botryllus* (*Botryllus tabori*, *B. schlosseri*, *B. tuberatus* e *Botryllus planus*) (Lotufo, 2002). A mesma riqueza de espécies ocorre na região do Caribe e Antilhas, três *Botrylloides* (*Botrylloides perspicuum*, *B. nigrum*, *B. magnicoecum*) e dois *Botryllus* (*B. planus* e *B. tuberatus*) (Van Name, 1945; Hernández-Zanuy & Carballo, 2001; Goodbody, 2005).

Assim como em outros grupos, os Botryllinae possuem uma gama muito restrita de caracteres utilizados na sua taxonomia, o que além de dificultar a correta diagnose da espécie, inviabiliza por completo estudos da sua filogenia (Kott, 1985). Monniot & Monniot (1987) apresentaram a proposta de unificação de ambos os gêneros de Botryllinae, baseando-se na existência de uma espécie com características intermediárias. Esses autores não concordam com os atuais caracteres utilizados para a distinção dos gêneros. No Quadro 2 se encontra a lista de autores apontados por Monniot & Monniot (1987) com os caracteres considerados por eles como inconsistentes para a distinção entre os dois gêneros.

Quadro 2. Características dos Botryllinae utilizadas por diferentes autores na identificação dos gêneros (adaptado de Monniot & Monniot, 1987).

Autores	<i>Botryllus</i>	<i>Botrylloides</i>
Milne-Edwards, 1841	Sistemas estrelados, zoóides inclinados.	Sistemas meandriformes, zoóides retos.
Herdman, 1886	Sistemas estrelados	Sistemas meandriformes
Hartmeyer, 1911	Sistemas estrelados	Colônias delgadas (<i>Botrylloides</i>); colônias espessas (<i>Sarcotrylloides</i>).
Arnaback, 1923	Vários ovos simultâneos: incubação na cavidade cloacal, mas podem formar protuberâncias no exterior.	Um único ovo por ovário: incubação em forma de hérnia no exterior do corpo (sob o nome de <i>Metrocarpa</i>)
Van Name, 1945	Um ovário ou mais de cada lado anterior ou dorsal em relação aos testículos, sem bolsa incubadora, os embriões são incubados na cavidade peribrânquial.	Um ovário de cada lado, posterior aos testículos. Os ovos são incubados em uma bolsa em forma de saco que forma uma excrescência da parede do corpo.
Kott, 1985	Ovário anterior ao testículo. Embriões aderidos ao manto se desenvolvendo na cavidade cloacal.	Um único ovo de cada lado ligeiramente dorsal e anterior em relação ao testículo, Embriões desenvolvendo-se em uma excrescência da parede do corpo.
Saito & Watanabe, 1985	Sem bolsa incubadora ovovivípara	Com bolsa incubadora ovovivípara e vivípara.

Estudos recentes com botrilíneos foram realizados no Japão pelo grupo do pesquisador japonês Yasunori Saito, que escreveu uma série de trabalhos descrevendo novas espécies e estudando suas respectivas histórias de vida (Okuyama & Saito, 2001; Okuyama & Saito 2002; Saito & Nagasawa, 2003; Saito & Okuyama, 2003). Saito e seu grupo realizaram também alguns estudos sobre os mecanismos de alorechecimento e alorejeição que são apresentados naturalmente por estes organismos, sempre procurando entender o funcionamento do sistema imune destes invertebrados. Tais estudos são importantes uma vez que estes animais são evolutivamente próximos dos vertebrados e o bom entendimento desses mecanismos irá contribuir para uma melhor compreensão sobre funcionamento do sistema imune em transplantes de órgãos e tecidos em humanos (Saito et al., 1994; Hirose, 2003). No entanto seus estudos pouco se detiveram na discussão sobre a distinção dos gêneros de botrilíneos, tendo

dedicado apenas um trabalho sobre a filogenia do grupo, baseando-se em dados moleculares (região 18S RNA), caracteres morfológicos e história de vida (Saito et al., 2001). Neste estudo, o autor (op.cit.) faz uma rápida avaliação dos critérios de classificação utilizados no passado para a distinção dos gêneros e considerou Inválidos caracteres como o arranjo dos sistemas e a presença de saco incubador, uma vez que eles aparecem em ambos representantes dos gêneros. Além disso ele argumentou que somente o arranjo gonadal é a característica fundamental para a distinção dos gêneros.

Portanto, os caracteres necessários para a determinação das espécies não foram ainda resolvidos e a taxonomia da subfamília necessita de uma revisão (Kott, 2003; Shenkar & Monniot, 2006).

Com o propósito de contribuir para a solução deste problema, o presente trabalho tem por objetivo realizar uma detalhada revisão da subfamília, com proposição de novos caracteres que permitam uma diagnose precisa e possibilite uma melhor inferência da história da diversificação do grupo no Atlântico Tropical Brasileiro.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Descrever os Botryllinae da costa brasileira, estudando suas relações filogenéticas.

2.2 Objetivos específicos:

Determinar com segurança as espécies de Botryllinae que ocorrem no Brasil.

Fornecer novos caracteres que permitam identificações mais precisas.

Formular uma hipótese sobre a filogenia do grupo com base em caracteres morfológicos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material examinado:

Os animais utilizados neste estudo foram em sua maioria coletados durante o Projeto Ascídias do Litoral Brasileiro, em um total de 61 localidades distribuídas ao longo da costa tropical brasileira, do estado do Rio de Janeiro até o estado do Ceará, durante o período de 06/10/1998 a 25/03/2001.

Todos os exemplares encontram-se depositados na coleção de Ascidiacea do Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Ciências do Mar da UFC. Os exemplares foram removidos do substrato com o auxílio de uma espátula, anestesiados com cristais de mentol ou m-aminobenzoato de etila e fixados em formol salino a 4%. Para a dissecação dos animais os mesmos foram transferidos posteriormente do formol e encontram-se conservados em álcool etílico 70%. As colônias examinadas totalizaram 38 espécimes de botrílineos que foram selecionados da coleção.

Os animais foram dissecados e sua morfologia externa e interna foi observada com o auxílio de um estereomicroscópio. O uso do corante Hemalum de Masson foi essencial para uma boa visualização da estrutura interna dos zoóides, uma vez que muitos deles medem cerca de 0,5 mm, de forma que o corante auxilia numa melhor visualização de pequenas estruturas. Esse corante pode ser preparado como descrito por Lotufo (2002).

Alguns zoóides e suas estruturas, depois de corados e manuseados, foram montadas em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá para observação em microscópio composto. Foram realizados também registros fotográficos bem como desenhos a mão livre de todos os exemplares examinados. Os principais caracteres utilizados na identificação foram levantados e a observação de estruturas ainda não utilizadas por outros autores foram anotadas e descritas no decorrer deste trabalho.

3.2 Análise cladística

Todos os caracteres morfológicos observados e passíveis de utilização na sistemática foram reunidos e inseridos em uma matriz de dados polarizada por meio de grupo externo. No total foram levantados 25 caracteres, sendo que 5 foram excluídos por serem pouco informativos, restando então 20 caracteres para a análise. Dentre os caracteres multi-estado, três foram considerados como sendo ordenados (3, 14, 16) e os 17 restantes atribuídos como não ordenados, todos considerados como tendo igual peso. A descrição completa dos caracteres está incluída nos resultados apresentados.

Como grupo externo se utilizou duas espécies do gênero *Symplegma*: *Symplegma rubra* e *S. brakenhielmi*. Este gênero de Styelidae é considerado próximo dos Botryllinae por ser colonial, com zoóides completamente embebidos em uma túnica comum, saco branquial sem pregas e com um número limitado de vasos longitudinais internos, gônadas únicas em cada lado do corpo e um extenso sistema de vasos com que crescem por meio de ampolas terminais (Kott, 1985). Desta forma, a polarização dos caracteres foi efetuada por comparação com o grupo externo.

Por meio de consulta à literatura duas outras espécies do gênero *Botrylloides* com registro para o atlântico tropical mas que não ocorrem no Brasil também foram incluídas: *Botrylloides leachi* e *B. magnicoecum* (Millar, 1962; Monniot, 1972; Monniot, 1983; Kott, 1985). A inclusão dessas espécies fez-se necessária pois um dos aspectos que estava sendo examinado era a monofilia do gênero *Botrylloides*.

A matriz de dados foi analisada utilizando-se o software PAUP*4 (Swofford, 2001). A busca da topologia mais parcimoniosa foi realizada por busca heurística, com otimização dos estados pelo método ACCTRAN (accelerated transformations). Quando não foi possível determinar o estado de algum caráter para a espécie, a rotina o tratou como incerteza. As árvores de consenso foram obtidas pela regra de consenso estrito.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Revisão dos Botryllinae:

A revisão das 38 colônias de Botryllinae da coleção de Ascidiacea do litoral brasileiro resultou na identificação de nove espécies de Botryllinae. O registro anterior, feito por Lotufo (2002) assinalava apenas seis espécies, de forma que se adicionou uma espécie nova e dois possíveis registros. As espécies encontradas foram *Botrylloides giganteum*, *Botrylloides nigrum*, *Botryllus humilis*, *Botryllus planus*, *Botryllus* cf. *primigenus*, *Botryllus* cf. *tuberatus*, *Botryllus schlosseri*, *Botryllus tabori* e *Botryllus* sp. n. Com exceção da espécie endêmica *Botryllus tabori* e da espécie nova *Botryllus* sp. n., todas as outras possuem distribuição mais ampla, algumas com ocorrência também em regiões temperadas (Van Name 1945).

O reexame deste material melhorou substancialmente o conhecimento sobre a distribuição das espécies desta subfamília, levando em consideração o que havia sido reportado por Lotufo (2002).

Como exemplo, a espécie *Botryllus humilis* descrita por Monniot (1988) para a Nova Caledônia, e previamente registrada para o litoral paulista (Lotufo, 1997), apresentou exemplares ocorrendo desde o litoral do Rio de Janeiro até o litoral alagoano (Fig.1).

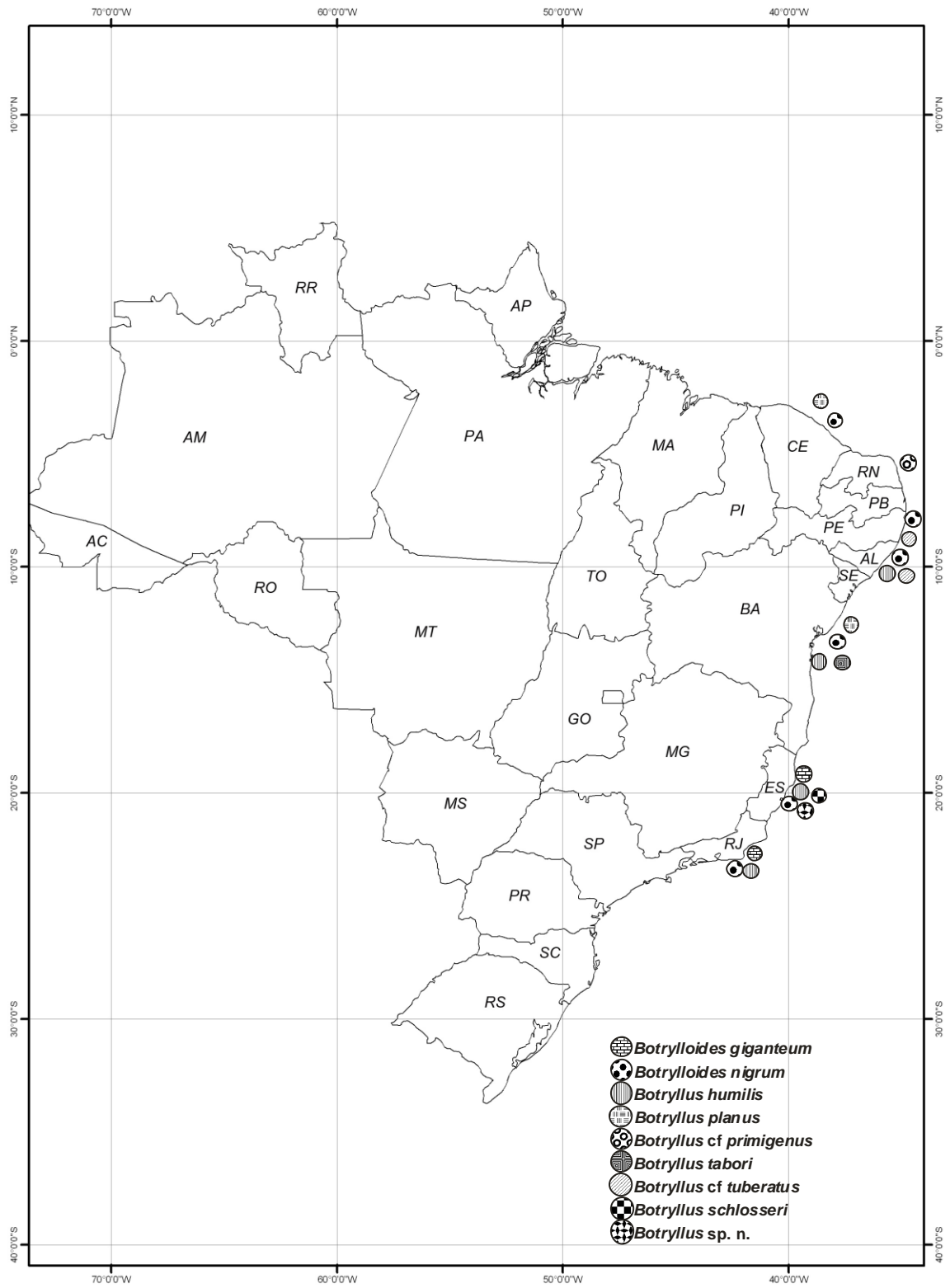


Figura 1. Distribuição dos Botryllinae coletados ao longo do litoral tropical brasileiro.

Outra espécie que apresentou algumas diferenças foi *Botrylloides nigrum*, que se mostrou a espécie com a maior distribuição, ocorrendo em quase todas as localidades com presença de botrílineos.

A maioria das espécies distribui-se ao longo de praticamente toda a costa tropical, mas espécies como *Botrylloides giganteum*, *Botryllus schlosseri* e *Botryllus* sp. n. ocorrem apenas no sudeste. Por outro lado, *Botryllus planus*, *B. cf. tuberatus*, *B. cf. primigenus* ocorrem exclusivamente no nordeste. Neste estudo *Botryllus tabori* também ocorreu apenas para o nordeste, porém foi descrita na região sudeste para o litoral paulista por Rodrigues (1962).

A seguir são apresentadas as espécies que foram encontradas na costa tropical brasileira:

***Botrylloides giganteum* Peres, 1949**



Figura 2. Colônia de *Botryllus giganteum*.

Sinonímia:

Metrocarpa nigrum var. *Giganteum* Pérès, 1949: 205, figs. 26-27, Senegal.
Botrylloides nigrum var. *giganteum*: Millar, 1954: 195, fig. 23 Africa do Sul (Índico); Monniot C., 1969a: 628, fig. 3 A-B, Senegal.
Botryllus giganteum: Aron & Sole-Cava, 1991: 272, Brasil; Rodrigues & Rocha, 1993: 735, Brasil; Rodrigues et al., 1998: 106, fig. 30, Brasil.

Material examinado:

2 espécimes do forte São Mateus, Cabo Frio-RJ, coletados na região entremarés em 06/10/1998.

1 espécime de Búzios-RJ, coletado no entremarés em 07/10/1998.

1 espécime da Ilha Grande, Píer do Abraão-RJ, coletado no entremarés em 20/10/1998.

1 espécime de Camburi, Vitória- ES, coletado em 17/05/1999.

Aspecto da colônia:

Colônias irregulares, incrustantes, de coloração que varia do laranja vivo ao marrom, sendo o vermelho a cor mais comum do animal em vida (Fig.2). Os animais podem atingir mais de 15 cm de diâmetro, possuindo uma espessura de cerca de 10 mm. Quando fixada, a túnica se torna transparente e apresenta um aspecto gelatinoso. Seus sistemas formam fileiras duplas anastomosadas e alongadas. Estão presentes mais de 20 zoóides em cada sistema.

Estrutura interna:

Zoóides medindo entre 2 e 4 mm de comprimento (Fig. 3). Quando fixados possuem coloração róseo avermelhada. O manto possui cerca de 15 fibras musculares dispostas concentricamente ao redor da abertura atrial (Fig. 3C). A borda do sifão branquial é lisa e estão presentes 24 tentáculos orais de três ordens de tamanho. Cesta branquial com até 19 fileiras de fendas, sendo 10-12 fendas por fileira. Há um broto reprodutivo em cada lado do corpo, localizado logo acima dos folículos testiculares. Abertura atrial ampla em alguns zoóides, podendo ser mais fechada em outros (Fig. 3A). Testículo formado por 10 a 12 folículos localizados dorsalmente ao ovário, que possui um único e grande ovo de cada lado. Estômago afunilado mais largo na extremidade proximal (onde se encontram projeções das pregas), afunilando-se em direção ao intestino (Fig. 3B). O estômago apresenta 10-12 pregas longitudinais, o ceco é pequeno e voltado

posteriormente, com uma ligação ceco-intestinal que se origina de sua base e vai até a parede do intestino, onde estão as glândulas pilóricas. As glândulas pilóricas tem um aspecto ramificado com ligações entre si e extremidades em forma de ampolas (Fig. 3B). Abertura do ânus bilobada, na altura da 12^a fileira de fendas. Larvas presentes em bolsas incubadoras localizadas fora da parede do corpo, com três papilas adesivas e quatro pares de ampolas. Larvas e oozoóides foram encontrados em diferentes fases de desenvolvimento, fixadas na superfície da túnica da própria colônia.

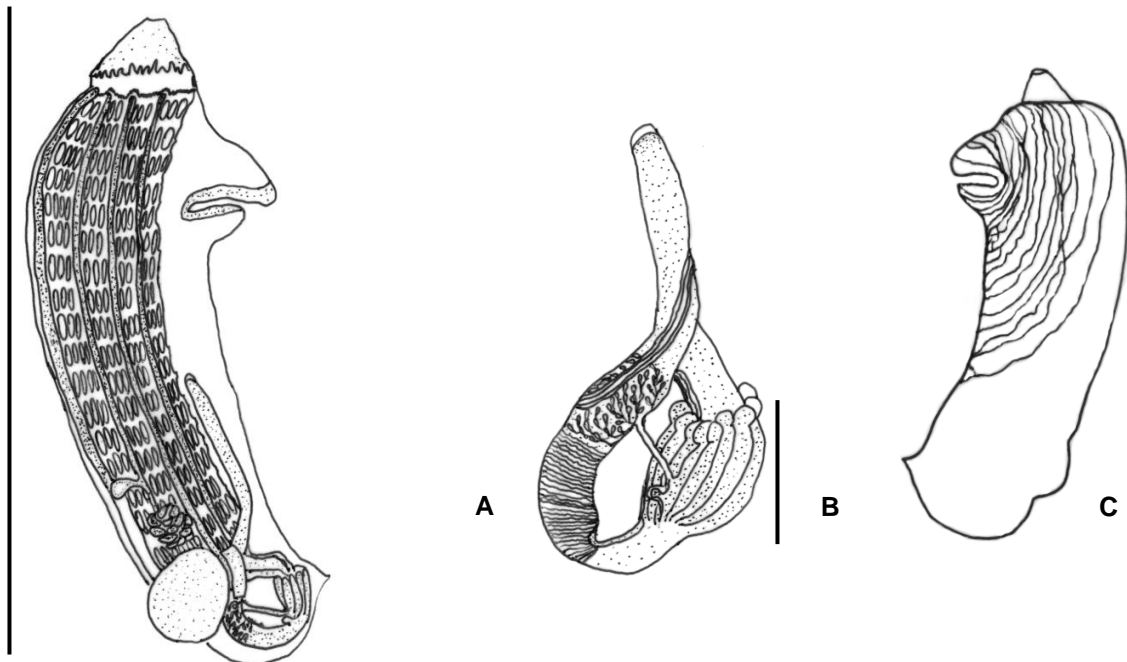


Figura 3. Zooóide de *Botrylloides giganteum*: A. Zoóide inteiro (escala 2 mm), B. Aparelho digestivo (escala 0,4mm), C. Manto com a musculatura.

Estas larvas medem 0,5 mm de comprimento, com a cauda envolvendo o tronco e apresentando quatro pares de ampolas, na qual uma estava migrando para o lado ventral e três do lado dorsal da larva, além de três papilas adesivas (Fig. 4 A-B). Essas ampolas são alongadas nas extremidades distais e bifurcadas nas proximais. No lado dorsal da larva (Fig. 4 B) pode-se notar a presença de um oozoóide pouco desenvolvido, com seus sifões não funcionais. No estágio seguinte (Fig. 4 C-D) o tamanho se mantém, porém suas ampolas retraem-se, mantendo o mesmo número e deixando um espaço vazio entre as ampolas e as papilas. Na fase seguinte pode-se observar um estágio de transição de larva para

zoóide, já sem a cauda e com seus sífões voltando-se para a região anterior do animal. Neste estágio o zoóide mede 0,53mm de comprimento e ainda mantém suas ampolas retraídas (Fig. 5A). Na seqüência pode-se observar o desenvolvimento mais expressivo do zoóide, com a formação de um broto reprodutivo em cada lado do corpo. As oito ampolas apresentaram dois prolongamentos laterais em sua base, e começam a projetar-se (Fig. 5B). Na Fig. 5C pode-se observar um alongamento no crescimento das ampolas e seus prolongamentos laterais, em direção às margens da túnica. Em seguida as ampolas começam a perder a ligação com zoóide, posicionando-se mais nas margens da túnica (Fig. 5D). A Fig. E mostra um zoóide já bem definido, com toda a estrutura branquial, estômago formado, alça intestinal e um pequeno broto formando um novo zoóide. A partir desse ponto o zoóide começa a crescer até alcançar seu estágio adulto e maduro (Fig. 5E), onde irá reproduzir-se de modo assexual por meio de seus brotamentos laterais, aumentando o número de zoóides e formando uma nova colônia.

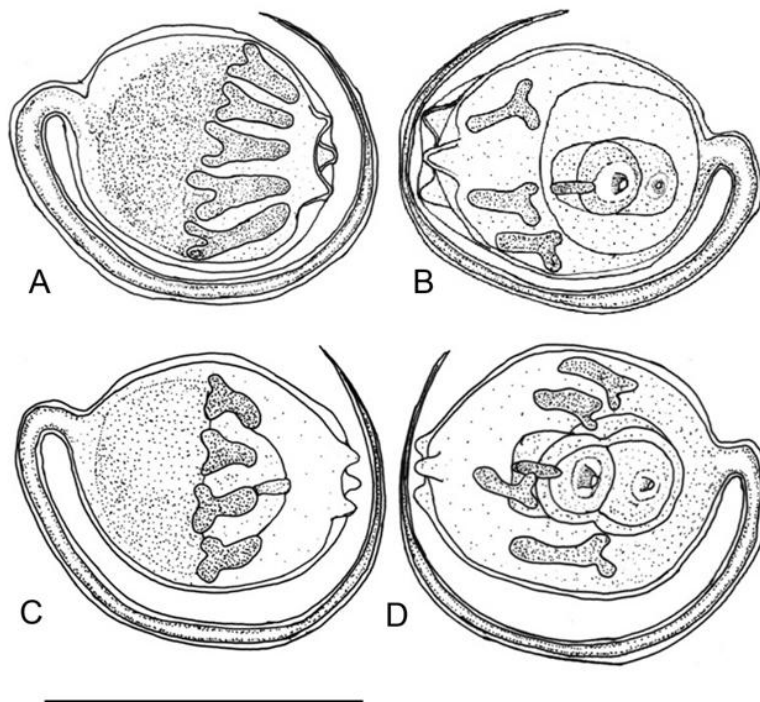


Figura 4. A-B larva com suas papilas alongadas. C-D larva apresentando retração das papilas (escala 0,5mm).

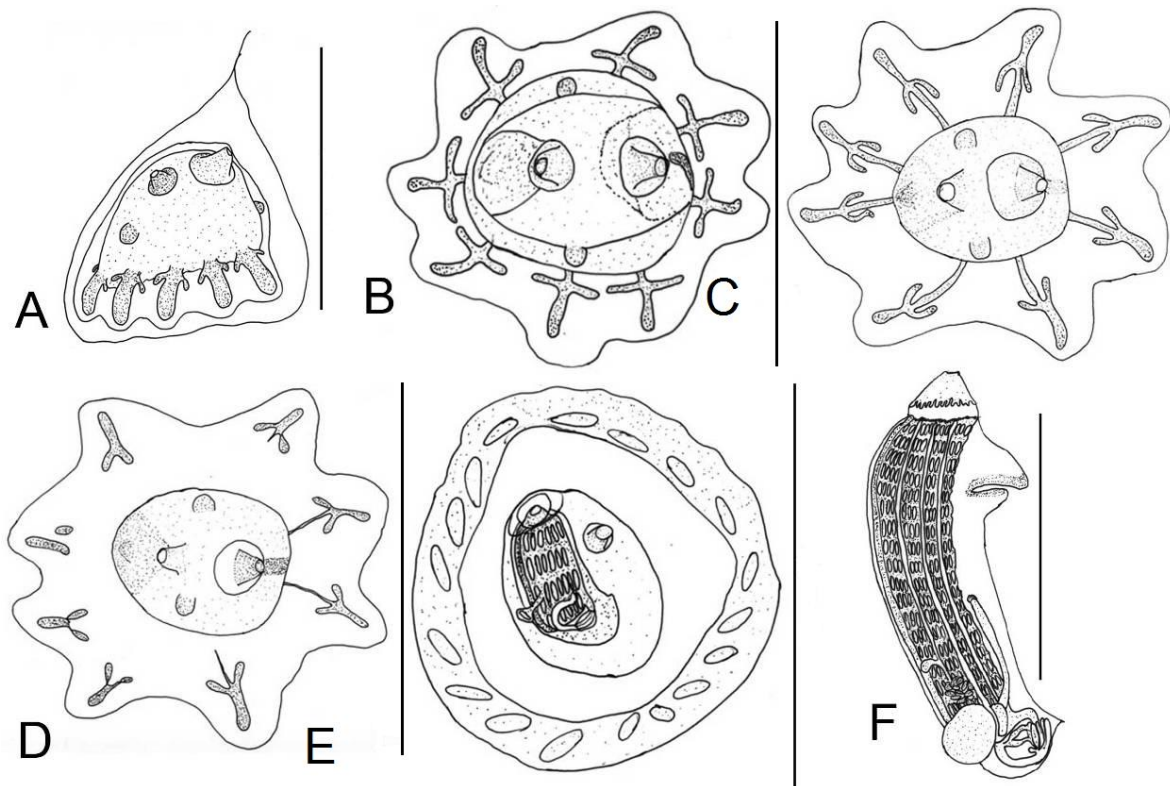


Figura 5. A. Transição de larva para zoóide (escala 0,5 mm). B-D. Desenvolvimento do zoóide e crescimento de suas ampolas.(escalas 0,8 mm; 0,9 mm e 0,9 mm) E. Jovem zoóide com a cesta branquial desenvolvida (escala 1 mm). F. Zoóide adulto retirado da colônia (escala 2 mm).

Comentários:

Por muito tempo, *B. giganteum* era conhecida como uma variação de *Botrylloides nigrum*. No entanto, com base em caracteres morfológicos (indivíduos adultos) e moleculares, foi elevada à categoria de espécie (Aron & Solé-Cava, 1991).

É interessante notar que o desenvolvimento das larvas e dos oozoóides se deu na superfície da colônia, pois os indivíduos desta subfamília não permitem epibiontes ou recrutamento de qualquer outro organismo na superfície de sua túnica. Esse fato provavelmente ocorreu devido ao mecanismo de reconhecimento genético do tecido dos indivíduos gerados pela mesma colônia, como observado por Saito *et al.* (1994) e Cohen *et al.* (1998). Porém estudos sobre os mecanismos de alorechecimento e alorejeição com espécies de botrílideos do litoral brasileiro ainda são desconhecidos.

Distribuição:

Costa oeste e sudeste africana (Senegal e África do Sul), Golfo do México e litoral sudeste brasileiro.

Botrylloides nigrum Herdman, 1886



Figura 6. Colônia de *Botrylloides nigrum*

Sinonímia:

Botrylloides nigrum Herdman, 1886: 50, pr. 1, fig. 8, pr. 3, figs. 19-21, Bermudas; Van Name, 1945: 227, figs. 113C, 117 e sinonímia, EUA e México (Atlântico), Porto Rico, Cuba, Haiti; Kott, 1952: 257, figs. 73-74, Austrália; Rodrigues, 1962: 201, figs. 5-7, Brasil; Millar, 1967: 202, fig. 1, Marrocos; Monniot C., 1972a: 618, Bermudas; Monniot, C., 1983b: 424, fig. 1 A-C, Guadalupe.

Botryllus niger: Monniot & Monniot, 1987: 103, fig. 39 A-C, Taiti; Rodrigues & Rocha, 1993: 735, Brasil; Rodrigues et al., 1998: 108, fig. 31, Brasil.

Metrocarpa nigrum: Pèrés, 1948: 95, Senegal; Pèrés, 1949: 204, fig. 25, Senegal.

Material examinado:

1 espécime de Forte São Mateus, Cabo Frio - RJ coletado em 06/10/1998.

1 espécime de Bonfim, Angra dos Reis - RJ coletado em 16/10/1998.

1 espécime de Camburi, Vitória - ES coletado em 15/05/1999.

1 espécime de Monte Serrat, Salvador – BA coletado em 12/08/1999.

1 espécime da Praia do Francês, Maceió-AL coletado em 26/11/1999.

3 espécimes da Praia do Paraíso, Cabo de Santo Agostinho-PE coletado em 23/11/1999.

1 espécime da Praia de Pontas de Pedras, Goiana – PE coletado em 02/02/2001.

1 espécime do Porto do Mucuripe, Fortaleza - CE coletado em 19/02/2007.

Aspecto da Colônia:

As colônias são incrustantes, podendo alcançar mais de 10 cm, constituídas por sistemas irregulares que formam fileiras de zoóides que sempre estão margeando uma cloaca comum, localizada no centro do sistema. Quando vivas possuem uma coloração marrom com uma mancha laranja em forma de U ao redor dos sífões dos zoóides (Fig. 6). A túnica é transparente, fina e frágil, permitindo destacar facilmente os zoóides. Quando fixados, os zoóides possuem uma coloração marrom arroxeadada e perdem a mancha laranja que apresentavam em vida.

Estrutura Interna

Os zoóides estudados mediam entre 0,6 e 1,5 mm, e quando fixados apresentaram uma coloração roxa ou marrom. Sífão branquial com oito tentáculos em duas ordens de tamanho. A cesta branquial geralmente possui nove fileiras de fendas, podendo chegar a 11, segundo literatura (Kott,1985). A segunda fileira de fendas não alcança a lâmina dorsal. Um único ovo de cada lado situado ventralmente ao testículo, que possui seis folículos arroxeados, agrupados em forma de roseta na altura da sexta ou sétima fileira de fendas. Estômago afunilado em direção ao intestino, com oito pregas longitudinais, contando com alargamentos das pregas próximo ao esôfago. Há um ceco pilórico curto com a extremidade mais dilatada. A ligação ceco-intestinal parte da base do ceco e vai até a região do intestino onde estão as glândulas pilóricas. As glândulas não são ramificadas e estão dispostas em duas fileiras opostas (Fig. 7A).

Foram encontradas pequenas diferenças em três colônias de locais distintos, relacionadas à forma do corpo e abertura atrial. Os zoóides de Pernambuco (Fig. 7 A-B) e de Alagoas (Fig. 8 A-B) possuíam o corpo mais alongado, medindo 1,2 mm, enquanto que os de Arraial do Cabo-RJ, (Fig. 9A) possuíam o corpo mais curvado, medindo até 0,6mm. Os zoóides da colônia de Pernambuco possuíam a abertura atrial mais ampla, expondo parte da cesta branquial e ânus. Os de Alagoas apresentavam abertura atrial menor, não

expondo nem a cesta branquial nem o ânus. No entanto os da colônia de Arraial do Cabo (Fig. 9 A-B) possuíam uma abertura atrial mais estendida e proeminente que as demais. Além disso, os animais de Alagoas apresentaram duas características não comuns aos demais, como a presença de fagócitos acumulados próximos ao endóstilo, dispostos em pequenas ilhas a partir da segunda fileira de fendas até a sexta fileira (Ilhas Vasculares Ventrais, segundo Lauzon, 2007). Possuíam também 13 tentáculos de duas ordens de tamanho ao invés de oito.

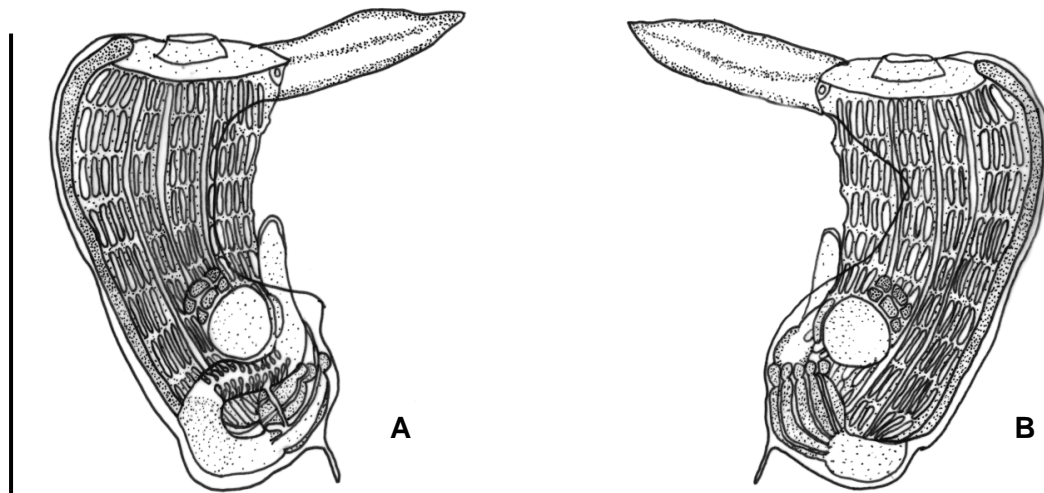


Figura 7. Zoóide de *Botrylloides nigrum* de uma colônia do estado de Pernambuco (escala 1,2mm): A, lado esquerdo; B, lado direito.

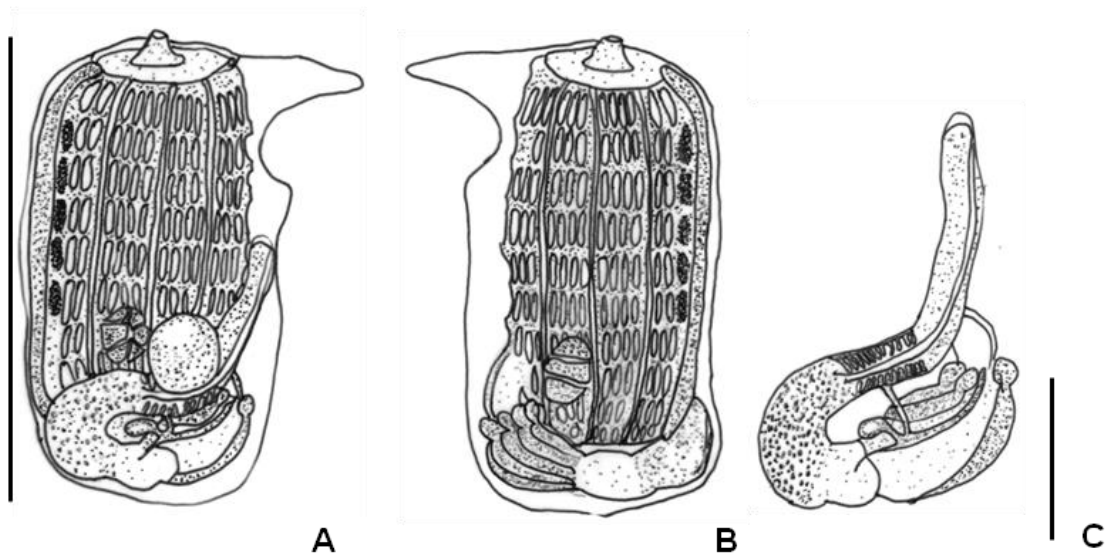


Figura 8. Zoóide de *Botrylloides nigrum* de uma colônia do estado de Alagoas (escala 1,2mm): A, lado esquerdo; B, lado direito; C Aparelho digestivo (escala 0,25mm).

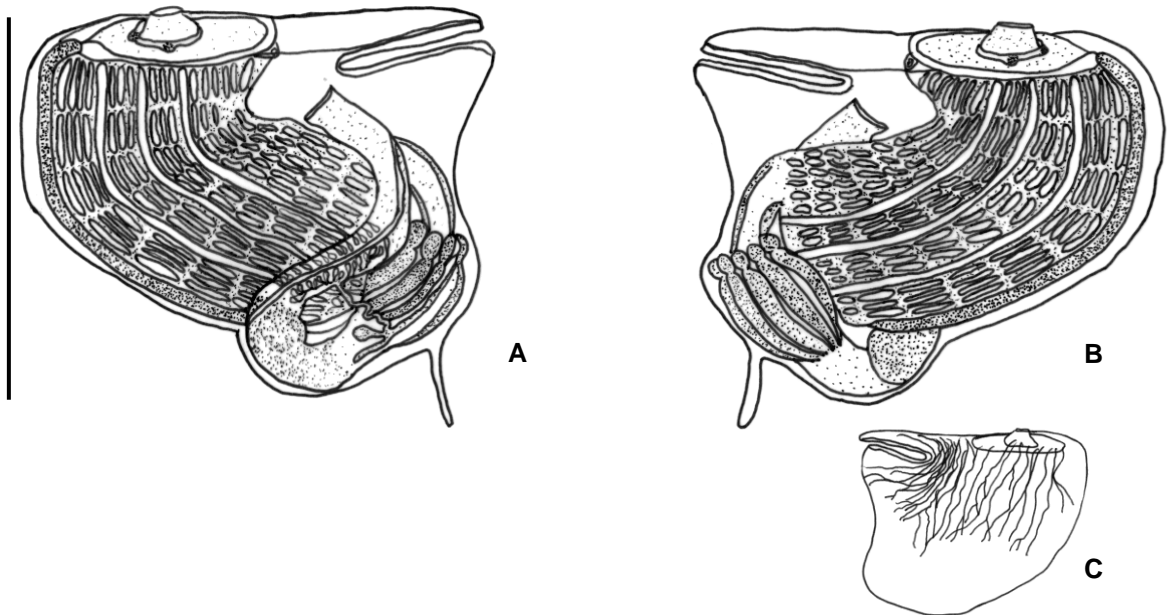


Figura 9. Zoóide de *Botrylloides nigrum* de uma colônia do estado do Rio de Janeiro (escala 0,6mm): A, lado esquerdo; B, lado direito C- Musculatura.

Distribuição:

Pantropical.

Botryllus humilis (Monniot, 1988)



Figura 10. Colônia preservada *Botryllus humilis*

Sinonímia:

Botryllus humilis, Monniot, 1988: 173, fig.4, A-C

Material examinado:

1 amostra Praia das Conchas, Cabo Frio-RJ, coletado na região entremarés, 07/10/1998.

1 espécime de Angra dos Reis - RJ, coletado na região entremarés, 10/10/1998.

1 espécime de Camburi, Vitória - ES, 16/05/1999.

1 espécime de Camburi, Vitória - ES, coletado na região entremarés, 16/05/1999.

1 espécime de Itaparica - BA, coletado na região entremarés, 10/08/1999.

1 espécime da Baía de todos os Santos, Salvador - BA, coletado na franja do infralitoral, sob pedras, 14/08/1999.

2 espécimes da Praia do Francês, Maceió - AL, coletado na franja do infralitoral, 21/11/1999.

Aspecto da colônia:

Colônias pequenas, de formato regular, incrustante, de coloração bege clara quando viva e amarelo-esverdeada quando fixada (Fig.10). Borda da colônia circundada por ampolas marginais. Túnica transparente, fina e frágil, exibindo os sistemas regulares com zoóides formando fileiras duplas, com 15 a 18 zoóides por sistema e uma cloaca maior em forma de fenda (Fig. 11A).

Estrutura interna:

Zoóides medindo cerca de 0,8 mm de comprimento, esbranquiçados e com pigmentos esverdeados quando fixados. Apresentam duas manchas escuras localizadas nas laterais do sifão branquial, sendo um de cada lado (Fig. 11E). Geralmente há duas manchas na lingüeta cloacal. Manto opaco não permite a visualização interna dos zoóides, repleto de fibras musculares que dificultam sua remoção (Fig. 11C). Tentáculos orais com três ordens de tamanho com cerca de 12 tentáculos alternadamente posicionados. A cesta branquial possui oito fileiras de fendas sendo aproximadamente 16 fileiras por fenda, mas a segunda fileira de fendas é incompleta não alcançando a lâmina dorsal (Fig. 11B).

Testículos ventrais e apenas um ovo posicionado anteriormente ao testículo, sendo um de cada lado do corpo, porém ambos posicionados sobre a alça intestinal. Testículos com até dez folículos de cada lado formando uma pequena roseta. Estômago oval, contando com até dez dobras e um ceco alongado e curvo com duas ligações ceco-intestinais localizadas na região apical do ceco. Glândulas pilóricas agrupadas em forma de pelotas, situadas acima do

ceco pilórico. Ânus bilobado, abrindo-se geralmente na altura da 5ª fileira de fendas. Larvas incubadas na região atrial, uma em cada lado do corpo, com três papilas adesivas e 4 pares de ampolas (Fig. 11D).

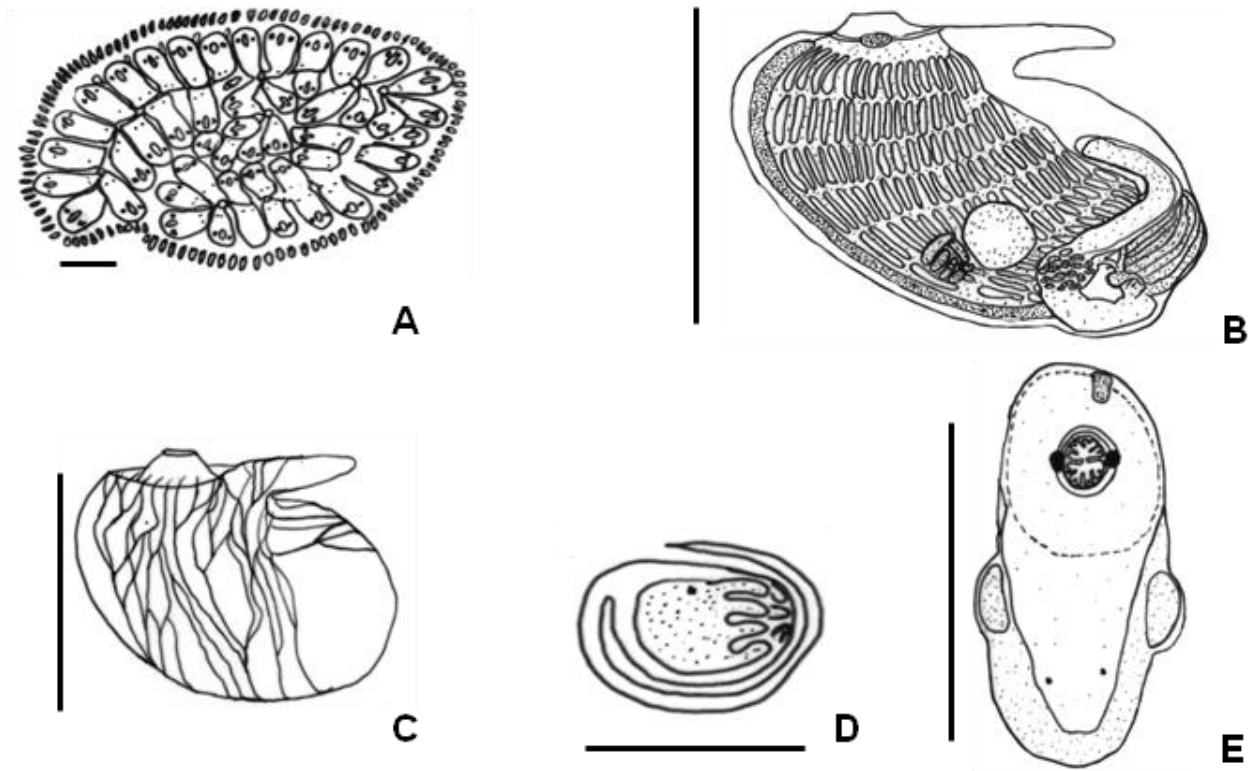


Figura 11. *Botryllus humilis*, A: forma da colônia (escala 1 mm); B: Zoóide (escala 0,8mm); C: Manto com musculatura; D: larva encubada (escala 0,3 mm); E: Vista superior do zoóide.

Distribuição:

Nova Caledônia e litoral tropical brasileiro.

Botryllus planus (Van Name, 1902)



Figura 12. Colônia de *Botryllus planus*.

Sinonímia:

Botryllus nigrum var. *planum* + *Botrylloides nigrum* var. *concolor*: Van Name, 1902: 377, 378, pr. 53, fig. 53, 55, pr. 59, fig. 110, Bermudas.

Botryllus planus: Van Name, 1945: 222, fig. 132, 133 A-B, pr. 21 e sinonímia, Bermudas, EUA (Atlântico), Curaçao; Millar, 1956: 924, fig. 11, Moçambique; Monniot C., 1972a: 620, Bermudas; Monniot C., 1983b: 426, fig. 2 A-B, Guadalupe.

Material examinado:

2 espécimes da praia de Monte Serrat, Salvador- BA coletado em 12/ 08/ 1999.

1 espécime de Paracuru – CE, coletado em 07/10/2002.

1 espécime da Praia do Pecém, São Gonçalo do Amarante – CE, coletado em 05/10/2002.

1 espécime da Praia de Peroba, Icapuí - CE, coletado em 18/09/2005.

Aspecto da colônia:

Colônias incrustantes, finas e delicadas, compostas por sistemas irregulares alongados apresentando duplas fileiras que circundam uma cloaca comum (Fig.12). Quando vivos possuem coloração variável, podendo ser marrom, bege, branca ou amarela, com manchas amareladas ao redor do orifício do sifão branquial de cada zoóide, como ocorre em *Botrylloides nigrum*. Quando fixados a colônia perde a coloração característica.

Estrutura interna:

Zoóides medem cerca de 1,5 mm, com o corpo geralmente em posição inclinada por causa da pouca espessura da colônia (Fig. 13). São frágeis, requerendo cuidados na sua remoção. Quando fixados, os zoóides são translúcidos, apresentando uma coloração levemente alaranjada, e com a estrutura branquial pigmentada. O sifão branquial é ligeiramente proeminente e internamente possui 8 tentáculos de duas ordens de tamanho. A cavidade atrial é ampla e estendida (fig. 13A), no entanto, sua abertura mais é fechada em relação à abertura atrial de *Botrylloides nigrum* que é ampla e expõe parte do cesto branquial. Existe uma concentração de fibras musculares próximas à abertura atrial (fig. 13 C). A cesta branquial apresenta 11 fileiras de fendas e 15 a 16 fendas por fileira, com exceção da segunda fileira de fendas, que não se estende até a lâmina dorsal. Gônadas posicionadas na extremidade da alça intestinal, onde os óvulos estão posicionados dorsalmente em relação aos testículos. Testículos compostos por dez folículos nos indivíduos estudados. Em alguns zoóides foram encontrados brotos localizados logo acima dos folículos testiculares, na altura da nona fileira de fendas. O estômago é curto e globoso, contando com oito pregas longitudinais. Ceco localizado no final do estômago, alongado e curvado, voltado para a alça intestinal. Há neste ceco duas ligações ceco-intestinais que se originam do meio do ceco e vão até a o intestino. As glândulas estão localizadas na parede do intestino, um pouco antes do local das ligações com o ceco, agrupadas em forma de pequenas pelotas arredondadas.

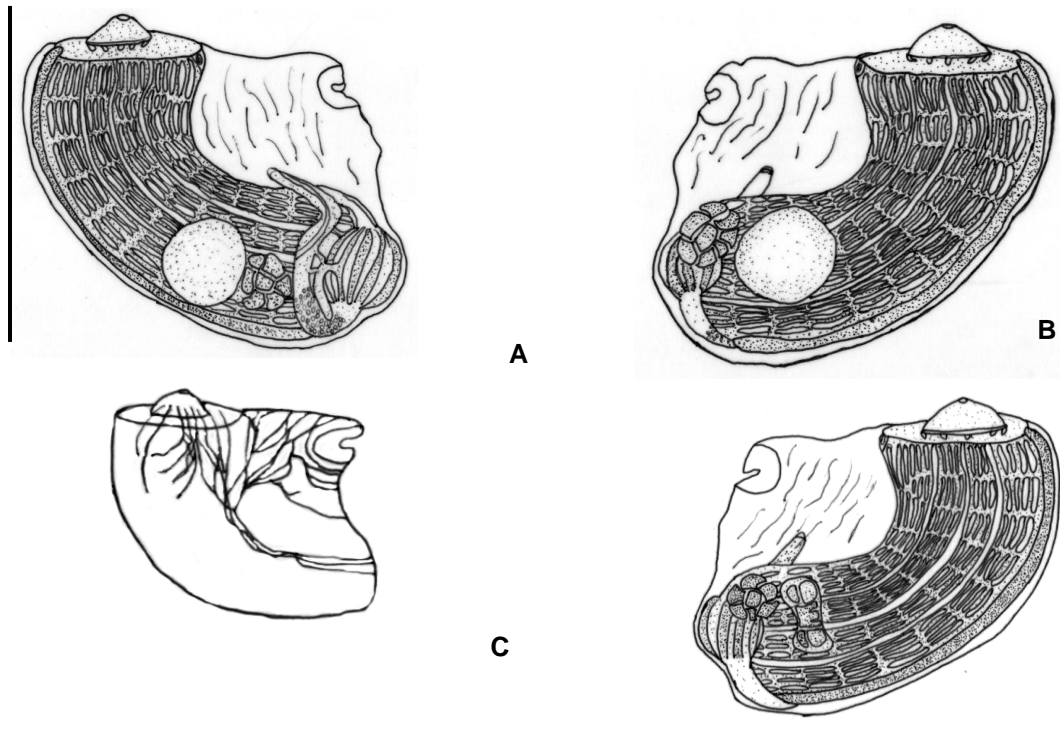


Figura 13. Zoóides de *Botryllus planus*: A: lado esquerdo (escala 1,5 mm); B: lado direito; C: Musculatura presente no manto do zoóide; D: Zoóide com um brotamento acima dos folículos testiculares.

Distribuição:

Atlântico tropical americano e Moçambique

Botryllus cf. primigenus Oka, 1928.

Sinonímia:

Botryllus primigenus: Van Name, 1931: figs. 2-3, EUA (Atlântico); Van Name, 1945: 223, fig.134, EUA (Atlântico); Millar, 1958: 505, Brasil.

Material examinado:

1 espécime da Praia do Meio, Natal-RN, coletado na região entremarés, sob pedra, em 07/05/2001.

Aspecto da colônia:

Colônia incrustante, de formato irregular, possuindo alguns sistemas organizados em círculos que contém cerca de 4 a 6 zoóides cada. Quando fixada a túnica é transparente, expondo os zoóides que são esbranquiçados.

Estrutura interna:

Os zoóides da colônia estudada eram esbranquiçados e mediam até 0,6mm de comprimento mas, segundo Van Name (1945), eles podem chegar a 2 mm. A borda do sifão branquial é lisa e proeminente. Os tentáculos orais são de duas ordens de tamanho, com dez tentáculos alternadamente distribuídos, sendo cinco grandes e cinco pequenos. Os zoóides possuem 4 fileiras de fendas na cesta branquial, que é bastante ampla, contando com 13 a 14 fendas por fileira (Fig. 14A). A abertura atrial é formada por um sifão alongado que se abre diretamente na superfície da colônia. No final deste sifão é possível observar uma musculatura bem definida ao redor da abertura. Apenas um ovo ou um embrião presente de cada lado do corpo nos espécimes analisados, sendo ambos posicionados logo acima da alça intestinal, com os embriões incubados em uma bolsa projetando-se fora da parede do corpo. Um broto de cada lado do corpo, posicionados acima do ovo. Não foram observados testículos neste espécime, mas alguns zoóides apresentavam embriões dispostos em um saco incubador. O estômago é oval e curto, com 8 a 9 pregas estomacais e um ceco alongado com extremidade curvada. Há uma ligação ceco intestinal partindo da extremidade do ceco até o intestino, onde se encontram as glândulas pilóricas. Essas glândulas possuem o formato de pequenos vasos, com extremidade bifurcada em algumas e

distribuídas uma paralela à outra. O ânus é curto e bilobado, abrindo-se geralmente na segunda fileira de fendas. A musculatura se apresenta em feixes paralelos ao endóstilo, com alguns feixes concentrados na pequena abertura atrial, que parece funcionar como um esfíncter (Fig. 14B).

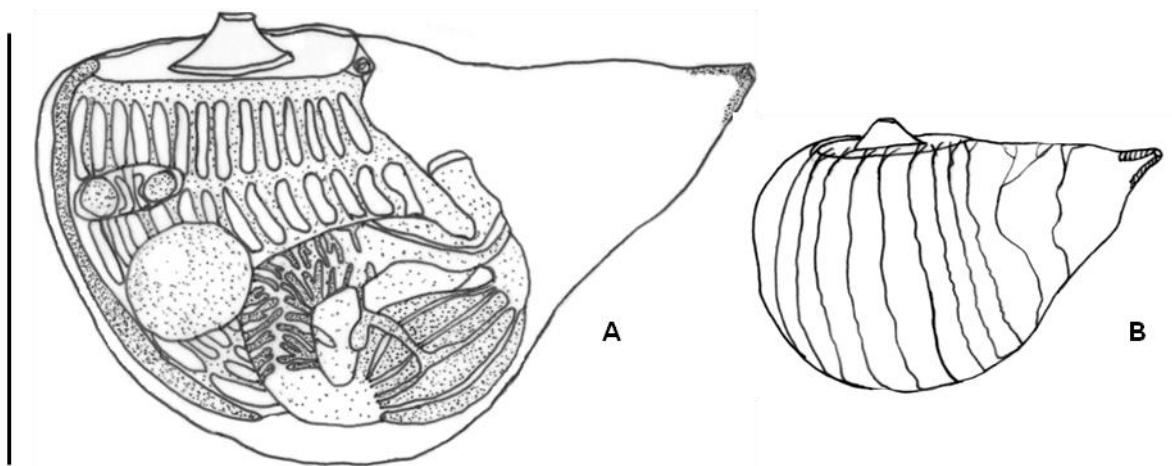


Figura 14. A: zoóide de *Botryllus* cf. *primigenus* (escala 0,6mm), B: musculatura do zoóide

Comentários:

Botryllus primigenus tem como localidade tipo o litoral japonês, e ocorrência no Atlântico registrada por Van Name (1945). Esta espécie tem sido foco de muitas discussões quanto a sua presença ou não no Atlântico. Inclusive, *B. primigenus* atualmente tem sido tratada como sinônimo de *B. tuberatus* (Monniot, 1983; Monniot & Monniot, 1987; Goodbody, 2005). Entretanto, *B. primigenus* ainda é considerada válida em trabalhos recentes da costa japonesa, (Taneda & Watanabe, 1982; Hirose et al., 2003; Sunanaga et al., 2006; Kawamura et al., 2006). Porém, atualmente não existem informações suficientes sobre *Botryllus tuberatus* a fim de elucidar as características capazes de distinguir com precisão eventuais diferenças entre *B. tuberatus* e *B. primigenus*, uma vez que os critérios utilizados para a distinção de ambas são insuficientes (Saito, comunicação pessoal). Além disso, há também outra discussão entre os espécimes japoneses envolvendo o próprio *B. primigenus* e *B. comunis*, sendo a última considerada como sinônimo júnior da primeira. No entanto, as espécies coletadas no Atlântico

e analisadas neste trabalho apresentaram algumas características peculiares, o que nos leva a acreditar que elas sejam realmente duas espécies distintas (ver descrição das espécies). As principais delas são:

- Forma da abertura atrial, tendo uma a abertura atrial posicionando-se diretamente na superfície da colônia (*B. primigenus*) enquanto a outra possui uma abertura atrial ampla, com um prolongamento antero-dorsal conhecido como lingüeta dorsal (*B. tuberatus*);
- Forma de incubação larval, com uma espécie contendo larvas incubadas em sacos laterais, um de cada lado do corpo (*B. primigenus*), e a outra apresentando em vez disso um zoóide não funcional, com as larvas incubadas em seu interior contendo cerca de três a seis larvas (*B. tuberatus*);
- Tentáculos orais de três ordens de tamanho em *Botryllus tuberatus* e de duas ordens de tamanho em *Botryllus primigenus*;
- Forma das glândulas intestinais diferentes: *Botryllus tuberatus* tendo as glândulas mais ramificada, enquanto que *B. primigenus* possui as glândulas com leves bifurcações nas extremidades, posicionadas paralelas uma ao lado da outra;

Para se ter a correta diagnose destas duas espécies se faz necessária a comparação delas com exemplares provenientes de suas localidades tipo. Só dessa forma será possível resolver este impasse. Como até o momento ainda não foi possível se ter essa definição, elas foram identificadas aqui como *B. cf. primigenus* e *B. cf. tuberatus*.

Distribuição:

Mares tropicais e temperados.

Botryllus schlosseri (Pallas, 1766)

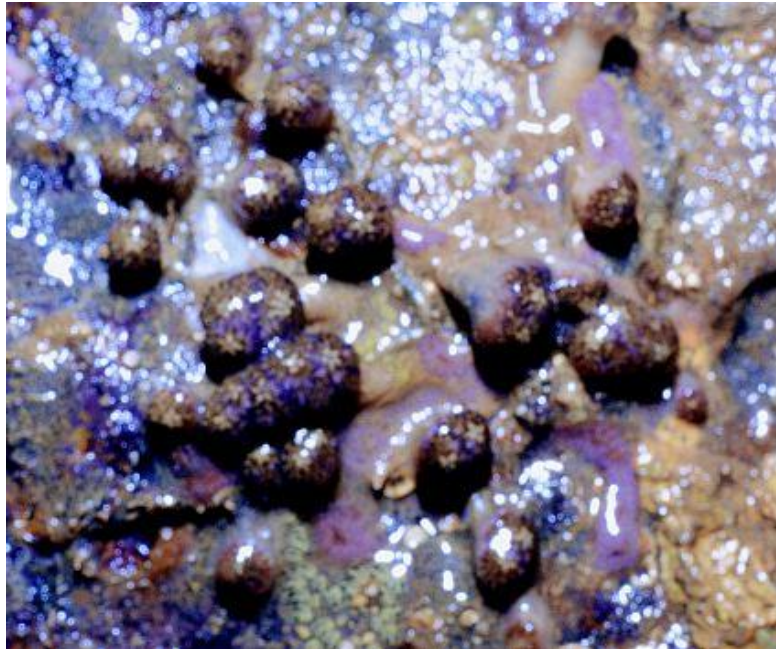


Figura 15. Colônias de *Botryllus schlosseri*.

Sinonímia:

Alcyonium schlosseri: Pallas, 1766: 355 (apud Kott, 1985), Europa (Atlântico).
Botryllus schlosseri: Kott, 1985: 267, fig. 130, pr. Vc e sinonímia, Australia;
Nishikawa, 1991: 74, Japão.
Não Björnberg, 1956: 164.

Material examinado:

3 espécimes de Camburi, Vitória-ES, coletados na região entremarés em 16/05/1999.
1 espécime de Camburi, Vitória-ES, coletado na região entremarés em 17/05/1999.

Aspecto da colônia:

Colônias incrustantes formando sistemas circulares bastante regulares e bem organizados, com zoóides dispostos ao redor de uma cloaca comum (Fig. 15). Quando vivas as colônias apresentam coloração escura, com manchas rajadas de coloração variada conferindo o aspecto estrelado aos sistemas.

Estrutura interna:

Zoóides com o corpo alongado, medindo 1,5 mm, apresentando coloração escura quando fixados, o manto coberto por feixes musculares oblíquos em relação ao endóstilo e entrecruzados (Fig.16). Musculatura concentrada próximo à abertura atrial e menos densa próximo aos testículos (Fig. 16B). Doze tentáculos orais de duas ordens de tamanho, sendo seis grandes e seis pequenos. Cesta branquial ampla, contando com 12 fileiras de fendas e 11 a 16 fendas por fileira. Abertura atrial pequena, com lingüeta atrial pouco proeminente. Ilhas de fagócitos (Ilhas vasculares ventrais) dispostas a partir da segunda fileira de fendas, posicionadas entre o endóstilo e a primeira fenda, da segunda até a oitava fileira (Fig.16A). Uma dúzia de folículos testiculares localizados acima da alça intestinal primária, ovos não presentes. Os exemplares analisados não tinham ovos, porém eles são descritos por outros autores com tendo três ou mais ovos de cada lado (Van Name, 1945). Estômago oval e alongado, em forma de barril, com 12 pregas longitudinais. Ceco pilórico alongado localizado na base do estômago, com extremidade arredondada e intumescida. Ligação pilórica no meio do ceco até a parede do intestino, onde estão as glândulas pilóricas que se apresentam de forma ramificada. A abertura do ânus se dá entre a quarta e sexta fileira de fendas.

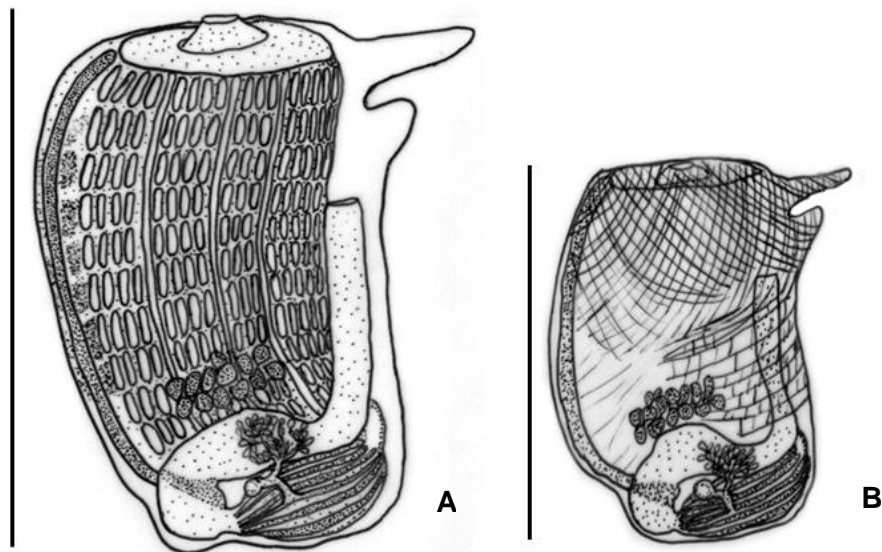


Figura 16. A: Zoóide de *B. schlosseri* (escala 1,2 mm); B: Zoóide com feixes musculares (escala 0,8mm).

Distribuição:
Cosmopolita.

Botryllus tabori Rodrigues, 1962.



Figura 17. Colônias de *Botryllus tabori*.

Sinonímia:

Botryllus tabori: Rodrigues, 1962: 199, pr. 3, figs.8-11, Brasil; Rodrigues & Rocha, 1993: 736, fig. 8, Brasil; Rodrigues et al., 1998: 110, fig. 32, Brasil.

Material examinado:

1 espécime de Mar Grande, Itaparica- BA coletado em 10/08/1999.

1 espécime da Ilha do Meio, Piúma- ES, coletado em 12/05/1999.

1 espécime da Praia das Conchas, Cabo Frio- RJ, coletado em 07/10/1998.

Aspecto da colônia:

Colônias incrustantes, pequenas e muito delicadas, com sistemas lineares alongados, com zoóides dispostos um paralelo ao outro destacando no meio destes uma cloaca bastante aparente quando vivo (Fig. 17). O número de zoóides é variável, chegando a alcançar até 28 zoóides no sistema (Rodrigues, 1962). A túnica é transparente e delicada, deixando os zoóides bem visíveis. As colônias possuem coloração variada em indivíduos vivos, podendo ser amarela, cor-de-

rosa, laranja, vermelha ou marrom. Quando fixada, a colônia se torna transparente, podendo também apresentar coloração parda.

Estrutura interna:

Os zoóides medindo entre 1 e 1,5 mm, apresentando coloração clara quando fixados. Sifão branquial pouco proeminente e circular. Atrial mais largo, permitindo que parte da cesta branquial fique exposta (Fig. 18). A lingüeta é proeminente formando uma pequena aba. Musculatura do manto em feixes paralelos, partindo da região do sifão branquial até a extremidade da região ventral. Os zoóides possuem entre 8 a 12 tentáculos orais de três ordens de tamanho. Cesta branquial com até 9 fileiras de fendas e 11 fendas por fileira, com exceção da última que tem nove. O estômago é oval e possui 10 pregas longitudinais e um ceco bastante alongado, curvando-se em direção à alça intestinal. Os testículos são formados por um grupo de até meia dúzia de folículos e estão posicionados dorsalmente em relação ao ovário. Pode haver entre um e três ovos em cada lado do corpo, dispostos dentro da cavidade atrial. A ligação ceco-intestinal se dá a partir da base do ceco e vai até a parede do intestino, onde estão agrupadas as glândulas pilóricas. Glândulas pilóricas de forma ramificada, com extremidades em forma de ampolas. O ânus abre-se na altura da quinta ou sexta fileira de fendas e possui abertura bilobada.

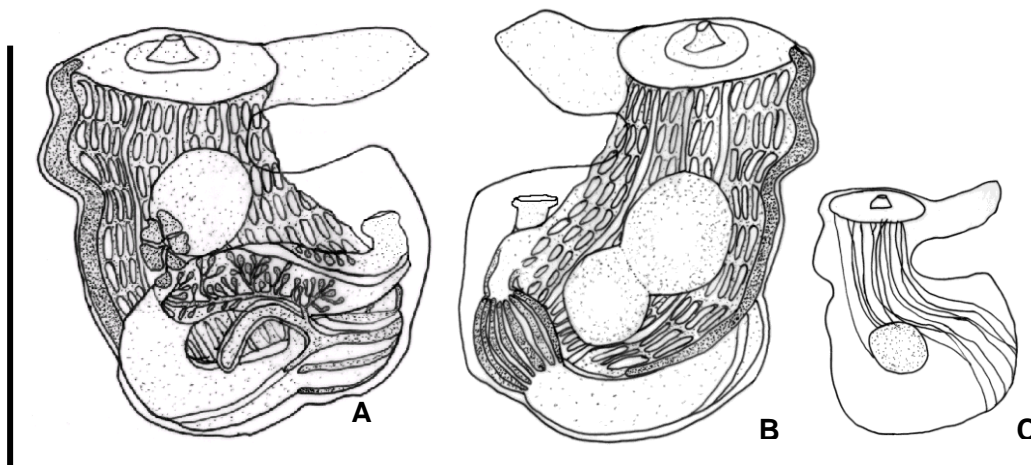


Figura 18. Zoóide de *Botryllus tabori*, A: lado esquerdo (escala 0,9mm); B: lado direito, com dois ovos; C: manto com a musculatura.

Distribuição:

Litoral Brasileiro.

Botryllus cf. tuberatus (Ritter & Forsyth, 1917)



Figura 19. Colônia de *Botryllus cf. tuberatus*.

Sinonímia:

Botryllus tuberatus: Ritter & Forsyth, 1917 (apud Van Name, 1945): 461, pr. 39, figs.10, 12, pr. 40, fig. 3C-D, Nova Caledônia; Nishikawa, 1991: 73 e sinonímia adicional, Japão; Rodrigues & Rocha, 1993: 736, Brasil; Nishikawa, 1991; 73 e sinonímia adicional, Japão; Rodrigues et al., 1998: 112, fig.33, Brasil.

Material examinado:

1 espécime da Praia do Francês, Maceió-AL, coletado no infralitoral, 1m de profundidade, em 26/11/1999.

1 espécime da Praia do Paraíso Cabo de Santo Agostinho-PE, coletado na região entremarés em 23/11/1999.

Aspecto da colônia:

Colônias pequenas, finas e incrustantes, formadas por sistemas circulares ou ovais contendo até 16 zoóides por sistema (Figs. 19, 20A). Túnica fina e transparente, permitindo uma boa visualização dos zoóides, que apresenta uma coloração marrom escura após a fixação.

Estrutura interna:

Zoóides medindo até 0,5 mm de comprimento, agrupados em sistemas circulares com abertura cloacal ao centro. Sifão branquial pouco proeminente, Abertura atrial expondo parte da cesta branquial, com uma lingüeta atrial pequena, abrindo-se em uma cloaca comum. Tentáculos orais alternadamente distribuídos em três ordens de tamanho, em número de 16. A cesta branquial possui 4 fileiras de fendas (Fig. 18C). O endóstilo é mais proeminente e um pouco recurvado em direção à superfície da colônia. O estômago tem um formato oval, com 9 pregas e um ceco alongado, com a extremidade curva e mais dilatada (arredondada). Ligação ceco-intestinal conectando a extremidade do ceco às glândulas pilóricas em forma de vasos na superfície do intestino. Ânus com o bordo dorsal formando uma lingüeta.

Foram encontrados zoóides incubadores de larvas dentro dos sistemas, cada um destes zoóides continha apenas larvas em seu interior em quantidades que variavam entre 3 e 6 larvas (Fig. 18B). Estes zoóides podem ser facilmente observados dentro dos sistemas, pois eles possuem uma coloração mais escura na borda do sifão branquial e tem um tamanho maior que os zoóides normais. Os zoóides da colônia estudada não continham gônadas.

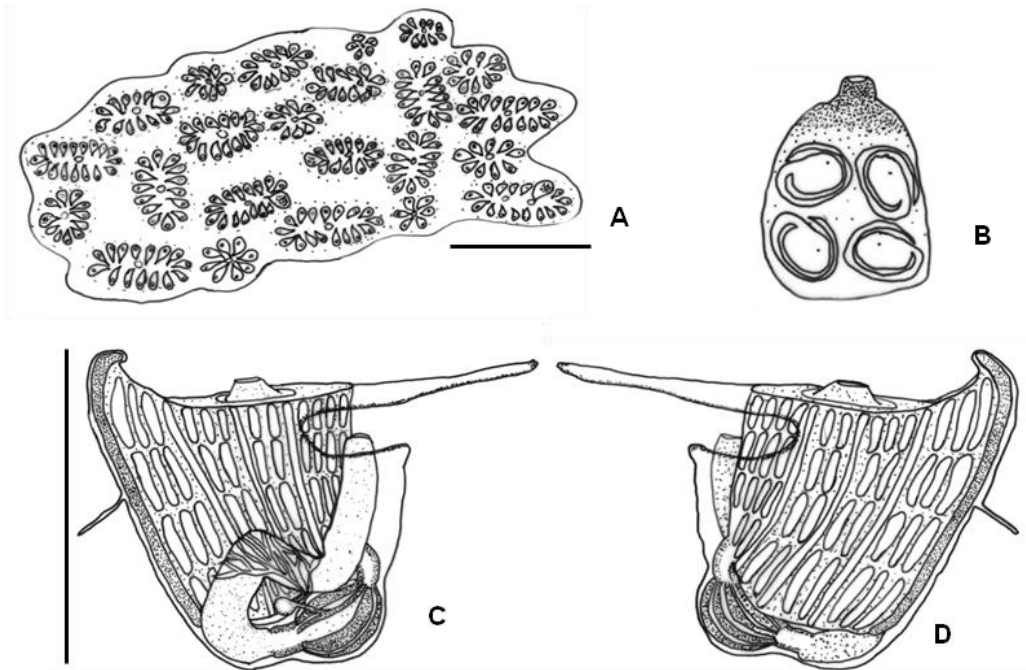


Figura 20. *Botryllus* cf. *tuberatus*, A: Forma dos sistemas da colônia (escala 4 mm), B-C: zoóide (escala 0,5mm); D: zoóide incubador de larvas.

Distribuição:

Mares tropicais e temperados.

***Botryllus* sp. n.**



Figura 21. Colônia preservada de *Botryllus* sp.n.

Material examinado:

1 espécime Camburi, Vitória – ES, coletado na região entremarés em 17/05/1999.

Aspecto da colônia:

Colônia regular, apresentando sistemas circulares com 5 a 8 zoóides no espécime estudado. A túnica é transparente e delicada, facilmente removível no material fixado. Não havia dados de coloração em vida do exemplar.

Estrutura Interna:

Os zoóides medindo até 0,8 mm de comprimento. Possuem uma coloração esbranquiçada quando fixado. Não possuíam brotos, porém, apresentava muitos zoóides jovens entre os maiores que provavelmente se originaram por brotamento. Não havia gônadas no espécime estudado. O sifão branquial é liso, bem aberto e proeminente, com 15 tentáculos orais de três ordens de tamanho, sendo 3 grandes 5 médios e 7 pequenos. A abertura atrial é dilatada, exibindo parte da cesta branquial (Fig. 19), e possui uma lingüeta. A cesta branquial é ampla e possui 6 fileiras de fendas, com 10 a 11 fendas por fileira. O estômago é curto e globoso, com oito dobras longitudinais e um ceco longo e cilíndrico, aparentemente de igual diâmetro desde a base até a extremidade distal. Há também uma ligação ceco-intestinal que parte da base do ceco até a parede do intestino, onde estão agrupadas as glândulas pilóricas. As Glândulas pilóricas possuem forma ramificada, com extremidades em forma de ampolas. Ânus circular abrindo-se geralmente na altura da quarta ou quinta fileira de fendas.

Comentários:

A colônia deste espécime estava incorretamente identificada como *Botryllus tuberatus*. Infelizmente a colônia estudada é apenas um pequeno fragmento, sendo necessário coletar mais indivíduos desta no seu local de origem para uma descrição mais detalhada.

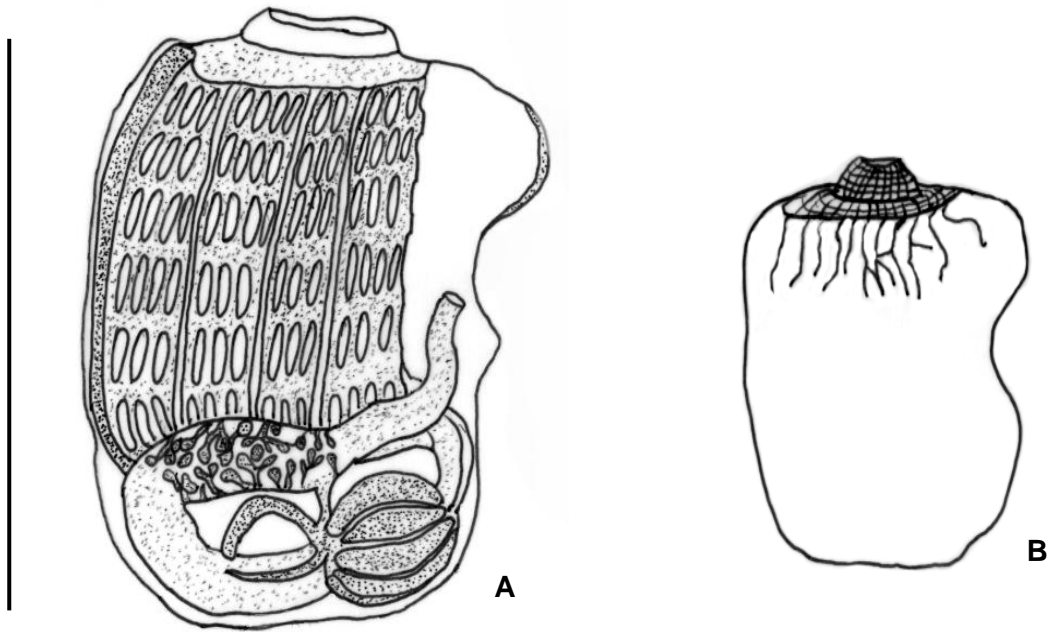


Figura 22. A: Zoóide de *Botryllus* sp. n. (escala 0,8mm); B: Musculatura do manto.

Distribuição:
Litoral brasileiro.

4.2 Análise filogenética:

Para o estudo filogenético procurou-se levantar a maior quantidade de informações possíveis sobre os diferentes táxons, mantendo o cuidado na escolha dos caracteres, uma vez que as acídias constituem um grupo de animais que possuem muitos caracteres variáveis (numero de órgãos, forma e grau de desenvolvimento destes órgãos etc.) (Moreno, 2003). Sendo assim procurou-se utilizar os caracteres de maior importância na identificação do grupo e alguns novos caracteres observados ao longo deste trabalho que pudessem indicar homologias (Fig. 23).

Um problema recorrente, não exclusivo das ascídias, é exatamente a morfologia aparentemente simples dos animais, com poucos caracteres utilizados nas descrições originais das espécies. Dessa maneira, os caracteres utilizados aqui foram estudados com microscopia ótica (Estereomicroscópio e Microscópio óptico). O emprego de microscopia eletrônica e outras técnicas de estudo ultraestruturais certamente iriam incrementar o número de caracteres e assim melhorar substancialmente a elaboração das hipóteses sobre a filogenia do grupo.

Ao final do exame de todos os exemplares, foram observados 25 caracteres que apresentavam variação entre as espécies. Destes, 5 caracteres foram excluídos por que sua homologia era questionável.

Os caracteres excluídos não foram: espessura da túnica, presença de broto reprodutivo, número de tentáculos orais e forma do sifão branquial.

A túnica é uma estrutura comum a toda colônia e recobre sua superfície. Nos Botryllinae apresenta-se geralmente sob dois aspectos, podendo ser fina e delicada ou mais firme e resistente. Ela é também a sinapomorfia que dá nome ao táxon Tunicata, onde estão incluídos os Ascidiacea. Esse caráter foi excluído da análise por não ser consistente. Este caracter foi tambem considerado insatisfatório por Monniot & Monniot, 1987.

O broto reprodutivo é um órgão comum a todos os botrilíneos, porém podem aparecer em fases distintas do desenvolvimento dos zoóides, (não sendo um

caráter fixo durante seu desenvolvimento). Como é uma sinapomorfia do táxon, não serve para resolver questões de parentesco no grupo interno.

Os tentáculos orais dos botrilíneos são filiformes e estão posicionados no interior do sifão branquial. Este caráter também foi excluído porque o número de tentáculos varia bastante de acordo com o estágio de desenvolvimento dos zoóides.

O sifão branquial ou sifão oral é uma abertura que permite a entrada do fluxo de água para o animal transportando o alimento e os gases para sua respiração. Os espécimes analisados foram encontrados com a abertura do sifão branquial sob duas formas, alguns apresentavam o sifão mais visível e por tanto mais proeminente enquanto que em outros ele se mostrou pouco proeminente, ou seja com a abertura atrial mais retraída. O caráter foi excluído por que esses estados podem também relacionados à forma de contração muscular dos zoóides, não sendo um caráter confiável.

A próxima seção descreve os 20 caracteres observados e incluídos na análise (Tabela 1) e a matriz polarizada de estados de caracteres morfológicos das espécies analisadas (Tabela 2). A numeração dos caracteres apresentados é descontínua pois, como mencionado, 5 caracteres foram excluídos após a construção da matriz original, porém a numeração original de cada caráter foi mantida durante as análises subseqüentes.

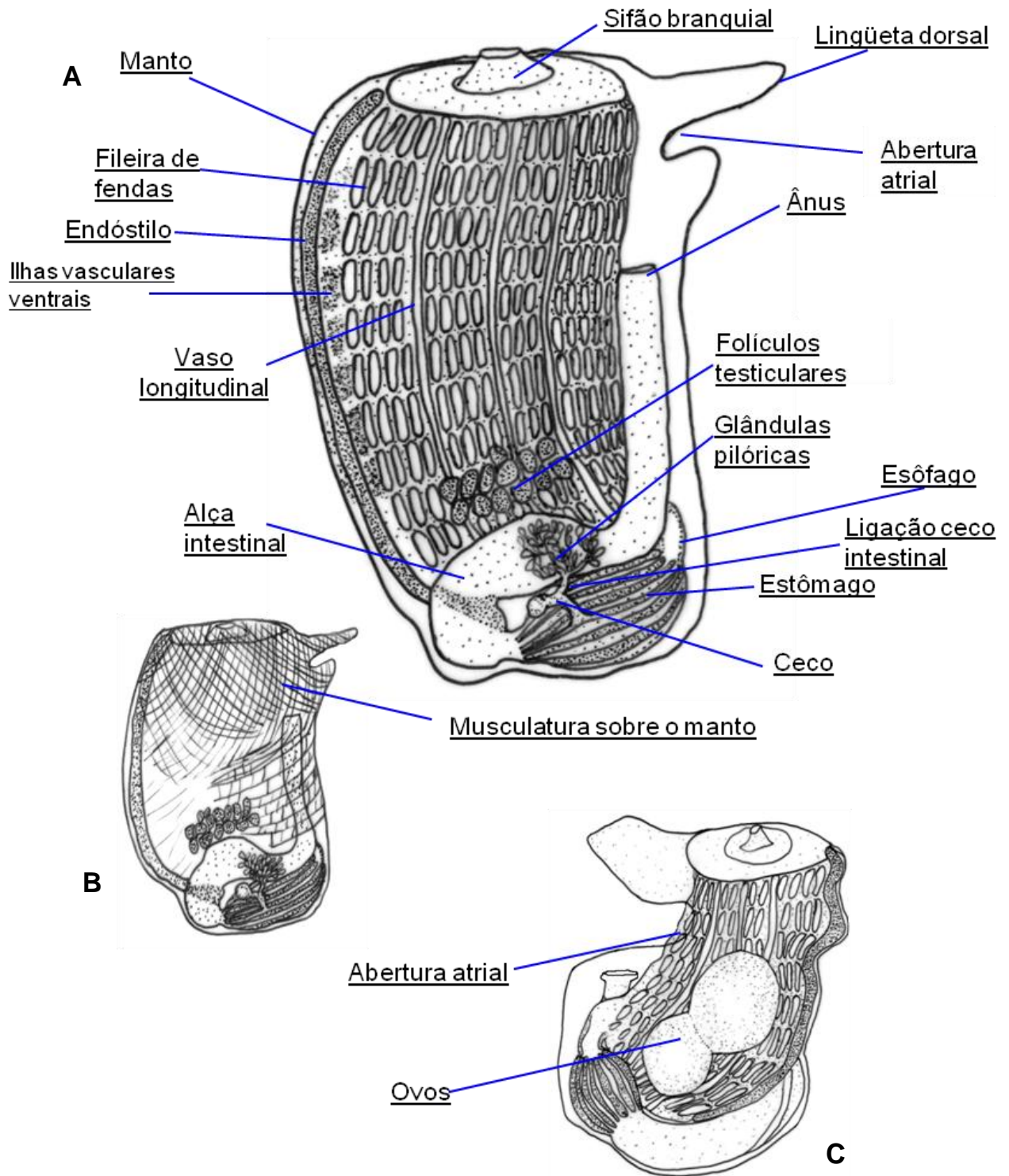


Figura 23. Caracteres dos zoóides utilizados na análise filogenética: A, Zoóide e respectivas estruturas morfológicas; B, musculatura sobre o manto; C, linhas indicando ovos e abertura atrial.

Tabela 1. Caracteres e seus respectivos estados utilizados na análise filogenética.

Caracteres	Estados		
2- Forma dos sistemas	0- Circulares	1- Fileiras lineares	
3- N°. fileiras na cesta branquial	0- Mais que 12	1- Seis a doze	2- Quatro
4- Presença das Ilhas Vasculares Ventrals	0- Ausente	1- Presente	
5- Segunda fileira de fendas incompleta	0- Presente	1- Ausente	
6- Posição das gônadas	0- Ovário em posição dorsal aos testículos	1- Ovário em posição ventral aos testículos	
7- N°. de óvulos em cada lado do corpo	0- Dois ou mais	1- Um	
8- N°. de folículos testiculares em cada lado do corpo	0- Mais de seis	1- Seis	
10- Forma de incubação larval	0- Cavidade atrial	1- Bolsa de incubação	2- Zoóide incubador
11- Forma do estômago	0- Oval	1- Afunilado	
12- N°. de pregas no estomago	0- Mais de dez	1- Menos de dez	
14- Ceco pilórico	0- Curto	1- Médio	2- Alongado
15- N° ligações ceco-pilóricas	0- Duas	1- Uma	
16- Região de ligação no ceco	0- Extremidade distal	1- Mediana	2- Basal
17- Extremidade do ceco	0- Cilíndrica	1- Arredondada	
18- Forma das glândulas pilóricas	0- Ramificadas	1- Enfileiradas	2- Empelotadas
20- N° de ordens de tamanho nos tentáculos orais	0- Três	1- Duas	
21- Tipo de abertura atrial	0- Abrindo-se na superfície da colônia	1- Abrindo-se na região cloacal	
23- Forma do ânus	0- Bilobado	1- Circular	
24- Posição do ânus quanto à cesta branquial	0- Meio da cesta	1- Metade posterior da cesta	2- Metade anterior da cesta
25- Musculatura	0- Fibras oblíquas	1- Fibras longitudinais	2- Ramificadas

4.2.1. Descrição dos caracteres:

2- Forma dos sistemas: organização encontrada nos sistemas das diferentes colônias:

0. Circulares ou ovais

1. Fileiras

Esta é a única subfamília fora de Aplousobranquia em que os zoóides formam sistemas (Kott, 1985). Os botrilíneos possuem sistemas arranjados sob duas formas: na primeira, os zoóides podem estar agrupados de forma circular ou ovais, como em *Botryllus* cf. *primigenus*, *B.* cf. *tuberatus*, *B. planus* e *Botryllus* sp. n., sendo que o formato circular às vezes apresenta um aspecto estrelado, como em *Botryllus schlosseri*. A outra forma é apresentada através do arranjo sob a forma de fileiras lineares, geralmente formadas por fileiras duplas, como pode ser visto em *Botrylloides giganteum*, *B. nigrum*, *B. leachi*, *B. magncoecum*, *Botryllus humilis* e *B. tabori*.

A condição circular foi considerada plesiomórfica, pois nela não existem ainda canais cloacais típicos e representaria um estado intermediário entre o que se vê em *Symplegma* e nos botrilíneos com sistemas lineares.

3 - Número fileiras de fendas na cesta branquial (Fig. 23 A):

0. Mais que 12

1. Seis a doze

2. Quatro

A cesta branquial dos botrilíneos apresenta três vasos longitudinais internos em ambos os lados, e um número de fileiras de fendas que varia de acordo com a espécie. Foi observado neste trabalho que elas apresentavam um padrão de mais que doze, seis a doze e quatro fileiras. O grupo externo apresentou-se com mais que doze fileiras e por essa razão acredita-se que em uma série de transformações o número de fileiras de fendas tende a ter uma redução e portanto

o estado mais que doze fileiras de fendas constituiria o estado plesiomórfico. Dessa forma, a seqüência de transformações seria 0-1-2 e este caráter foi considerado ordenado.

4- Presença de ilhas de fagócitos próximas ao endóstilo (Ilhas Vasculares Ventrals) (Fig. 23 A):

0. Ausente

1. Presente

Em alguns dos espécimes analisados foi observada a presença de acúmulos de células sanguíneas entre o endóstilo e a primeira fenda das fileiras. Okuyama & Saito (2001) chamaram esses grânulos de aglomerado celular, tendo sido observados e figurados em outros trabalhos, como em Okuyama & Saito (2002), Saito & Nagasawa (2003) e Saito & Okuyama (2003), com a descrição de novas espécies. Recentemente, Robert Lauzon (2007) denominou estas estruturas de Ilhas Vasculares Ventrals (Ventral Vascular Islands), demonstrando serem compostas pelo acúmulo de fagócitos responsáveis pela remoção de restos celulares durante a apoptose programada de *Botryllus schlosseri*. Nos botrilíneos é comum a reciclagem do blastozoóide, com sua morte programada e reposição por brotamento, de forma que os fagócitos realizam um ciclo, formando as ilhas vasculares ventrais e depois se dispersando nos estágios finais da morte do zoóide. A presença deste caráter foi considerada como sendo bastante recente, pois só foi figurado e mencionado nos trabalhos acima citados. No entanto, além de sua recente descrição ele também não esteve presente no grupo externo e por isso consideramos sua ausência como estado plesiomórfico.

5- Segunda fileira de fendas da cesta branquial incompleta:

0. Presente

1. Ausente

Nos animais estudados observou-se que alguns possuíam a segunda fileira de fendas não alcançado a lâmina dorsal, como em *Botrylloides giganteum*, *B. nigrum* e *Botryllus planus*. Isso ocorre também em *Symplegma rubra*, de forma que este estado foi considerado como plesiomórfico.

6 - Posição das gônadas (Fig. 23 A e C):

- 0. Ovário em posição dorsal aos testículos
- 1. Ovário em posição ventral aos testículos

Esse tem sido o principal caráter utilizado para distinguir os gêneros de Botryllinae. A distinção foi feita pelo posicionamento do ovário em relação ao testículo. Ovário em posição dorsal ao testículo, *Botrylloides*, em posição ventral, *Botryllus* (Kott, 1985). O grupo externo (*Symplegma rubra* e *S. brakenhielmi*) apresenta o ovário em uma posição distinta do grupo interno, estando posicionado entre os testículos.

7 - Número de ovos em cada lado do corpo (Fig. 23 C):

- 0. Dois ou mais
- 1. Um

O número de ovos pode variar entre as espécies. *Botrylloides giganteum*, *B. nigrum*, *B. magnicoecum*, *B. leachi*, *Botryllus humilis*, *B. cf. primigenus* e *B. cf. tubertatus* e *B. planus*, quando maduras, possuem apenas um ovo de cada lado do corpo. Outras espécies possuem dois ou mais ovos em cada lado do corpo, como em *Botryllus tabori* e *B. schlosseri*. Em comparação com o grupo externo observou-se que o estado dois ou mais ovos em cada lado do corpo é a característica plesiomórfica.

8 - Número de folículos testiculares em cada lado do corpo (Fig. 23 A)

- 0. Mais de seis
- 1. Seis

O número de folículos testiculares também é diferente conforme a espécie. Algumas possuíam apenas seis folículos, como *Botryloides giganteum*, *Botrilloides nigrum* e *Botryllus* cf. *primigenus*, enquanto que as demais espécies apresentaram mais que seis folículos testiculares. A condição plesiomórfica do caráter foi considerada como mais de seis folículos em cada lado do corpo.

10 - Forma de incubação larval

- 0. Cavidade atrial
- 1. Bolsa de incubação
- 2. Zoóide incubador

Na subfamília Botryllinae as colônias possuem formas diferentes de incubação de suas larvas. Algumas colônias podem incubá-las dentro da cavidade atrial dos zoóides, outras em uma extensão da região do manto, formando uma bolsa. Uma terceira forma de incubação foi vista em *Botryllus* cf. *tuberatus*, em que existe um zoóide não funcional no qual estão presentes de quatro a seis larvas. A forma de incubação larval tem sido um dos critérios utilizados para a diferenciação entre os gêneros: larvas incubadas dentro da cavidade atrial do zoóide, *Botryllus*, em bolsas laterais dos zoóides, *Botrylloides*. Porém, uma espécie aqui estudada possui as características de ambos os gêneros, *Botryllus* cf. *primigenus*, o que também foi notado por Monniot & Monniot (1987).

Portanto se comparando ao grupo externo, o estado “larvas incubadas na cavidade atrial” poderia ser considerado plesiomórfico, mas este caráter não foi considerado como ordenado.

11- Formas do estômago (Fig. 23 A)

- 0. Oval
- 1. Afunilado

A forma do estômago variou, apresentando os estados acima observados. O estado “estômago oval” foi considerado plesiomórfico em comparação com o grupo externo funcional e foi o mais comum entre os Botryllinae. O estado “oval” foi encontrado em todos os *Botryllus* e um *Botrylloides* (*Botrylloides magnicoecum*), enquanto que “afunilado” foi observado nos demais *Botrylloides*.

12 - Número de pregas no estômago (Fig. 23 A)

- 0. Dez ou mais
- 1. Menos de dez

O estômago dos botrilíneos apresenta pregas marcadas na sua superfície. Nos animais analisados elas apresentaram-se sob duas condições: com dez ou mais pregas, como em *Botrylloides giganteum*, *Botryllus humilis*, *Botryllus tabori* e *Botryllus Schlosseri*, ou com menos que dez, como em *Botrylloides nigrum*, *Botryllus cf. tuberatus*, *Botryllus planus*, *Botryllus cf. primigenus* e *Botryllus sp.n.* O grupo externo apresentou o estado “dez ou mais pregas”, sendo então considerado este o estado plesiomórfico.

14 - Tamanho do ceco (Fig. 23 A)

- 0. Curto
- 1. Médio
- 2. Alongado

O ceco, ou ceco pilórico, é uma estrutura tubular posicionada na parede do estômago, entre as pregas, com sua extremidade geralmente apontando para o intestino. Foram consideradas três categorias de tamanho nos exemplares analisados, sendo uma de tamanho mais curto como em *Botrylloides giganteum* e *B. nigrum*, outra intermediária de tamanho médio como em *Botryllus humilis*, *B. cf. tuberatus* e *B. cf. Primigenus* e outra com um tamanho mais alongado como em *Botryllus tabori*, *B. planus* e *Botryllus sp. n.* Em comparação com o grupo externo o estado ceco com o tamanho curto (0) foi considerado plesiomórfico e em uma

série de transformações ele teria passado para o estado intermediário médio (1) e posteriormente ao estado alongado (2). Desta forma, este carácter foi considerado ordenado, conforme a série descrita.

15 - Número de ligações ceco-pilóricas (Fig. 23 A)

- 0. Duas
- 1. Uma

Na região compreendida entre ceco e o intestino geralmente existe uma pequena estrutura vascular de ligação entre o ceco e as glândulas pilóricas no intestino. Foram visualizados espécimes apresentando uma ou duas ligações ceco-pilóricas. *Botryllus humilis* e *B. cf. primigenus* foram as únicas a apresentarem duas ligações, enquanto nas demais foi observada apenas uma ligação. Em *Symplegma* é mais comum a presença de duas ligações, sendo considerado o estado plesiomórfico.

16 - Região de ligação no ceco (Fig. 23 A)

- 0. Extremidade distal
- 1. Mediana
- 2. Basal

O local de onde parte a ligação ceco-intestinal apresenta variações típicas para cada espécie. Em *Botryllus humilis* e *B. cf. primigenus* elas partiam desde a extremidade distal do ceco. No caso de *Botryllus cf. tuberatus*, *B. schlosseri* e *B. planus* as ligações davam-se na região mediana, ou seja, no meio do ceco. Por fim em *Botrylloides giganteum*, *B. nigrum*, *Botryllus tabori*, e *Botryllus* sp.n. a ligação partia da região basal do ceco. Neste carácter se considerou que a posição da ligação ceco-intestinal em sua forma ancestral era feita na extremidade distal, como em *Symplegma*, passando para posições mais basais ao longo de uma série de transformação. Este carácter foi considerado, dessa forma, como ordenado.

17- Extremidade do ceco (Fig. 20 A)

- 0. Cilíndrica
- 1. Arredondada

Nos diferentes espécimes o ceco apresentou a extremidade distal sob duas formas: com a extremidade acompanhando o formato cilíndrico do órgão, que ocorreu em *Botryllus tabori*, *B. planus*, *B. cf. primigenus* e *Botryllus sp. n.* ou apresentando a extremidade com a forma mais arredondada e intumescida, como apresentado nas demais espécies.

O estado cilíndrico foi considerado plesiomórfico em comparação com o grupo externo. Este caráter tem sido pouco utilizado em estudos taxonômicos em botrílineos e pode ser mais uma característica para auxiliar na distinção entre as espécies *Botryllus cf. tuberatus* e *B. cf. primigenus*.

18 - Forma das glândulas pilóricas (Fig. 20 A)

- 0. Ramificadas
- 1. Enfileiradas
- 2. Empelotadas

As glândulas pilóricas são estruturas presentes geralmente acima da alça intestinal nos botrílineos. Elas estiveram presentes sob três formas: ramificadas como em *Botrylloides giganteum*, *Botryllus tabori*, *B. cf. tuberatus* e *B. schlosseri*, enfileiradas como em *Botrylloides nigrum*, *Botryllus cf. primigenus* e *Botryllus sp. n.*, ou ainda empelotadas, ou seja, glândulas em forma de pequenas vesículas sobre o intestino, como em *Botryllus humilis* e *B. planus*. Este caráter é multi-estado e não ordenado, com igual custo para as transformações entre as 3 variações.

20 – Número de ordens de tamanho nos tentáculos orais

- 0. Três
- 1. Duas

Além dos diferentes números de tentáculos, os botrilíneos apresentam seus tentáculos também sob duas formas, com duas ou três ordens de tamanho. *Botrylloides giganteum*, *Botryllus humilis*, *B. tabori*, *B. cf. tuberatus* e *Botryllus sp.n.* foram as espécies que apresentaram tentáculos com três ordens de tamanho, enquanto que *Botrylloides nigrum*, *Botryllus schlosseri*, *B. planus*, *B. cf. primigenus* possuem apenas 2 tamanhos diferentes de tentáculos (2 ordens).

21 – Tipos de abertura atrial (Fig. 20 A)

- 0. Abrindo-se na superfície da colônia
- 1. Abrindo-se na região cloacal

A abertura atrial nos botrilíneos geralmente abre-se dentro do canal cloacal, posicionado dentro do sistema. Porém, há registros de algumas poucas espécies com um sifão atrial abrindo-se diretamente na superfície da colônia, tais como *Botryllus primigenus* (Oka, 1928) do Japão e *Botryllus anomalus* (Millar, 1962) do Sul da África. Dos espécimes analisados neste trabalho apenas *Botryllus cf. primigenus* apresentou o estado (0) com um sifão atrial abrindo-se diretamente na superfície da colônia. Tal estado também é típico do grupo externo e portanto foi considerado plesiomórfico.

23 - Forma do ânus (Fig. 20 A)

- 0. Bilobado
- 1. Circular

O ânus dos botrilíneos está posicionado na porção final do tubo intestinal, ou seja, no final do reto e apresentou-se sob duas formas, podendo ser bilobado ou

circular. Comparando-se com o grupo externo, considerou-se o estado bilobado como plesiomórfico.

24 - Posição do ânus quanto à cesta branquial:

- 0. Meio da cesta
- 1. Metade posterior da cesta
- 2. Metade anterior da cesta

Entre as diferentes espécies verificou-se que a posição do ânus em relação à cesta branquial é variável. Dessa forma foram considerados três estados: com o ânus abrindo-se na região mediana da cesta (0), ânus localizado na metade posterior (1) e ânus localizado na metade anterior (2).

A comparação com o grupo externo não permitiu a ordenação dos estados em uma série de transformações.

25 - Musculatura

- 0. Fibras oblíquas
- 1. Fibras longitudinais
- 2. Fibras ramificadas

A musculatura dos botrilíneos não vem sendo utilizada para sua identificação. Este caráter foi estudado em detalhe no presente trabalho e os espécimes analisados apresentaram diferentes formas de organização da musculatura no manto. De maneira geral se pode separar a organização dos feixes musculares em três estados: apresentando-se oblíquas em relação ao endóstilo, como em *Botryllus schlosseri* e *Botryllus planus*, com fibras longitudinais, como em *Botrylloides giganteum*, *Botryllus tabori*, *Botryllus cf. tuberatus*, *Botryllus humilis* e *Botryllus cf. primigenus*, ou ainda fibras ramificadas, como em *Botrylloides nigrum* e *Botryllus* sp. n.

Não foi possível também nesse caso ordenar os estados, e o caráter foi analisado como não ordenado.

Tabela 2. Matriz polarizada de estados de caracteres morfológicos das espécies analisadas. Os números dos caracteres correspondem àqueles do item 4.2.1. Sinais “?” indicam incertezas quanto ao estado do caráter.

Táxons	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	14	15	16	17	18	20	21	23	24	25
<i>Botrylloides giganteum</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	2	0	0	1	2	1	0	0	1	0	3	1
<i>Botrylloides leachi</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	?	?	0	?	1	1	0	1	?
<i>Botrylloides magnicoecum</i>	1	1	0	1	1	1	0	?	0	1	1	1	0	1	2	1	1	1	1	?
<i>Botrylloides nigrum</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1	0	1	2	1	1	1	1	0	1	2
<i>Botryllus humilis</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0	1	0	1	2
<i>Botryllus planus</i>	0	1	0	0	0	1	1	?	0	1	2	0	1	0	2	1	1	0	1	0
<i>Botryllus cf. primigenus</i>	0	2	0	1	0	1	?	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	2	1
<i>Botryllus schlosseri</i>	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
<i>Botryllus sp. n.</i>	0	1	0	1	0	?	?	?	0	1	2	1	2	0	0	0	1	1	1	2
<i>Botryllus tabori</i>	1	1	0	1	0	0	1	?	0	0	2	1	2	0	0	0	1	1	1	1
<i>Botryllus cf. tuberatus</i>	0	2	0	1	0	1	?	2	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1
<i>Symplegma brakenhielmi</i>	?	1	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	?
<i>Symplegma rubra</i>	?	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

4.2.2. Filogenia

A busca heurística por uma árvore mais parcimoniosa resultou em 3 árvores de igual comprimento (Fig. 24), com 60 passos, índice de consistência igual a 0, 4500 e índice de retenção 0, 5417. Posteriormente, foi utilizado o consenso estrito para a obtenção de um cladograma contendo apenas os clados que apareceram nas três árvores mais parcimoniosas (Fig. 25). O único ponto conflitante entre as árvores é a posição de *Botryllus schlosseri*, que no cladograma de consenso estrito é colocado na base do maior clado de *Botryllus*.

Em última instância, a análise cladística é um estudo da evolução dos caracteres, buscando uma solução que maximize a congruência entre as hipóteses para cada caráter. O resultado final possibilita a identificação das homologias secundárias e de eventuais (mas sempre freqüentes) homoplasias. As homoplasias são, na verdade, equívocos no estabelecimento das hipóteses de homologia primária. Como o presente trabalho trata de características morfológicas, a discussão das hipóteses sobre a evolução de cada uma dessas características é muito importante.

Para isso, um dos três cladogramas foi escolhido e editado para apresentar os caracteres e seus respectivos estados (Fig. 26). A análise sobre os estados dos caracteres observados para o cladograma da Figura 26 será discutido a seguir (v. Anexo I). Os números entre parênteses indicam o número do caráter conforme apresentado no item 4.2.1, podendo incluir o seu estado (0, 1 ou 2) após o ponto.

Os sistemas em forma de fileiras (2.1) surgiram reunindo todos os *Botrylloides* no nó 16, que foi um estado mais comum para este gênero, porém este estado apareceu também nos *Botryllus* mais de uma vez, ocorrendo em *Botryllus tabori* e *B. humilis* (Fig. 23). Isso demonstra, portanto, que este não constitui um bom caráter para uma possível distinção entre os gêneros, como foi também observado nos critérios de classificação comentados por Kott, (1985).

O número de fileiras na cesta branquial (3) mostrou ser um caráter consistente, embora o aumento no número de fileiras presente em *Botrylloides giganteum* seja indicado como reversão. No nó 17 os táxons irmãos *Botryllus*

tuberatus + *B. primigenus* mostra uma redução no número de fileiras de fendas, passando do estado intermediário seis a doze (3.1) para o de quatro fileiras de fendas (3.2), sendo essa a sinapomorfia para este clado.

A presença de acúmulos de células sanguíneas próximos ao endóstilo (4.1) esteve presente nas espécies *Botrylloides nigrum* e *Botryllus schlosseri*. Estudos recentes apresentados por Lauzon (2007), analisando os padrões de desenvolvimento assexual em *Botryllus schlosseri*, demonstraram que esses acúmulos se tratam na verdade de uma população de fagócitos, os quais denominou “Ilhas vasculares ventrais”, e estão presente nos zoóides maduros que geram assexuadamente. Este caráter foi observado muito recentemente e precisa ser melhor estudado e compreendido, para verificar a conveniência de sua utilização como caráter para a taxonomia e sistemática. Aparentemente não são todas as espécies que apresentam a formação destas ilhas vasculares ventrais, mas na hipótese gerada sua presença não é indicativa de afinidade filogenética.

O caráter “segunda fileira de fendas incompletas” (5) mostrou-se consistente e sua ausência (5.1) representa uma sinapomorfia para maior clado basal dos Botryllinae (nós 23→21). A exceção ocorre em *Botrylloides nigrum*, que apresentou uma reversão do estado ausente para o estado presente (5.0). Este caráter tem sido suprimido em muitos trabalhos taxonômicos sobre Botryllinae (Saito, comunicação pessoal) e sua observação pode auxiliar muito na identificação das espécies.

A posição das gônadas (6), que trata da disposição do ovário em relação aos testículos, se mostrou um caráter bastante congruente. Segundo a análise, ele teria evoluído do estado onde o ovário está em posição dorsal aos testículos (6.0) para estado no qual o ovário se encontra em posição ventral ao testículo (6.1). Observando o cladograma (Fig. 21) pode-se perceber que o estado 6.1 é a sinapomorfia que apoia a monofilia dos *Botrylloides*. Este corresponde ao principal caráter utilizado na distinção dos gêneros de Botryllinae (Van Name, 1945; Saito *et al.*, 2001);

O caráter número de ovos em cada lado do corpo (7) aponta uma mudança do estado “dois ou mais ovos de cada lado” (7.0) para o estado “um ovo de cada

lado” (7.1) entre os nós 24 e 23, sendo esse o estado mais comum para todo os Botryllinae. No entanto, uma reversão da condição 7.0 para a condição 7.1 apoia o clado composto por *Botryllus schlosseri* e *B. tabori* + *Botryllus* sp. n. Dessa forma, o aumento no número de ovos evidenciado nestas espécies não seria homólogo à condição presente em *Symplegma*.

Analisando o caráter “número de folículos testiculares em cada lado do corpo” (8) observou-se um grande número de homoplasias. O estado teria mudado de mais de seis folículos (8.0) para seis folículos (8.1), aparecendo em *Botrylloides nigrum* e dando suporte ao clado composto pelas espécies *Botryllus tabori* e *B.* sp. n. Este estado surgiu também apoiando o clado *B. humilis* + *B. planus*.

A forma de incubação larval (10) se mostrou um caráter bem consistente e teria se modificado da condição “larvas incubadas na cavidade atrial” (10.0) para “larvas incubadas em uma bolsa” (10.1), que apoia o clado composto pelos *Botrylloides*, *Botryllus primigenus* e *B. tuberatus*. Em *B. tuberatus* houve uma nova modificação do estado 10.1 para 10.2 (zoóide incubador), que resultou em uma autapomorfia para este táxon. A forma de incubação larval havia sido um dos critérios de distinção dos gêneros sugerido por Kott, (1985), porém Monniot & Monniot (1987) discordaram quanto ao uso deste caráter por existirem espécies com características reprodutivas comuns aos dois gêneros. Isto foi verificado em nos *Botryllus* com 4 fileiras de fendas (*B. primigenus* e *B. tuberatus*), que também compartilharam a mesma condição com *Botrylloides*, mostrando que esta não é uma sinapomorfia para *Botrylloides*.

A forma do estômago é também um caráter congruente, e a mudança de seu estado teria sido da forma oval (11.0) para a forma afunilada (11.1), sendo esta a sinapomorfia que apoia o clado composto por *B. gigantem* (*B. nigrum* + *B. leachi*). Dentre os *Botrylloides*, apenas *B. magnicoecum* não compartilha este estado, ficando de fora deste clado.

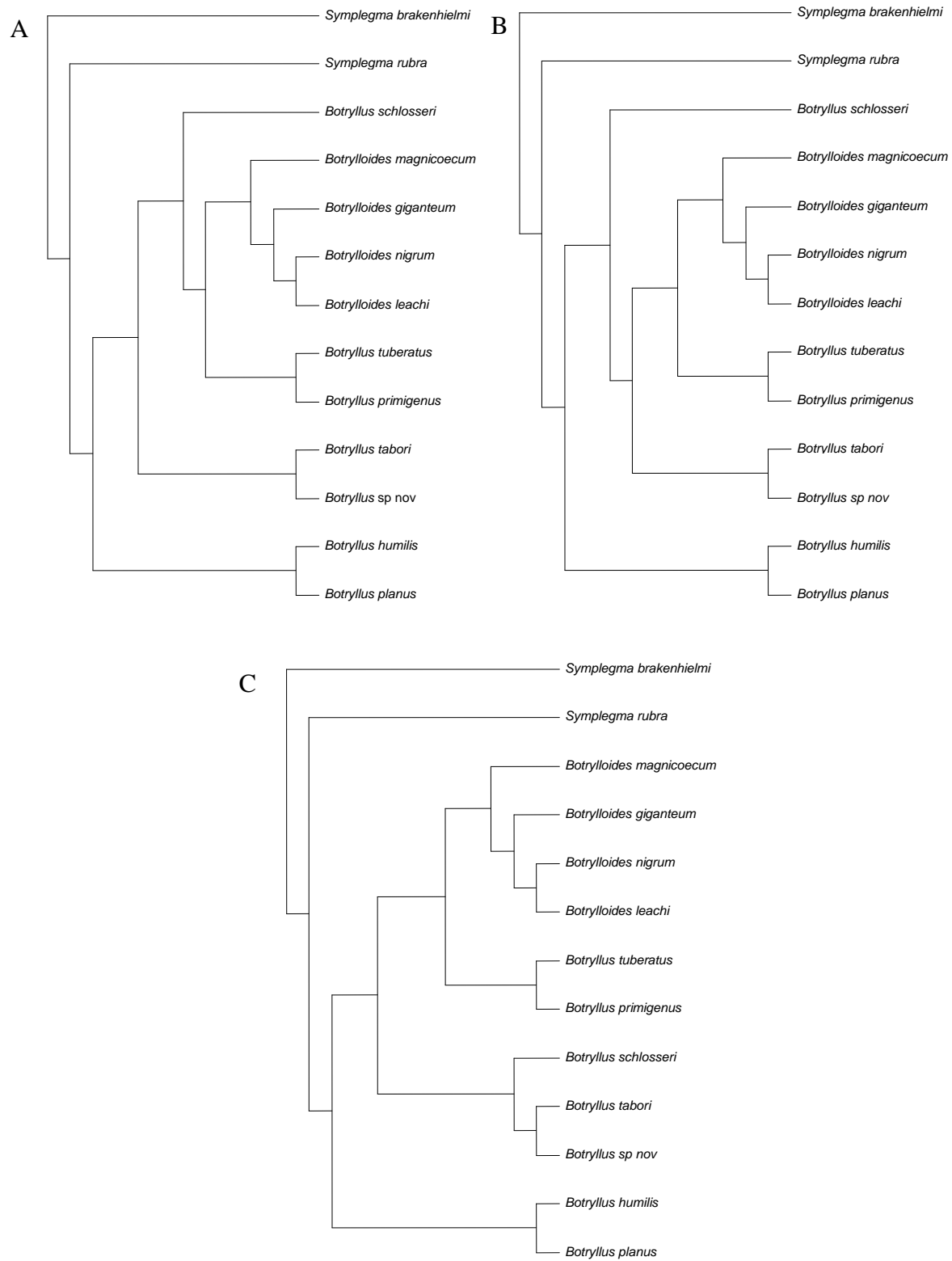


Figura 24. Topologia dos três cladogramas mais parcimoniosos encontrados na análise.

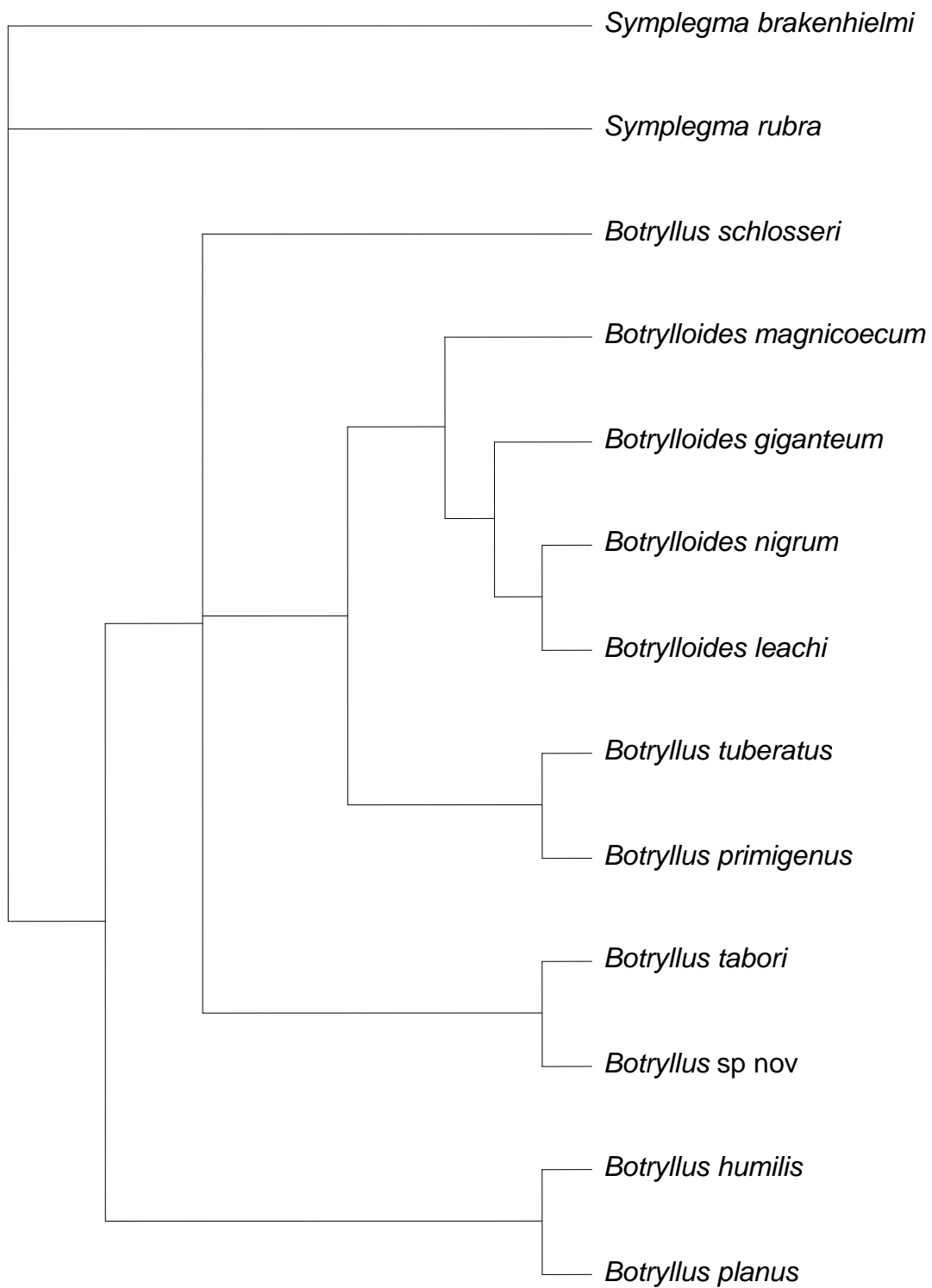


Figura 25. Cladograma de consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosas.

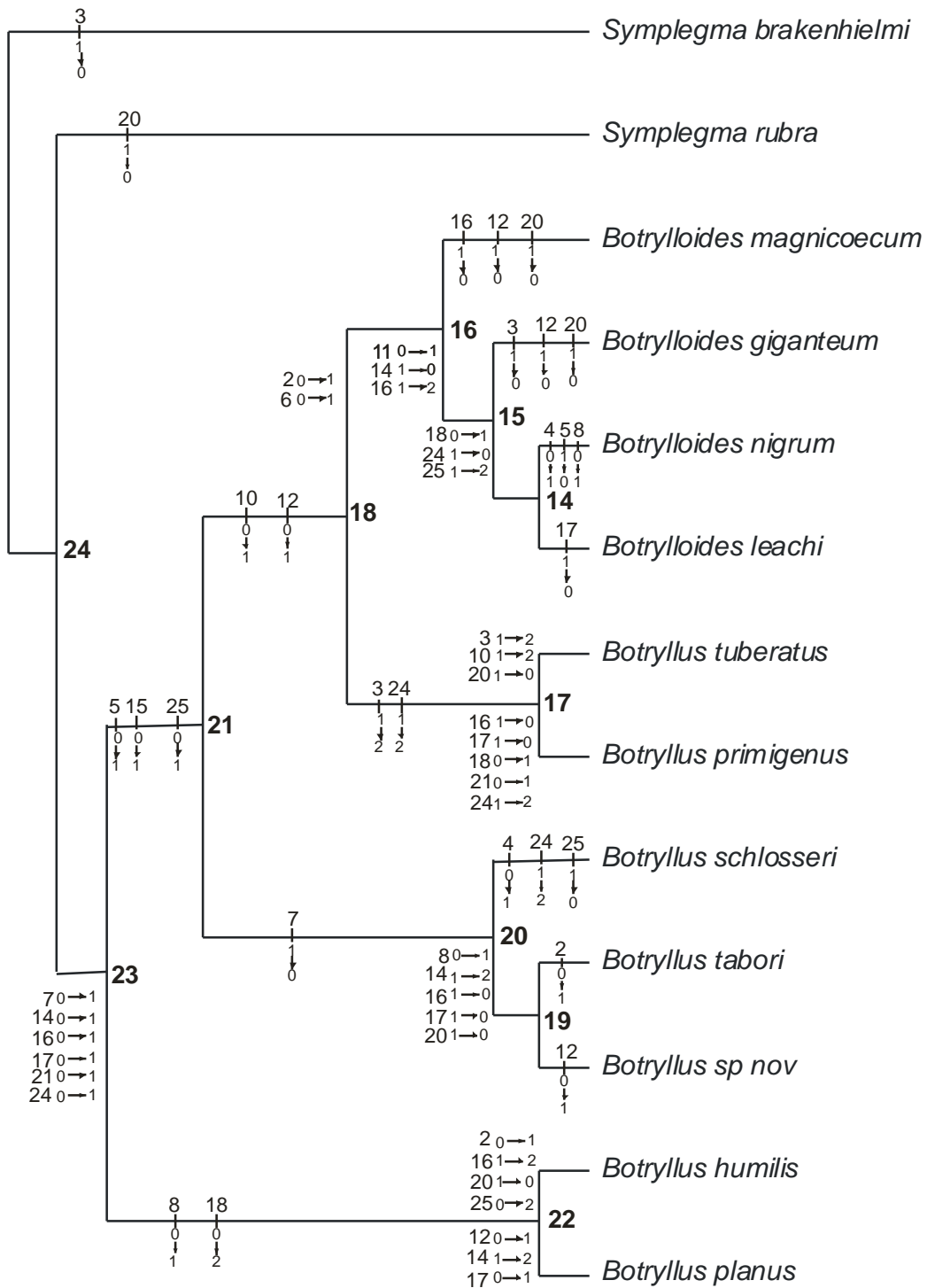


Figura 26. Um dos cladogramas mais parcimoniosos (clad. C), seus caracteres e respectivas mudanças de seus estados. Números em negrito correspondem aos nós, os demais aos caracteres e seus estados para cada táxon.

Ao ser analisado o número de pregas no estômago (12), observou-se que se trata de um caráter pouco congruente, apresentando muitas homoplasias. O estado “dez ou mais pregas no estômago” (12.0) foi modificado entre os nós 21 e 18 para a condição “menos que dez” (12.1). Aparecem, contudo, reversões em *Botrylloides giganteum* e *Botrylloides magnicoecum* e convergências em *Botryllus* sp n e *B. planus*. Um estudo mais detalhado da anatomia do estômago dos botrilíneos pode revelar outros aspectos que possam indicar melhor as condições de homologia.

O tamanho do ceco (14) é um caráter polimórfico e aparentemente consistente. Este caráter passou do estado “curto” (14.0) para o estado “médio” (14.1) na base dos Botryllinae tendo revertido para a condição plesiomórfica entre os nós 16 e 15. A passagem do estado “médio” (10.1) para “alongado” (10.2) apoia apenas *Botryllus tabori* + *Botryllus* sp n, com um convergências autapomórfica em *Botryllus planus*.

Observando o cladograma da Figura 26, verifica-se que o caráter “número de ligações ceco-pilóricas” (15) foi muito consistente, apoiando o clado formado pela maioria dos botrilíneos, deixando de fora apenas *Botryllus humilis* + *B. planus*, que possuem duas ligações no ceco.

A região de ligação do ceco (16) foi um caráter que apresentou muitas homoplasias. Seus diferentes estados apareceram em muitos ramos, como pode ser visto na Figura 26. Em uma primeira instância ele teria mudado da condição “distal” (16.0) para a condição “mediana” (16.1) na base dos Botryllinae. Sofreu uma modificação da condição 16.1 para a condição “basal” (16.2) que foi compartilhada pela maioria dos *Botrylloides*, com exceção de *Botrylloides magnicoecum*, que apresentou uma reversão do estado 16.1 para 16.0. Essa reversão também surgiu para *Botryllus primigenus* e *B. humilis*.

A extremidade do ceco (17) foi um caráter que, como o anterior, mostrou pouca consistência, apresentando muitas homoplasias. Embora a transição do estado plesiomórfico para o apomórfico suporte a subfamília, 4 reversões dos estados 17.1 para 17.0 aparecem nos táxon terminais *Botrylloides leachi*, *Botryllus*

primigenus, e *B. planus*. Também surgiu outra reversão como a anterior no clado composto por *Botryllus tabori* + *Botryllus* sp. n.

A forma das glândulas pilóricas (18), tal como proposto na análise, também apresentou alguns problemas. A transformação da condição plesiomórfica “glândulas ramificadas” (18.0) para a condição “glândulas enfileiradas” (18.1) apoia o clado composto por *Botrylloides nigrum* + *Botrylloides leachi*. Esta mudança também ocorreu de forma independente para o táxon terminal *Botryllus primigenus*. A forma da glândula de *Botrylloides magnicoecum* e de *Botryllus humilis* + *Botryllus planus*, apesar de semelhantes, não tiveram sua homologia apoiada pela análise combinada dos caracteres. É importante ressaltar, no entanto, que *Botrylloides magnicoecum* foi incluído a partir de dados da literatura, se que se comparasse esta espécie com o material do litoral brasileiro.

O caráter “número de ordens de tamanho dos tentáculos orais” (20) também não se revelou consistente. Várias reversões da condição “tentáculos com duas ordens de tamanho” (20.1) para sua condição plesiomórfica “tentáculos com três ordens de tamanho” (20.0) surgem no cladograma, e apareceram tanto no grupo externo, para *Symplegma rubra*, como nos táxons terminais *Botrylloides giganteum*, *Botryllus tuberatus*, *Botryllus humilis* e no clado composto pelas espécies irmãs *Botryllus tabori* + *Botryllus* sp. n.

O caráter 21 (tipo de abertura atrial) na verdade representa uma das características mais marcantes dos Botryllinae, como parte da família Styelidae, pois é resultado exatamente da formação de sistemas. A análise indica que a condição de *Botryllus* cf. *primigenus*, com sífões abrindo-se diretamente na superfície da colônia, não é homóloga à condição dos outros Styelidae coloniais, tendo surgido de maneira independente.

Como pode ser visto no na Figura 26, a forma do ânus foi um caráter um pouco mais consistente, apoiando o clado composto pelas espécies (*Botryllus schlosseri* (*Botryllus tabori* + *Botryllus* sp. n.)), mas surgindo de forma independente como autapomorfia para *Botrylloides magnicoecum*.

A posição do ânus em relação à cesta branquial (24) foi bastante congruente em relação às topologias obtidas. A mudança de uma posição central

para uma condição mais ventral apoia a subfamília como um todo (24.0→24.1) e *Botryllus tuberatus* + *Botryllus primigenus* (24.1→24.2). Ocorre também uma reversão apoiando o clado *Botrylloides nigrum* + *B. leachi* (24.1→24.0) e uma convergência autapomórfica em *Botryllus schlosseri* (24.1→24.2).

O caráter relativo à musculatura dos botrílineos (25) apresentou algumas homoplasias, como pode ser visto no cladograma da Figura 26. Na base do cladograma (entre os nós 23 e 21) a condição plesiomórfica “fibras oblíquas” (25.0) se modificou para a condição “fibras longitudinais” (25.1). Outra mudança (25.1→25.2) surgiu para apoiar o clado composto por *Botrylloides nigrum* + *B. leachi*. Além disso, é indicada uma reversão para *Botryllus schlosseri* e uma mudança da condição plesiomórfica para musculatura disposta em fibras ramificadas (25.2) em *Botryllus humilis*.

Como pode ser visto na Figura 24, a topologia dos cladogramas quase não sofreu modificações, somente o posicionamento do táxon *Botryllus schlosseri* aparecendo em ramos diferentes em cada cladograma, o que levou ao aparecimento de uma politomia no cladograma de consenso estrito (Fig.25). O cladograma de consenso mostra a hipótese mais parcimoniosa encontrada neste trabalho para os Botryllinae da costa Brasileira.

A Figura 25 mostra que apenas o clado composto pelos representantes do gênero *Botrylloides* foram monofiléticos, (*Botrylloides magnicoecum* (*B. giganteum* (*B. nigrum*, *B. leachi*))), apoiado unicamente pela sinapomorfia “ovário em posição ventral em relação aos testículos”. Esta condição constitui o único critério observado que pode diferenciar os *Botrylloides* dos demais *Botryllus*, confirmando as observações feitas por Van Name, (1945) e por Saito et al., (2001).

O caráter forma de incubação larval não se mostrou um bom critério para a definição dos gêneros, como sugerido por Kott (1985) e também pelo próprio Van Name (1945), pois o mesmo estado para este caráter foi encontrado tanto em representantes de *Botrylloides* quanto de *Botryllus*.

O gênero *Botryllus* mostrou-se parafilético, tendo formado três cladogramas distintos, além de *Botryllus schlosseri*, que não teve seu posicionamento bem resolvido. O mais basal, composto pelas espécies irmãs *Botryllus humilis* e *B.*

planus, apoiado pelas sinapomorfias “seis folículos testiculares em cada lado do corpo” e pela “glândula pilórica empelotada”. O outro, de posição intermediária entre os *Botryllus*, foi o clado composto pelos táxons *Botryllus tabori* e *Botryllus* sp. n., apoiado principalmente pelas sinapomorfias “seis folículos testiculares em cada lado do corpo” e “ceco alongado”. O clado de *Botryllus* que mais se aproximou dos *Botrylloides*, foi composto pelos táxons *Botryllus tuberatus* + *B. primigenus*, apoiado pelos estados “quatro fileiras de fendas” e “ceco alongado”.

Uma hipótese semelhante sobre a filogenia do grupo foi proposta por Saito et al. (2001) através de análise filogenética utilizando uma combinação de dados moleculares, morfológicos e comportamentais, para as espécies reportadas para o litoral japonês. O referido autor observou uma separação entre os grupos com quatro fileiras de fendas e o outro com mais de 5 fileiras de fendas, porém não conseguiu encontrar marcadores razoáveis para definir a divisão em diferentes táxons.

Cohen et al. (1998) estudaram a filogenia dos *Botrylloides* utilizando dados moleculares e dados comportamentais (alorreconhecimento) e também indicam a monofilia de *Botrylloides* e parafilia de *Botryllus*.

Okuyama & Saito (2002), em seus estudos com as espécies japonesas, propõem a divisão dos Botryllinae em cinco grupos, baseados na existência e origem do órgão incubador e arranjo das gônadas. Estes autores citam os seguintes critérios para esta divisão:

- 1- Zoóides sem órgão incubador e ovários em posição dorsal ao testículo;
- 2- Órgão incubador formado a partir do saco branquial e ovários em posição dorsal ao testículo;
- 3- Órgão incubador formado a partir do epitélio peribranquial e ovário em posição dorsal ao testículo;
- 4- Órgão incubador formado a partir do epitélio peribranquial e ovário em posição dorsal ao testículo, com testículos hemisféricos e apenas quatro fileiras de fendas;
- 5- Órgão incubador formado a partir do epitélio peribranquial e ovário em posição ventral ao testículo.

Os resultados aqui apresentados corroboram em parte a proposta de Okuyama & Saito (2002). Apesar de não se ter examinado em detalhe a origem do órgão incubador, o gênero *Botrylloides* foi monofilético, assim como os *Botryllus* com quatro fileiras de fendas. Um estudo histológico dos órgãos incubadores poderia revelar se estes critérios elaborados para os botrilíneos japoneses são válidos para as espécies do Atlântico também.

Apesar dos diversos trabalhos já citados, não há até o momento uma proposta efetiva de criação de novos gêneros, de forma a reorganizar este táxon. É necessária uma revisão taxonômica global, para que a validade dos critérios seja efetivamente testada. Outra dificuldade está relacionada ao fato de que alguns aspectos da biologia das espécies só podem ser estudados a partir de culturas em laboratório. Em paralelo, o aprimoramento de técnicas utilizando marcadores moleculares é esperada, de maneira a contribuir ainda mais para o estudo da evolução destes animais.

5 - CONCLUSÕES

- A subfamília Botryllinae possui 9 espécies na costa brasileira, sendo ao menos uma espécie nova e dois novos registros.
- Caracteres como o tipo de musculatura, posição da ligação ceco-pilórica e presença da segunda fileira de fendas incompleta mostraram-se úteis na diagnose e sistemática dos Botryllinae;
- A filogenia dos Botryllinae brasileiros foi reconstruída, sendo indicada a monofilia do gênero *Botrylloides*.
- A posição do ovário em relação ao testículo é um caráter válido para separação dos *Botrylloides* do Atlântico.
- O gênero *Botryllus* mostrou-se parafilético, podendo ser dividido em três grupos distintos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARON, S.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic evaluation of the taxonomic status of two varieties of the cosmopolitan ascidian *Botryllus niger* (Ascidiacea: Botryllidae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 19, p. 271-276. 1991.

BERRIL, N. J. Studies in tunicata development. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London. Ser. B, Part 5, 226: 43-70.1936.

BERRIL, N. J. The Development of a colonial organism: *Symplegma viride*. **Biological Bulletin**, Woods Hole. v. 79, No. 2, pp. 272-281, 1940.

BERRIL, N. J. Size and morphogenesis in the bud of *Botryllus*. **Biological Bulletin** Vol. 30, No. 2, p. 185-193. 1941.

BJORNBERG, T. K. S. Ascídias da Costa Sul do Brasil (nota prévia). **Ciência e Cultura**. Vol. 8, No. 3, p. 164-165, 1956.

CARBALLO, J.L.; NARANJO, S. Environmental assessment of a large industrial marine complex based on a community of benthic filter-feeders. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44 p. 05-610, 2002.

COHEN, C.S.; SAITO, Y.; WEISSMAN, I.L. Evolution of allorecognition in botryllid ascidians inferred from a molecular phylogeny. **Evolution**. v. 52, Nº3, p. 746-756, 1998.

COUTO, A. C. F. **Estudo taxonômico das ascídias do gênero *Symplegma* (Tunicata, Ascidiacea, Styelidae) Encontradas no canal de São Sebastião – SP**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 127p., 2003.

DELBY, J. E.; YOUNG, C. M. Variable effects of ascidan competitors on oysters in a Florida epifaunal community. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 167, p. 47-57, 1993.

DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; CHOURROUT, D; PHILIPPE, H. Tunicates and No Cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. **Nature**. v. 439, p 965-968, 2006.

DIAS, G. M. *Didemnum tetrahedrum* sp nov., a new *Didemnum* (**Tunicata : Ascidiacea**) species from south-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 84 Nº. 6, p. 1227-1228, 2004.

GOODBODY, I. The Physiology of ascidians. **Advances in Marine Biology**. v. 12, p. 1-149, 1974.

GOODBODY, I. Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize. **Atoll Research Bulletin**. v. 480, p. 302-326, 2000.

GOODBODY, I. **Caribbean Sea Squirts**. The Goodbody Colletion. Executive Director Howard Reid. Cd-Rom Producer: Mona Institute of Applied Science. Kingston, Jamaica. 2005.

HERNÁNDEZ-ZANUY, A.; CARBALLO, J. Distribution and abundance of ascidian assemblages in Caribbean Reef zones of the Golfo de Batabanó (Cuba). **Coral Reefs**. v. 20, Nº. 2, p.159-162, 2001.

HIROSE, E. Colonial allorecognition, hemolytic rejection, and viviparity in botryllid ascidians. **Zoological Science**, v. 20, p. 387-394, 2003.

HIROSE, E.; SHIRAE, M.; SAITO, Y. Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 botryllid ascidians (Chordata: Ascidiacea). **Zoological Science**. v. 20, No. 5, p.647-656, 2003.

JIMENEZ, P.C; FORTIER, S.C.; LOTUFO, T.M.; PESSOA, P.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Vol. 287, p. 93-101, 2003.

KAWAMURA, K.; TAKEOKA, S.; TAKAHASHI, S.; SUNANAGA, T. *In vitro* culture of mesenchymal lineage cells established from the colonial Tunicate *Botryllus primigenus*. **Zoological Science**. Vol.23, No. 3, p. 245–254, 2006.

KOTT, P. Antarctic Ascidiacea. A monographic account of the known species based on specimens collected under U.S. Government auspices 1947-1963. **Antarctic Research Series**. 13: (1-15)1-239, 1969.

KOTT, P. The Australian Ascidiacea. Part 1, Phlebobranchia and Stolidobranchia. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 23, p. 1-440, 1985.

KOTT, P. The Australian Ascidiacea. Part 2: Aplousobranchia (1). **Memoirs of the Queensland Museum** 29 (1): 1-266, 1990.

KOTT, P. The Australian Ascidiacea. Part 3: Aplousobranchia (2). **Memoirs of the Queensland Museum** 32 (2): 375-620, 1992.

KOTT, P. New Synthesis and new species in the Australian Ascidiacea. **Journal of Natural History**, 37, (13): 1611-1653, 2003.

KOTT, P. Catalogue of Tunicata in Australian Waters. **National Library of Australia. Queensland Museum**, Brisbane Australia, 301p, 2005.

LAMBERT, C. Historical introduction, overview, and reproductive biology of the Protochordates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83: 1-7 2005.

LAMBERT, G. Nonindigenous ascidians in Tropical Waters. **Pacific Science**. Vol. 56, N° 3: p. 291–298, 2002.

LAMBERT, G. Ecology and natural history of the Protochordates. **Canadian Journal of Zoology**. v. 83, P. 34- 50, 2005.

LAMBERT, G. Invasive sea squirts: A growing global problem. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 342. p.3–4, 2007.

LAUZON, R.; CASTAGNA, C. Phagocyte homing and function during cyclic blastogenesis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. In: **4th International Tunicate Meeting, Abstracts**. Saint-Jean Cap Ferrat, França 2007.

LOTUFO, T. M. C. **Ecologia das ascídias da Baía de Santos**: período reprodutivo, crescimento e aspectos seccionais. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

LOTUFO, T. M. C. **Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro**. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LOTUFO, T. M. C.; Silva, A. M. B. Ascidiacea do litoral Cearense. In: **Biota marinha da costa oeste do Ceará**, MATTHEWS- CASCON, H. & LOTUFO, T. M. C. (Eds.). Brasília, MMA Ed. CID. Série Biodiversidade Vol. 24, Cap 7, 248p, 2006.

MILLAR, R. H. Some Ascidians from Brazil. **Annals and Magazine of Natural History**. Ser.I, v. 13, p.497-514, 1958.

MILLAR, R. H. *Euherdmania vitrea*, a new species of ascidian from Brazil. **Annals and Magazine of Natural History**. 4 p.143 -147, 1961.

MILLAR, R. H. Tunicata Ascidiacea, marine invertebrates of Scandinavia, N° 1. Universitetsforlaget, **Oslo**. 123p. 1966.

MILLAR, R. H. **British Ascidians (Tunicata – Ascidiacea), Keys and Notes for the identification of the species**. The Linnean Society of London. London and New York. 1970.

MILLAR, R. H. The Biology of Ascidians. **Advances in Marine Biology**. v. 09, p 1-100, 1971.

MILLAR, R. H. Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the northern and north-eastern Brazilian shelf. **Journal of Natural History**, v. 11, p.169-223, 1977.

MONNIOT, C. Campagne de la calypso au large des côtes Atlantiques de l'Amérique du Sud (1961-1962). Ascidies Phlébobranches et Stolidobranches. **Annales del'Institut Oceanographique**, v. 47, p. 3-59. 1969/70.

MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Clé mondiale des genres d'Ascidies. **Archives de Zoologie Expérimentale e Générale**. v. 113, p. 311-367, 1972.

MONNIOT, C. Ascidies Stolidobranches des Bermudes. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris**, 3^a Série n^o 57, p.618-643, 1972.

MONNIOT, C. Ascidies littorales de Guadeloupe IV. Styelidae. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, 4^a Série v. 5, p. 423-456, 1983.

MONNIOT, C. & MONNIOT, F. Les Ascidies de Polynésie Française. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 136, p. 1-155, 1987.

MONNIOT, C. Ascidies de Nouvelle-Calédonie IV. Styelidae (suite). **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, 4^a serie v. 10, p. 163-196, 1988.

MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUE, P. **Coral Reef Ascidiarians of New Caledonia**. Collections faune tropicale n^o XXX, ORSTOM Editions, Paris, 247 p. 1991.

MONNIOT, C. Quelques Ascidies Récolteés par lê M.S. "Mrion-Dufresne" (Campagne Jasus, Reunion et Brésil). **Vie Mileu**, v. 44, p. 229-242, 1994.

MORENO, T. R. **Filogenia da Ordem Aplousobranchia (Tunicata, Ascidiacea)**. Tese de doutorado, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, p.157, 2003.

MOURE, J. S.; BJÖRNBERG, T. K. S.; LOUREIRO, T. S. Protochordata ocorrentes na entrada da Baía de Paranaguá. **Dusenía** v. 5 p. 233-242, 1954.

NIEVES, J.M. Cáncer: Milagro Bajo del Mar. **Ciencia. Blanco y Negro**, v. 37,p. 39,1995.

NISHIGKAWA, T. Ascidans of Japan Sea. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**. v. 35 p. 25-170, 1991.

OKUYAMA, M.; SAITO, Y. Studies on japanese Botryllid Ascidiarians. I. A New Species of the Genus Botryllus from the Izu Islands. **Zoological Science**. v. 18, p. 261-267, 2001.

OKUYAMA M.; SAITO, Y. Studies on japanese Botryllid Ascidiarians. II. A New Species of the Genus Botryllus from the Vicinity of Shimoda. **Zoological Science**. v.19, p. 809-815, 2002.

PAPADOPOULOU C, KANIAS G. Tunicate Species as Marine Pollution Indicators. **Marine Pollution Bulletin**. v. 8 p. 229-231, 1977.

RINKEVICH, B. Rejection patterns in botryllid ascidian immunity: the first tier of allorecognition. **Canadian Journal Zoology**. v. 83, pp.101-121, 2005.

ROCHA, R. M. **Ascídias coloniais do Canal de São Sebastião, SP**: Aspectos Ecológicos. Dissertação, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 133 p, 1988.

ROCHA, R. M. Replacement of the compound ascidian species in a southeastern brazilian fouling community. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo. Vol. 39, p. 141-153, 1991.

ROCHA, R. M. & MONNIOT, F. *Didemnum rodriguesi* sp. nov., a new didemnid tunicate common to southern Brazil and New Caledonia. **Annales del'Institute Oceanographique**. Paris. v. 69, p. 261-265, 1993.

ROCHA, R. M. & MONNIOT, F. Taxonomic and ecological notes on some *Didemnum* species (Ascidiacea, Didemnidea) for São Sebastião Channel, South-East Brazil **Revista Brasileira de Biologia**. v. 55, p. 639-649, 1995a.

ROCHA, R. M. Abundance and distribution of sessile invertebrates under intertidal boulders (São Paulo, Brazil). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, S. Paulo. Vol. 43, p. 68-80, 1995b.

ROCHA, R.M.; NASSER, C.M. Some ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from Paraná State, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 15, p. 633-642, 1998.

ROCHA, RM, LOTUFO, T.M., RODRIGUES, S.A. The Biology of *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata:Ascidiacea) in Southern Brazil: Spatial distribution and reproductive cycle. **Bulletin of Marine Science**. v. 64, p. 77-87, 1999.

ROCHA, R.M.; MORENO, T. R. Ascidians associated with *Eudistoma carolinense* Van Name, 1945 with description of a new species of *Polycarpa*. **Ophelia**. v. 1, n. 52, p. 9-16, 2000.

ROCHA, R. M.; BERLINCK, R.G. S. Ascidians in Brazil: The state of art of research in taxonomy, ecology and natural products. In: **The Biology of Ascidians**, Sawada, H.; Yokosawa, H. & Lambert, C. C. (Eds.). Springer – Verlag, Tokyo. p. 264-270, 2001.

ROCHA, R. M. *Trididemnum maragogi* sp. nov. (Ascidiacea ,Didemnidea) from Alagoas, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 19, p. 1105-1110, 2002a.

ROCHA, R. M. *Bostricobranchus digonas* Abbott (Ascidiacea, Molgulidae) in Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. A case of recent invasion? **Revista Brasileira de Zoologia**. nº. Supl. 1, v. 19, p.157-161. Curitiba. . 2002b.

ROCHA, R. M., MORENO, T. R.; METRI, R. Ascídias da Reserva Biológica Marinha de Arvoredo, SC. **Revista Brasileira de Zoologia**. Nº. 2, v. 22, p. 461-476. Curitiba. 2005.

ROCHA, R. M.; GRANTON, L. V. Ascidians from Arraial do Cabo, RJ, Brazil. **Iheringia**. Série Zoologia, nº. 1, v. 95, p. 57-64. 2005.

ROCHA, R. M.; KREME, L. P. Introduced ascidians in Paranaguá Bay, Paraná, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. Curitiba, v. 22, Nº. 4, p. 1170-1184, 2005.

RODRIGUES, S. A. Algumas ascídias do litoral sul do Brasil. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Zool.** v. 24, p. 193-216, 1962.

RODRIGUES, S. A. Ascidiacea - *In* História Natural dos organismos aquáticos do Brasil, Tunicata, p. 299-304. (Ed. P. Vanzolini) **Revista dos Tribunais**, São Paulo. 1964.

RODRIGUES, S. A. Notes on brazilian ascidians. **I. Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo. v. 19 p. 95-115, 1966.

RODRIGUES, S. A. Notes on brazilian ascidians. II. On the records of *Polyandrocarpa anguinea* (Sluiter) e *Polyandrocarpa maxima* (Sluiter). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 37, p. 721-726, 1977.

RODRIGUES, S. A. Urochordata – *In*: **Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas**. p. 35-40. Sociedade Brasileira de Zoologia, Campinas, SP. 1987.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA. R. M. Littoral compound ascidians (Tunicata) from São Sebastião, Estado de São Paulo, Brazil. **Proceedings of Biological Society of Washington**. v. 106, p. 728-739, 1993.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M.; LOTUFO, T. M. C. - **Guia Ilustrado para a Identificação das Ascídias do Litoral Paulista** - IBUSP - FAPESP - 192p. São Paulo, 1998.

SAITO, Y; MUKAY, H.; WATANABE, H. Studies of Japanese compound Styelid Ascidians I. Two new species of Botryllus from the Vicinity of Shimoda. . **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**. v. 26, p. 347-355, 1981a.

SAITO, Y; WATANABE, H. Studies on Japanese compound styelid ascidians IV. Three new species of the genus *Botrylloides* from the Vicinity of Shimoda. . **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**. v. 30, p. 227-240, 1985.

SAITO, Y; HIROSE, E.; WATANABE, H. Allorecognition in compound ascidians. **International Journal of Developmental Biology**. v. 38, p. 237-247, 1994.

SAITO, Y; SHIRAE, M; OKUYAMA, M.; COHEN. Phylogeny of botryllid ascidians. In: **The biology of ascidians**, Sawada, H.; Yokosawa, H. & Lambert, C. C. (Eds.). Springer - Verlag Tokyo. p 315-320, 2001.

SAITO, Y. & NAGASAWA, N. Studies on japanese botryllid ascidians. III. A New species of the genus *Botryllus* with a vivid colony color from the Vicinity of Shimoda. **Zoological Science**. v. 20, p. 765-771, 2003.

SAITO, Y. & OKUYAMA M. Studies on japanese botryllid ascidians. iv. a new species of the genus *Botryllus* with a unique colony shape, from the Vicinity of Shimoda. **Zoological Science**. vl. 20, p. 1153-1161, 2003.

SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. (*Editors*). **The biology of ascidians**. Springer-Verlag, Tokyo. 2001.

SHENKAR, N. & MONNIOT, F. A New species of the genus *Botryllus* (Ascidiacea) from the Red Sea. **Zootaxa**. Nº 1256, p. 11-19, 2006.

SLUITER, C. P. H. Tuniciers Recueillis em 1896 par la chazalie dans la mer dès Antilles. **Mémoires de la Société Zoologique de France**, v. 11, p 5-34, 1898.

SILVA, A. K. P. **Estudo qualitativo da sucessão ecológica, recrutamento e do rratamento “antifouling” convencional em organismos incrustantes, na região Portuária de Suape - Pernambuco, Brasil**. Tese de doutorado, Departamento de Oceanografia, UFPE, Recife, 2003.

SIMÕES, M.B. **Contribuição para o conhecimento da fauna de Ascidiacea da Ilha de Boa viagem, Niterói, Rio de Janeiro** (Sistemática e Notas Biológicas). Dissertação de mestrado, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 1981.

SUNANAGA, T. SAITO, Y. & KAWAMURA, K. Postembryonic epigenesis of *Vasa*-positive germ cells from aggregated hemoblasts in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. **Development, Growth & Differentiation**. v. 48, p. 87–100, 2006.

SWALLA, B. J. Phylogeny of the Urochordates: implications for chordate Evolution. In: **The Biology of Ascidiaceans**, Sawada, H.; Yokosawa, H. & Lambert, C. C. (Eds.). Springer-Verlag, Tokyo. p 219-224. 2001.

SWOFFORD, D. L. PAUP 4. Beta version. Software para computadores Apple Macintosh (Power PC), 2001.

TANEDA, Y. & WATANABE, H. Studies on colony specificity in the compound ascidian, *Botryllus primigenus* oka. II. In vivo bioassay for analyzing the mechanism of "nonfusion" reaction. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 6, Issue 2, p. 243-252. 1982.

TOKIOKA, T. **Ascidiaceans of Sagami Bay collected by His Majesty The Emperor of Japan**. Iwanami Shoten, Tokyo, 1953.

TOKIOKA, T. Pacific Tunicata of the United States National Museum. **United States National Museum Bulletin**, v. 251, p. 1-247. 1967.

TYRRELL, M. C. & BYERS, J. E. Do artificial substrates favor nonindigenous fouling species over native species? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342 p. 54-60, 2006.

VAN NAME, W. G. The North and South American ascidians. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. New York. v. 84. 1945.

ZENG L. & SWALLA B.J. Molecular phylogeny of the Protochordates: Chordate evolution. **Canadian Journal of Zoology** v. 83, p. 24-33. 2005.

ZENG, L.; JACOBS, M.W. & SWALLA, B. Coloniality has evolved once in Stolidobranch ascidian. **Integrative and Comparative Biology**. v. 46 N° 3 p. 255-268, 2006.

ANEXOS

Anexo 1 - Tabela de caracteres e respectivas mudanças de estados, referente ao cladograma apresentado na Figura 4.

Caracteres	I C	Passos	Mudanças
2 (Forma dos sistemas)	0.333	1	Nó 18 0 ==> 1 Nó 16
		1	Nó 19 0 ==> 1 <i>B. tabori</i>
		1	Nó 22 0 ==> 1 <i>B. humilis</i>
3 (Nº de Fileiras na cesta)	0.667	1	Nó 24 1 ==> 0 <i>S. rubra</i>
		1	Nó 15 1 ==> 0 <i>B. giganteum</i>
		1	Nó 18 1 ==> 2 Nó 17
4 (Grânulos prox. ao endóstilo.)	0.500	1	Nó 14 0 ==> 1 <i>B. nigrum</i>
		1	Nó 20 0 ==> 1 <i>B. schlosseri</i>
5 (Segunda fileira incompleta)	0.500	1	Nó 23 0 ==> 1 Nó 21
		1	Nó 14 1 ==> 0 <i>B. nigrum</i>
6 (Posição das gônadas)	1.000	1	Nó 18 0 ==> 1 Nó 16
7 (Nº de ovos de cada lado do corpo)	0.500	1	Nó 24 0 --> 1 Nó 23
		1	Nó 21 1 --> 0 Nó 20
8 (Nº de fol. test. em cada lado do corpo)	0.333	1	Nó 14 0 ==> 1 <i>B. nigrum</i>
		1	Nó 20 0 --> 1 Nó 19
		1	Nó 23 0 ==> 1 Nó 22
10 (Forma de incubação larval)	1.000	1	Nó 21 0 ==> 1 Nó 18
		1	Nó 17 1 ==> 2 <i>B. tuberatus</i>
11 (Forma do estômago)	1.000	1	Nó 16 0 ==> 1 Nó 15
12 (Nº de pregas no estômago)	0.250	1	Nó 21 0 ==> 1 Nó 18
		1	Nó 15 1 ==> 0 <i>B. giganteum</i>
		1	Nó 19 0 ==> 1 <i>B. sp. n.</i>
		1	Nó 22 0 ==> 1 <i>B. planus</i>
14 (Ceco pilórico)	0.500	1	Nó 24 0 ==> 1 Nó 23
		1	Nó 16 1 ==> 0 Nó 15
		1	Nó 20 1 ==> 2 Nó 19
		1	Nó 22 1 ==> 2 <i>B. planus</i>
15 (Nº de ligações no ceco)	1.000	1	Nó 23 0 ==> 1 Nó 21
16 (Região de ligação do ceco)	0.333	1	Nó 24 0 --> 1 Nó 23
		1	Nó 16 1 ==> 2 Nó 15
		1	Nó 16 1 --> 0 <i>B. magnicoecum</i>
		1	Nó 17 1 --> 0 <i>B. primigenus</i>
		1	Nó 20 1 ==> 2 Nó 19
		1	Nó 22 1 --> 0 <i>B. humilis</i>
17 (Extremidade do ceco)	0.200	1	Nó 24 0 --> 1 Nó 23
		1	Nó 14 1 ==> 0 <i>B. leachi</i>

Caracteres	I C	Passos	Mudanças
		1	Nó 17 1 --> 0 <i>B. primigenus</i>
		1	Nó 20 1 --> 0 Nó 19
		1	Nó 22 1 --> 0 <i>B. planus</i>
18 (Forma das glândulas pilóricas)	0.500	1	Nó 15 0 --> 1 Nó 14
		1	Nó 16 0 ==> 2 <i>B. magnicoecum</i>
		1	Nó 17 0 ==> 1 <i>B. primigenus</i>
		1	Nó 23 0 ==> 2 Nó 22
20 (Tentáculos ordem de tamanho)	0.200	1	Nó 24 1 ==> 0 <i>S. rubra</i>
		1	Nó 15 1 ==> 0 <i>B. giganteum</i>
		1	Nó 17 1 ==> 0 <i>B. tuberatus</i>
		1	Nó 20 1 ==> 0 Nó 19
		1	Nó 22 1 ==> 0 <i>B. humilis</i>
21 (Abertura atrial)	0.500	1	Nó 24 0 ==> 1 Nó 23
		1	Nó 17 1 ==> 0 <i>B. primigenus</i>
23 (Forma do ânus)	0.500	1	Nó 16 0 ==> 1 <i>B. magnicoecum</i>
		1	Nó 21 0 ==> 1 Nó 20
24 (Posição do ânus quanto a fileira)	0.500	1	Nó 24 0 ==> 1 Nó 23
		1	Nó 15 1 ==> 0 Nó 14
		1	Nó 18 1 ==> 2 Nó 17
		1	Nó 20 1 ==> 2 <i>B. schlosseri</i>
25 (Musculatura)	0.500	1	Nó 23 0 --> 1 Nó 21
		1	Nó 15 1 --> 2 Nó 14
		1	Nó 20 1 --> 0 <i>B. schlosseri</i>
		1	Nó 22 0 ==> 2 <i>B. humilis</i>

ÍNDICE TAXONÔMICO

Botrylloides giganteum Peres, 1949.....	30
Botrylloides nigrum Herdman, 1886.....	35
<i>Botryllus cf.primigenus</i> Oka, 1928.....	43
<i>Botryllus cf.tuberatus</i> (Ritter & Forsyth, 1917)	50
<i>Botryllus humilis</i> (Monniot, 1988).....	38
<i>Botryllus planus</i> (Van Name, 1902).....	40
<i>Botryllus schlosseri</i> (Pallas, 1766)	46
<i>Botryllus</i> sp.....	52
<i>Botryllus tabori</i> Rodrigues, 1962.	48