



**ISPA**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
CIÊNCIAS PSICOLÓGICAS, SOCIAIS E DA VIDA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO  
DA BIOLOGIA DAS ANÉMONAS DO  
GÉNERO *ACTINIA* LINNAEUS, 1767  
NA COSTA EUROPEIA**

EMÍLIA MARGARIDA CADEIREIRO DOS SANTOS,

N.º 20155

Orientadora de Dissertação:

PROF.<sup>a</sup> DOUTORA ANA MARTINS PEREIRA

Coordenador de Seminário de Dissertação:

PROF.º DOUTOR EMANUEL GONÇALVES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de:

MESTRE EM BIOLOGIA MARINHA E CONSERVAÇÃO

Lisboa,

2015

Dissertação realizada sob a orientação  
da **Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Martins  
Pereira,** apresentada no ISPA –  
Instituto Universitário para obtenção  
de grau de Mestre na especialidade de  
**Biologia Marinha e Conservação.**

**“Genius is 1% inspiration  
and 99% perspiration.”**

*- Thomas Edison (1847-1931),  
American inventor*

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me auxiliaram e permitiram a realização desta tese:

- À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Martins Pereira, pela oportunidade e pela predisposição na ajuda que me prestou, tendo eu tanto para aprender e à aqueles que a apoiaram, permitindo que o nosso percurso fosse um pouco mais fácil.
- Ao Prof.<sup>o</sup> Doutor Emanuel Gonçalves pelo apoio no Seminário de Dissertação, pelas perguntas que permitiram um melhor esclarecimento dos documentos apresentados e pelo auxílio que prestou no esclarecimento das minhas dúvidas.
- À minha família, em especial ao meu padrasto, à minha mãe e ao meu irmão pelo acompanhamento e apoio que me permitiu obter a energia, força e motivação para não desistir dos objetivos a que me propôs e pela confiança que depositaram no meu sucesso pessoal e profissional.
- Aos meus amigos e companheiros que me apoiaram e que garantiram a concretização de todos os desafios que surgiram durante este percurso.
- Ao Ricardo, por tudo o que me ensinou, pela calma e serenidade que me transmitiu, por ser o meu maior apoio e por ter sido a pessoa que me ajudou a ter os “pés bem assentes no chão” quando começava a dispersar e a ir além daquilo que me era possível.

Um enorme obrigado a todos vocês, pois sem vocês, esta dissertação teria sido menos satisfatória e não teria sido nada divertida!

## Resumo

A presente dissertação foca-se na biologia das anémonas-do-mar do género *Actinia* Linnaeus 1767, um grupo com ampla heterogeneidade morfológica e biogeográfica. Embora seja bastante comum, ainda existem dúvidas acerca da sua biologia, ecologia e taxonomia. A fim de contribuir para o conhecimento da biologia deste género, começou-se por utilizar uma técnica molecular para identificar as espécies deste género presentes na Península Ibérica. Adicionalmente, determinou-se a relação genética existente entre os adultos e os pólipos incubados em anémonas deste género presentes na costa Portuguesa, de modo a averiguar o tipo de reprodução utilizada por estas anémonas. Finalmente, estudou-se a presença e frequência de comportamentos agonísticos das anémonas da espécie *A. fragacea* Tugwell, 1856.

O primeiro estudo permitiu validar a presença de três espécies do género *Actinia* na Península Ibérica: *A. equina* (Linnaeus, 1758), *A. schmidtii* Monteiro, Solé-Cava & Thorpe, 1997 e *A. fragacea*. A relação entre adultos e pólipos por eles incubados sugere fortemente que o tipo de reprodução associada à viviparidade é assexuada. Para o estudo do comportamento em *A. fragacea* foram realizados 24 testes, em que anémonas geneticamente iguais ou diferentes foram colocadas em contacto, sendo descritos e quantificados os comportamentos agonísticos exibidos. Verificou-se a presença de comportamentos agonísticos em todos os ensaios, com frequências e durações muito variáveis em ambos os grupos, tendo em 79% dos casos resultado no afastamento de uma das anémonas.

**Palavras-Chave:** Genética, Comportamento agonístico e *Actinia*

## Abstract

This dissertation focuses on the biology of sea anemones from the genus *Actinia* (Linnaeus, 1767), a heterogeneous group in terms of morphology and biogeography. Although quite common organisms are included, there are still doubts about their biology, ecology and taxonomy. In order to contribute to the biological knowledge of this genus, a molecular approach was used for the identification of the species occurring in the Iberian Peninsula. Additionally, the genetic relationship between adults and incubated polyps (viviparity) in this genus was investigated for the Portuguese coast. Finally, the presence and frequency of agonistic behavior in sea anemones of the species *A. fragacea* (Tugwell, 1856) was also assessed. In the first study, the presence of three species of the genus *Actinia* in the Iberian Peninsula was validated: *A. equina* (Linnaeus, 1758), *A. schmidtii* (Monteiro, Solé-Cava & Thorpe, 1997) and *A. fragacea*. The relationship between adults and incubated polyps strongly suggests that the latter are asexually produced, being viviparity in Iberian *Actinia* an asexual reproduction mode. To study the agonistic behavior of *A. fragacea*, 24 trials were performed, wherein the behaviour of pairs of clones or genetically different individuals were studied. Agonistic behaviours were recorded in all trials, with variable durations and frequencies, for both groups. In 79% of the trials, these behaviours were followed by withdrawal.

**Key-words:** Genetics, agonistic behavior and *Actinia*

## Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>Breve Introdução</b> .....	12
<b>Referências</b> .....	12
<b>Capítulo 1 – Validação molecular da presença de diversas espécies do gênero <i>Actinia</i> Linnaeus, 1767 na Península Ibérica</b> .....	14
1.1. Introdução.....	14
1.2. Metodologia.....	15
1.3. Resultados e Discussão.....	17
1.4. Conclusão.....	18
1.5. Referências.....	19
<b>Capítulo 2 – Viviparidade em anêmonas do gênero <i>Actinia</i> Linnaeus, 1767 – origem por reprodução sexuada ou assexuada?</b> .....	21
2.1. Introdução.....	21
2.2. Metodologia.....	23
2.3. Resultados/Discussão.....	24
2.4. Conclusão.....	25
2.5. Referências.....	25
<b>Capítulo 3 – Comportamento agonístico em <i>Actinia fragacea</i> Tugwell, 1856</b> .....	27
3.1. Introdução.....	27
3.2. Metodologia.....	29

3.3. Resultados/Discussão.....	31
3.4. Conclusão.....	34
3.5. Referências.....	35
<b>Anexos.....</b>	<b>38</b>
<b>Anexo I – Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>38</b>
Referências.....	48
<b>Anexo II – Protocolo.....</b>	<b>53</b>
<b>Protocolo I – Extracção de ADN genómico.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo III – Figuras complementares aos capítulos.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo IV – Tabelas complementares aos capítulos.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo V – Informação de suporte da análise de dados.....</b>	<b>57</b>



## Índice das Figuras

<b>Anexo III</b> – Figuras complementares aos capítulos.....	54
<b>Figura 1a</b> – Rede de haplótipos da Máxima parcimónia (utilizando os dados relativos ao gene 28S).....	54
<b>Figura 1b</b> – Abundância relativa das espécies em estudo por local de amostragem.....	54
<b>Figura 3a</b> – Esquema da seleção dos indivíduos por combate.....	55

## Índice das Tabelas

<b>Capítulo 3 – Comportamento agonístico em <i>Actinia fragacea</i> Tugwell, 1856.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela I – Percentagem de testes com ocorrência dos três comportamentos agonísticos, entre clones e não-clones.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela II – Frequência absoluta dos comportamentos agonísticos no total dos comportamentos realizados e número médio dos mesmos por ensaio em clones e não-clones.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela III – Medidas de estatística descritiva obtidas para a frequências dos três agonísticos comportamentos por teste (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorhagial).....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela IV – Medidas de estatística descritiva obtidas para a duração dos três comportamentos agonísticos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorhagial) por teste.....</b>	<b>33</b>
<b>Anexo IV – Tabelas complementares aos capítulos.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 3.1 – Número de amostras realizadas por região e local de amostragem, assim como as espécies encontradas.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo V – Informação de suporte da análise de dados.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 4.1 – Teste de independência entre a ocorrência de ataque dos acrorhagial e a relação genética entre indivíduos (Teste exato de Fisher)..</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 4.2 – Medidas descritivas obtidas para a frequências dos três agonísticos comportamentos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorhagial) .....</b>	<b>57</b>

<b>Tabela 4.3</b> – Medidas descritivas obtidas para a frequências dos três agonísticos comportamentos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorhagial). .....	60
<b>Tabela 4.4</b> – Análise estatística do tempo de latência da ocorrência de picada do acrorhagial.....	62

## Breve Introdução

As anêmonas-do-mar são invertebrados marinhos bênticos, comuns nas costas rochosas, os quais podem ainda ser encontrados em habitats de recifes de coral e em substratos artificiais (Perrin, Thorpe, & Solé-Cava, 1999; Rodríguez et al., 2014). Encontram-se a diferentes profundidades e latitudes (Rodríguez et al., 2014). Em termos de mobilidade são animais semi-sésseis que necessitam da deslocação da água ou da aproximação das presas para se alimentarem (Shick, 1991).

Ecologicamente, as anêmonas-do-mar encontram-se em habitats das zonas de intertidal e subtidal rochoso (Davenport, Moloney, & Kelly, 2011). Apresentam várias estratégias que garantem a satisfação das suas necessidades nutricionais (Davenport et al., 2011; Kruger & Griffiths, 1996), estratégias essas que as classificam como seres: ubiqüitários, oportunistas (maioritariamente filtradores) e predadores (carnívoros) (Perrin et al., 1999).

Em particular, os indivíduos do género *Actinia* Linnaeus, 1767 são organismos que possuem uma distribuição geográfica alargada (Chomsky, Douek, Chadwick, Dubinsky, & Rinkevich, 2009; Perrin et al., 1999) e encontram-se distribuídos desde o Norte da Rússia e do Mar Báltico até às águas tropicais do Oeste Africano, incluindo os arquipélagos da Madeira, Açores e Canárias, na África do Sul, no Mar Mediterrâneo, Mar Negro, Mar Vermelho, Austrália e a oeste do Atlântico (Ayre, Read, & Wishart, 1991; Cha, Fautin, Buddemeier, & Sandhei, 2004; Manuel, 1981; Vianna, Schama, & Russo, 2003).

## Referências

- Ayre, D. J., Read, J., & Wishart, J. (1991). Genetic subdivision within the eastern Australian population of the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Marine Biology*, 109(3), 379–390. doi:10.1007/BF01313503
- Cha, H. R., Fautin, D. G., Buddemeier, R. W., & Sandhei, P. (2004). Distribution of sea anemones (Cnidaria, Actiniaria) in Korea analyzed by environmental clustering. In *Coelenterate Biology 2003* (pp. 497–502). Springer. doi:10.1007/978-1-4020-2762-8\_56

- Chomsky, O., Douek, J., Chadwick, N. E., Dubinsky, Z., & Rinkevich, B. (2009). Biological and population-genetic aspects of the sea anemone *Actinia equina* (Cnidaria: Anthozoa) along the Mediterranean coast of Israel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 375(1-2), 16–20. doi:10.1016/j.jembe.2009.04.017
- Davenport, J., Moloney, T. V., & Kelly, J. (2011). Common sea anemones *Actinia equina* are predominantly sessile intertidal scavengers. *Marine Ecology Progress Series*, 430, 147–155. doi:10.3354/meps08861
- Kruger, L. M., & Griffiths, C. L. (1996). Sources of nutrition in intertidal sea anemones from the south-western Cape, South Africa. *Zoological Society of Southern Africa*, 31(3), 110–119. doi:0967-0653
- Manuel, R. L. (1981). British anthozoa. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300330953>
- Perrin, M. C., Thorpe, J. P., & Solé-Cava, A. M. (1999). Population structuring, gene dispersal and reproduction in the *Actinia equina* species group. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 37, 129–152.
- Rodríguez, E., Barbeitos, M. S., Brugler, M. R., Crowley, L. M., Grajales, A., Gusmão, L., Daly, M. (2014). Hidden among sea anemones: The first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. *PloS One*, 9(5), e96998. doi:10.1371/journal.pone. 0096998
- Shick, J. M. (1991). *A Functional Biology of Sea Anemones*. Chapman & Hall. London.
- Vianna, P., Schama, R., & Russo, C. (2003). Genetic divergence and isolation by distance in the West Atlantic sea anemone *Actinia bermudensis* (McMurrich, 1889). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297(1), 19–30. doi:10.1016/S0022-0981(03)00340-X

## Capítulo 1 – Validação molecular da presença de diversas espécies do género *Actinia* Linnaeus, 1767 na Península Ibérica

### **1.1. Introdução**

A identificação das espécies de anémonas-do-mar é considerada difícil (Perrin, Thorpe, & Solé-Cava, 1999) pelo fato de os caracteres morfológicos associados à definição das espécies (por ex. número e forma dos filamentos dos cnidócitos) serem de difícil observação, implicando na maioria das vezes a morte dos indivíduos em estudo (Perrin et al., 1999). Nesse sentido, a utilização de uma abordagem mista na identificação das espécies de anémonas, usando tanto a morfologia como a genética é de grande interesse (Ocaña, Brito, & González, 2005). Assim, a caracterização da diversidade genética dentro de cada espécie e entre populações geograficamente separadas pode fornecer informações úteis para uma melhor identificação das espécies (Stampar, Maronna, Vermeij, Silveira, & Morandini, 2012). Esta abordagem pode revelar, também, a existência de espécies crípticas de anémonas e permitir o estudo dos processos e dos cenários de especiações relevantes neste grupo (Stampar et al., 2012). Pode ainda permitir a detecção de fenómenos de hibridação (Douek, Barki, Gateño, & Rinkevich, 2002; Stampar et al., 2012).

Historicamente alguns dos morfótipos pertencentes ao género *Actinia* foram sendo considerados, por vários autores, espécies diferentes (por ex. Carter & Thorpe, 1981; Haylor, G.S.; Thorpe, J. P.; Carter, 1984; Monteiro, Solé-Cava, & Thorpe, 1997; Schama, Solé-Cava, & Thorpe, 2005), pois os indivíduos apresentam a coluna de cores distintas, algumas apresentam manchas, distribuídas uniformemente, com pintas agrupadas em linhas verticais ou com pintas aleatórias ao longo do seu corpo.

Alguns estudos (por ex. Solé-Cava, Thorpe, & Kaye, 1985; Solé-Cava & Thorpe, 1986a, 1986b) demonstraram um alto polimorfismo genético em indivíduos do género *Actinia* no Reino Unido o que aumenta a confusão existente na taxonomia e justifica divergências de opinião existente entre os autores (Perrin et al., 1999). Estes estudos demonstram várias limitações, as quais destacam a importância de se recorrer a outras técnicas genéticas (por ex. técnica de amplificação de fragmentos polimórficos – AFLP;

sequenciação de genes selecionados) (Douek et al., 2002; Perrin et al., 1999), uma vez que estas permitem uma melhor caracterização das populações e o conhecimento das relações filogenéticas entre espécies (Douek et al., 2002).

Em Portugal, Pereira et al. (2014) mostraram, utilizando dados moleculares, que dois grupos geneticamente distintos deste género estavam presentes, encontrado-se a uma distância genética indicativa de pertencerem a espécies diferentes (Pereira, Brito, Sanches, Sousa-Santos, & Robalo, 2014). No entanto, a identidade destes grupos continua por aferir (Pereira et al. 2014).

Assim, nesta secção o principal objetivo é identificar as espécies do género *Actinia* presentes na Península Ibérica. Para isso, pretende-se identificar os dois grupos de haplótipos identificados por Pereira et al. (2014), utilizando novas amostras recolhidas em Portugal e Espanha, utilizando como referência sequências do mesmo marcador obtidas a partir de amostras de *Actinia schmidtii* Monteiro, Sole-Cava & Thorpe, 1997 recolhidas na Grécia e de *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) e *Actinia fragacea* Tugwell, 1856 recolhidas na Irlanda.

## 1.2. Metodologia

### 1.2.1. Amostragem

A amostragem foi realizada, entre 2009 e 2015, e abrangeu a recolha total de 186 anémonas (**Tabela 1**), respectivamente 141 indivíduos da espécie *Actinia* sp. e *A. fragacea* (Portugal e Espanha), 21 indivíduos da espécie *A. equina* e 1 *A. fragacea* (Irlanda) e 23 indivíduos da espécie *A. schmidtii* (Grécia).

A amostragem implicou a recolha de uma pequena porção de tecido ( $\approx 1\text{mm}$ ) do disco pedal de cada anémona, tendo sido realizada de maneira a minimizar os danos prejudiciais para os animais. Cada pedaço de tecido foi colocado num tubo *ependorf* de 1,5 mL com álcool (96%). Os tubos foram armazenados no Laboratório de Genética do ISPA – IU. É de salientar que apenas foi recolhido um indivíduo por cada poça, de forma a reduzir a probabilidade de recolher indivíduos com a mesma informação genética (clones).

### 1.2.2. Análise do ADN

#### 1.2.2.1. Procedimento laboratorial

A porção de amostra de cada indivíduo recolhida permitiu a extração de ADN genómico pelo *kit* *REDExtract-N-Amp* (Sigma-Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), **Protocolo I**), tendo-se seguido as instruções do fabricante. De seguida, foram amplificados os genes que codificam as subunidades ribossómicas 16S (mitocondrial - 434 pb) e 28S (nuclear - 1012 pb), utilizando-se os primers ANEM16A (5' – CACTGACCGTGATAATGTAGCGT – 3') e ANEM16SB (5' – CCCCATGGTAGCTTTTATTCG – 3') para o primeiro gene (Geller & Walton, 2001) e os primers LSU D1,D2 fw1 (5' – AGCGGAGGAAAAGAACTA – 3') e LSU D1,D2 rev1 (5' – TACTAGAAGGTTTCGATTAGTC – 3') para o segundo (Sonnenberg, Nolte, & Tautz, 2007). Salienta-se que o PCR para o gene 16S seguiu o seguinte procedimento: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 46°C durante 45 segundos e 72°C durante 1 minuto, seguidos de 10 minutos a 72°C e o PCR do gene 28S ocorreram nas seguintes condições: um ciclo de 94°C durante 4 minutos e mais 45 ciclos distribuídos em 3 fases: 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 52.2°C e 90 segundos a 72°C. Para a extensão final, ocorreu um ciclo de 10 minutos a 72°C.

#### 1.2.2.2. Sequenciação/Edição

As reações de sequenciação foram efetuadas pela empresa StabVida no ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) usando-se o kit de sequenciação Big Dye terminator DNA (<http://www.stabvida.com>). Para a edição das sequências utilizou-se o programa CodonCodeAligner v5.0.2 (CodonCode Corporation, EUA) e alinharam-se as sequências usando-se o programa Clustal X (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997). As sequências de indivíduos heterozigotos foram analisadas manualmente (Sousa-Santos et al., 2005). As relações entre os haplótipos foram analisadas com uma rede parcimónia estimada pelo software TCS versão 1.18 (Clement et al. 2000). Foi realizada uma análise de variância



molecular (AMOVA) calculada utilizando o software ARLEQUIN v. 3.5.1.3 (Excoffier & Schneider, 2005).

### 1.3. Resultados e Discussão

Ao analisar-se os 186 indivíduos obteve-se uma sequência de 1012 pb do gene nuclear que codifica a subunidade 28S do ribossoma, permitindo verificar a existência de 20 sequências diferentes, sendo que 7 das mesmas tinham sido previamente encontradas por Pereira et al. (2014). De seguida, as sequências do presente estudo foram combinadas com as apresentadas pelo estudo citado anteriormente. Os resultados foram semelhantes aos apresentados nesse estudo, i.e., após a construção da rede de parcimónia (**Figura 1a – Anexo III**) surgiram os mesmos dois grupos. Ao analisar-se a rede verificou-se que estes dois grupos correspondem a duas espécies: *Actinia equina* e *A. schmidtii*. Assim, obteve-se um primeiro grupo (grupo 1), em cujo haplótipo central estão representados os indivíduos recolhidos na Irlanda (da espécie *A. equina*), do qual derivam vários outros haplótipos. Neste grupo, os haplótipos encontram-se a uma distância máxima de 6 mutações. Por outro lado, no grupo 2 estão presentes todos os indivíduos da espécie *A. schmidtii*, representada por 6 haplótipos, derivados a uma mutação do haplótipo ancestral deste grupo. A espécie *A. fragacea*, embora se encontre presente em ambos os grupos, surge em maior número no grupo 1 (aproximadamente 95% das amostras desta espécie pertencem a este grupo).

Além disso, as espécies *A. equina* e *A. fragacea* partilham vários haplótipos (5 das 13 sequências atribuídas a *A. fragacea* são compartilhadas por *A. equina*). Não é possível distinguir estas duas espécies utilizando uma rede de parcimónia ou uma árvore filogenética dado serem geneticamente muito semelhantes.

No entanto, a utilização de uma análise de variância – AMOVA permitiu verificar que as três espécies (*A. equina*, *A. fragacea* e *A. schmidtii*) possuem diferenças significativas, sendo 92% de variação genética encontrada atribuída às diferenças entre as espécies ( $F_{ST} = 8,60$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Os índices de  $F_{ST}$  referentes aos pares obtidos para as mesmas espécies são também significativos.

Ao analisar-se o gene 16S mitocondrial (fragmento com 434 pb), obteve-se também o mesmo padrão – observam-se dois haplótipos a uma mutação de distância. No entanto, a análise destes resultados combinados com os obtidos para o gene 28S, mostra um padrão diferente do encontrado por Pereira et al. (2014), em que os dados dos dois genes eram perfeitamente concordantes (todos os indivíduos de um grupo de haplótipos obtidos com o gene 28S tinham o mesmo haplótipo com o gene 16S). Assim, enquanto todos os indivíduos pertencentes ao grupo 1 (identificado como sendo o que contém *A. equina* e *A. fragacea*) apresentam o mesmo haplótipo usando o gene mitocondrial 16S, o mesmo não se verifica no grupo identificado como *A. schmidtii*. Neste, os indivíduos recolhidos na Grécia, apresentam um haplótipo representativo do gene 16S igual àquele apresentado pela espécie *A. equina*. No entanto, as amostras de *A. schmidtii* recolhidas fora da Grécia apresentam em 70% dos casos uma sequência diferente da encontrada em *A. equina*.

Estes resultados sugeriram ainda que *A. schmidtii* e *A. equina* apresentam diferentes abundâncias em águas ibéricas, principalmente no sul de Portugal e de Espanha, sugerindo que *A. equina* é mais rara nesta região, ao contrário da *A. schmidtii* que demonstram uma maior abundância desde o Mediterrâneo até, pelo menos, à Coruña, no noroeste da Espanha (**Figura 1b – Anexo III**).

#### 1.4.Conclusão

O estudo permitiu concluir que existem evidências genéticas que reforçam a presença de *A. fragacea*, *A. equina* e *A. schmidtii* na Península Ibérica, i. e., estas três espécies estão presentes nos mesmos locais, embora apresentem diferentes abundâncias. Além disso, verificou-se que quer *A. equina* quer *A. schmidtii* apresentam morfótipos de cores distintas na área de estudo, sendo a abordagem genética a melhor forma não-letal de identificar indivíduos destas espécies.

Por outro lado, os resultados indicam que tanto a espécie *A. equina* como *A. fragacea* são espécies bastante próximas e que divergiram recentemente como foi sugerido em estudos anteriores (Solé-Cava et al., 1994).

## 1.5.Referências

- Carter, M. A., & Thorpe, J. P. (1981). Reproductive, genetic and ecological evidence that *Actinia equina* var. *mesembryanthemum* and var. *fragacea* are not conspecific. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 61(01), 79–93. doi:<http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400045926>
- Douek, J., Barki, Y., Gateño, D., & Rinkevich, B. (2002). Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. Zoological Journal of the Linnean Society, 136, 315–320.
- Excoffier L.G.L., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 1: 47–50.
- Haylor, G.S.; Thorpe, J. P.; Carter, M. (1984). Genetic and ecological differentiation between sympatric colour morphs of the common intertidal sea anemone. Marine Ecology - Progress Series, 16(1971), 281–289. Retrieved from [nist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=9609844](http://nist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=9609844)
- Monteiro, F. A., Solé-Cava, a. M., & Thorpe, J. P. (1997). Extensive genetic divergence between populations of the common intertidal sea anemone *Actinia equina* from Britain, the Mediterranean and the Cape Verde Islands. Marine Biology, 129(3), 425–433. doi:10.1007/s002270050183
- Ocaña, O., Brito, A., & González, G. (2005). The genus *Actinia* in the Macaronesian archipelagos: a general perspective of the genus focussed on the North-oriental Atlantic and the Mediterranean species (Actiniaria: Actiniidae). Vieraea, 33(0210-945X), 477–494. Retrieved from [http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes\\_Vier33-034.pdf](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes_Vier33-034.pdf)
- Pereira, A. M., Brito, C., Sanches, J., Sousa-Santos, C., & Robalo, J. I. (2014). Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. Zootaxa, 3893(4), 595–600. doi:10.1080/10425170500356065

- Perrin, M. C., Thorpe, J. P., & Solé-Cava, A. M. (1999). Population structuring, gene dispersal and reproduction in the *Actinia equina* species group. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 37, 129–152.
- Schama, R., Solé-Cava, A. M., & Thorpe, J. P. (2005). Genetic divergence between east and west Atlantic populations of *Actinia spp.* sea anemones (Cnidaria: Actiniidae). *Marine Biology*, 146(3), 435–443. doi:10.1007/s00227-004-1462-z
- Solé-Cava, A. M., & Thorpe, J. P. (1986a). Genetic differentiation between morphotypes of the marine sponge *Suberites ficus* (Demospongiae: Hadromerida). *Mar. Biol.*, 93, 247–254.
- Solé-Cava, A. M., & Thorpe, J. P. (1986b). High levels of genetic variation in marine sponges. In K. (ed. Hartman, W.D. & Ruetzler (Ed.), *Proceedings of the Third International Conference on the Biology of Sponges* (Smithsonia.). Whashington.
- Solé-Cava, A. M., Thorpe, J. P., & Kaye, J. G. (1985). Reproductive isolation with little genetic divergence between *Urticina* (= *Tealia*) *felina* and *U. eques* (Anthozoa: Actiniaria). *Marine Biology*, 85(3), 279–284. doi:10.1007/BF00393248
- Stampar, S. N., Maronna, M. M., Vermeij, M. J. A., Silveira, F. L. ., & Morandini, A. C. (2012). Evolutionary Diversification of Banded Tube-Dwelling Anemones (Cnidaria). *PloS One*, 7(7), e41091. doi::10.1371/journal.pone.0041091

## Capítulo 2 – Viviparidade em anêmonas do género *Actinia* Linnaeus, 1767 – origem por reprodução sexuada ou assexuada?

### 2.1. Introdução

As anêmonas-do-mar apresentam, em múltiplas espécies, reprodução sexuada e assexuada (Shick, 1991). No género *Actinia* a reprodução pode ocorrer por autofertilização (Gashout & Ormond, 1979), fissão longitudinal ou transversal ou ainda por laceração do disco pedal (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin, Thorpe, & Solé-Cava, 1999). Nestes tipos de reprodução os organismos são iguais ao “organismo-mãe” – clones (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin et al., 1999). No que se refere à reprodução sexuada, os indivíduos podem ser dióicos ou monóicos, encontrando-se as suas estruturas sexuais (gónadas) localizadas nas margens dos septos (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin et al., 1999). A fertilização pode ser interna ou externa (Bocharova & Kozevich, 2011). Em ambos os processos o zigoto desenvolve-se até formar uma larva ciliada, a qual se desenvolve num pólipó (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin et al., 1999).

É ainda frequente que os adultos apresentem pólipos que estão a ser incubados internamente, i.e., incubado dentro das suas cavidades gástricas (por ex. Carter & Thorp, 1979; Gashout & Ormond, 1979). Na espécie *Actinia equina* este processo ocorre em várias épocas do ano, e em ambos os sexos, ou mesmo em indivíduos imaturos (Bocharova & Kozevich, 2011). No entanto, os indivíduos desta espécie são facilmente confundidos com os indivíduos da espécie *A. schmidtii*, a qual ocorre na maior parte do Mediterrâneo e no norte de Portugal (Monteiro, Solé-Cava, & Thorpe, 1997).

Estudos anteriores mostraram que na maior parte dos casos, os pólipos incubados por viviparidade são da mesma cor que os progenitores que os incubam (Perrin, et al. 1999).

Existem várias explicações que visam identificar as possíveis origens dos pólipos incubados das quais se destacam: (1) Cada indivíduo de um dado morfótipo dá origem a pólipos do mesmo morfótipo; (2) Cada larva ciliada apenas retorna, a partir do plâncton, para se desenvolver na cavidade gástrica dos adultos da sua própria cor; (3) A cor do juvenil não é determinada pela anémone na qual a larva retorna para se desenvolver, i.e., a larva não

necessita de retornar a um adulto da sua cor; (4) A determinação da cor de um juvenil poderá ser resultante do processo de reprodução que lhe dá origem (Cain, 1974) podendo esta ser assexuada ou sexuada (Perrin et al., 1999). Destas hipóteses, aquelas que parecem ser mais plausíveis e aceites por diferentes autores são as três últimas (Perrin et al., 1999).

Segundo Douek et al. (2002) apurou-se que na espécie *A. equina* existia 100% de reprodução sexuada nas populações em estudo (provenientes do mar Mediterrâneo), pois todos os indivíduos eram geneticamente diferentes (Douek, Barki, Gateño, & Rinkevich, 2002). Além disso, a técnica molecular utilizada (AFLP) indica a possibilidade de existir dispersão larvar nesta espécie dada a sua alta divergência genética encontrada a curtas distâncias geográficas (Douek et al., 2002). Segundo Pereira et al. (2014) os resultados obtidos por Douek et al. (2002) sugerem que deverá existir reprodução sexuada nas populações da costa portuguesa, dada a diversidade existente (Pereira, Brito, Sanches, Sousa-Santos, & Robalo, 2014). Chomsky et al. (2009), por sua vez, estudaram três populações da costa israelita (Yafo, Mikhmoret e Akhziv) e verificaram que todos os indivíduos pertenciam à mesma espécie *A. equina* e que mesmo a pequenas distâncias (120 km) os valores da identidade genética indicavam a existência de cruzamentos entre populações e consequentemente a existência de reprodução sexuada (Chomsky, Douek, Chadwick, Dubinsky, & Rinkevich, 2009). Além disso, neste trabalho os autores indicavam que todos os indivíduos apresentavam padrões genéticos únicos e apoiavam de igual forma a existência de reprodução sexuada.

A espécie *Anlactinia stella* (Verrill, 1864) apresenta, à semelhança de *Actinia equina*, uma alta frequência de indivíduos adultos que incubam internamente pólipos. Para estudar a origem destes pólipos, Bocharova e Mugue utilizaram a sequenciação de genes do ADN nuclear (Bocharova & Mugue, 2012). O estudo apenas aplicado nesta espécie permitiu verificar que existiam indivíduos homozigóticos e heterozigóticos, além de que, a maioria dos adultos estudados continha pólipos de pelo menos um genótipo diferente e um igual ao seu, podendo ainda existir entre dois a três genótipos diferentes do seu nos pólipos que incubavam (Bocharova & Mugue, 2012). Estes resultados confirmam que existem trocas aleatórias de embriões entre

adultos, sendo estas independentes do grau da sua relação e da distribuição geográfica, o que significa que num determinado estágio de desenvolvimento o embrião é capaz de deixar o progenitor, ter um estágio de vida livre no plâncton e retornar a um indivíduo da mesma espécie aleatoriamente para continuar o seu desenvolvimento (Bocharova & Muge, 2012). Além disso, um terço do total dos adultos da população em estudo indicou que os juvenis eram originários de outros indivíduos e que não pertenciam aos adultos que os incubavam (Bocharova, 2015). Um estudo de Orr et al. (1982), sobre a origem dos pólipos incubados internamente em *A. equina* no Reino Unido sugeriu que estes eram gerados por reprodução assexuada, sendo indistinguíveis do seu progenitor. No entanto, neste trabalho a metodologia adoptada baseou-se na análise de aloenzimas, a qual pode apresentar alguns limitações, tais como o fato da técnica não permitir determinar as diferenças individuais nas populações e os níveis de divergência quer populacional quer entre espécies (Avice, 1974), i.e., estas ferramentas bioquímicas podem não revelar informações detalhadas (Perrin et al., 1999).

O principal objetivo desta secção foi a determinação da relação genética existente entre os adultos e os pólipos incubados pelos indivíduos do género *Actinia*, presente em Portugal, utilizando uma metodologia derivada da utilizada por Bocharova e Muges (2012).

## **2.2. Metodologia**

### **2.2.1. Amostragem**

A amostragem foi realizada entre 2014 e 2015, na praia da Assenta (39°03'39.7"N e 9°24'58.1"W) e na praia da Bafureira (38° 41' 29.800" N e 9° 21' 57.369" W) onde foram recolhidas 21 anémonas do género *Actinia* Linnaeus, 1767. A amostragem consistiu na recolha de uma pequena porção de tecido ( $\approx 1\text{mm}$ ) do disco pedal de indivíduos adultos e dos pólipos incubados internamente por estes, os quais foram expulsos pela cavidade oral durante o processo de recolha. Tanto o tecido dos adultos como os pólipos por eles expulsos foram colocados em *ependorf* de 1,5 ml com álcool (96%) devidamente identificados. Todas as amostras foram depois colocadas

no depósito de amostragem pertencente ao Laboratório de Genética do ISPA-IU.

### 2.2.2. Análise do ADN

Em cada porção de amostra recolhida, de cada indivíduo, foi executada uma extração de ADN pelo *kit* REDE*extract-N-Amp* (Sigma-Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), **Protocolo I**) segundo as instruções do fabricante. Foi amplificado o gene que codifica a subunidade ribossômica 28S (nuclear), utilizando os *primers* LSUD1,D2fw1 (5'-AGCGGAGGAAAAGAACTA-3') e LSUD1, D2rev1 (5'-TACTAGAAGGTTCGATTAGTC-3') (Sonnenberg, *et al.*, 2007). Salienta-se que o PCR ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 94°C durante 4 minutos e mais 45 ciclos distribuídos em 3 fases: 20 segundos a 94°C; 20 segundos a 52.2°C; 90 segundos 72°C, seguidos de 10 minutos a 72°C. A sequenciação foi elaborada pela empresa StabVida no 3700 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems) usando-se o *kit* de sequenciação Big Dye terminator DNA (<http://www.stabvida.com>). Na edição das sequências utilizou-se o programa CodonCodeAligner v5.0.2 (CodonCode Corporation, EUA).

### 2.3. Resultados/Discussão

Os resultados permitiram verificar que das 21 anémonas-mães recolhidas apenas uma era heterozigótica e pertencia à espécie *Actinia equina*. De seguida, estudaram-se as 12 anémonas-filhas, que estavam presentes no interior da sua cavidade gástrica utilizando o mesmo protocolo, e verificou-se que estas possuíam sequências iguais à anémona-mãe. Este resultado sugere que estes pólipos terão sido muito provavelmente originados de forma assexuada. Esta conclusão é suportada pelo fato de o genótipo do indivíduo adulto não ter sido encontrado em nenhum outro, o que torna altamente improvável que os pólipos incubados, todos com o mesmo genótipo igual ao do progenitor, tenham sido gerados por outro tipo de reprodução.



## 2.4. Conclusão

Concluiu-se que os resultados obtidos nesta secção são diferentes dos obtidos por Bocharova & Mugue, 2012 para a espécie *Aulactinia stella* (Verrill, 1864), que verificou que nessa espécie a viviparidade está associada a reprodução sexuada.

Os resultados deste trabalho são concordantes com os obtidos com Orr et al. (1982), que usou aloenzimas para estudar a mesma problemática. Em ambos os trabalhos se verifica que a origem dos pólipos incubados internamente é assexuada.

No futuro, este trabalho deveria ser continuado na costa portuguesa, de forma a amplificar a amostragem, permitindo melhorar o suporte das conclusões deste estudo.

## 2.5. Referências

- Avise, J. (1974). Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23(4), 465–481. doi: 10.1093/sysbio/23.4.465
- Bocharova, E. S. (2015). Reproductive biology and genetic diversity of the Sea Anemone *Aulactinia stella* (Verrill, 1864). *Hydrobiologia*, 1–12. doi:10.1007/s10750-015-2250-0
- Bocharova, E. S., & Kozevich, I. A. (2011). Modes of reproduction in sea anemones (Cnidaria, Anthozoa). *Biology Bulletin*, 38(9), 849–860. doi:10.1134/S1062359011090020
- Bocharova, E. S., & Mugue, N. S. (2012). Sea anemones *Aulactinia stella* (Verrill, 1864)(Hexacorallia, Actiniidae) can brood offspring from other individuals of the same species. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 444, pp. 173–175). doi:10.1134/S0012496612030040
- Cain, A. J. (1974). Breeding system of a sessile animal. *Nature*, 289 – 290. doi:10.1038/247289a0
- Carter, M. A., & Thorp, C. H. (1979). The reproduction of *Actinia equina* L. var. *mesembryanthemum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(04), 989–1001. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400036985

- Chomsky, O., Douek, J., Chadwick, N. E., Dubinsky, Z., & Rinkevich, B. (2009). Biological and population-genetic aspects of the sea anemone *Actinia equina* (Cnidaria: Anthozoa) along the Mediterranean coast of Israel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 375(1-2), 16–20. doi:10.1016/j.jembe.2009.04.017
- Douek, J., Barki, Y., Gateño, D., & Rinkevich, B. (2002). Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 136, 315–320.
- Gashout, S. E., & Ormond, R. F. G. (1979). Evidence for parthenogenetic reproduction in the sea anemone *Actinia equina* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(04), 975–987. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400036973
- Monteiro, F. A., Solé-Cava, a. M., & Thorpe, J. P. (1997). Extensive genetic divergence between populations of the common intertidal sea anemone *Actinia equina* from Britain, the Mediterranean and the Cape Verde Islands. *Marine Biology*, 129(3), 425–433. doi:10.1007/s002270050183
- Pereira, A. M., Brito, C., Sanches, J., Sousa-Santos, C., & Robalo, J. I. (2014). Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae) occurring in the Portuguese coast. *Zootaxa*, 3893(4), 595–600. doi:10.1080/10425170500356065
- Perrin, M. C., Thorpe, J. P., & Solé-Cava, A. M. (1999). Population structuring, gene dispersal and reproduction in the *Actinia equina* species group. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 37, 129–152.
- Smith, N., & Lenhoff, H. M. (1976). Regulation of Feequency of Pedal Laceration in a Sea Anemone. *Microscopical Science*, (2-64), 425–572. doi:10.1007/978-1-4757-9724-4\_13
- Shick, J. M. (1991). *A Functional Biology of Sea Anemones*. Chapman & Hall. London.

### **3.1. Introdução**

Nas anêmonas-do-mar estão presentes estruturas especializadas com funções de agressão (nematocistos), as quais parecem ter evoluído não só para a defesa dos indivíduos em geral, mas também devido às frequentes interações intraespecíficas (Shick, 1991). Os nematocistos são estruturas formadas por células urticantes, as quais se encontram envolvidas por uma cápsula (Cortazares, Campos, & Moreno, 2011). Geralmente, o nematocisto pode, através de estímulo químico, infligir lesões nos tecidos superficiais das suas vítimas, por libertação de pequenas doses de veneno ou toxinas (Cortazares et al., 2011). Além disso, estes encontram-se mais concentrados em estruturas denominadas por acrorhagi, os quais se localizam um pouco abaixo da coroa de tentáculos no topo da cavidade gástrica (Barnes, Ruppert, & Litvaitis, 1968). Os acrorhagi em conjunto com os tentáculos são as estruturas mais utilizadas na agressão neste grupo (Williams, 1991).

O comportamento agressivo, nas anêmonas-do-mar, pode ser do tipo intraespecífico resultando numa interação direta entre dois organismos geralmente devido a uma competição pela posse de um recurso indivisível que é muitas vezes resolvido por um comportamento agonístico não prejudicial (Foster & Briffa, 2014). Porém podem ocorrer situações onde existe um aumento quer no nível de agressividade quer nos danos causados ao indivíduo que se encontrar em desvantagem (Foster & Briffa, 2014). Salienta-se que nestes casos nem sempre os níveis de intensidade dependem do recurso, pois em certos casos podem também depender do grau de parentesco (Foster & Briffa, 2014). No género *Actinia* Linnaeus, 1767, estes comportamentos estão amplamente documentados (por ex. Ager, 2015; Bigger, 1976, 1980; Brace & Pavey, 1978; Brace, 1981; Francis, 1988; Sebens, 1984; Turner, Lynch, Paterson, León-Cortés, & Thorpe, 2003; Williams, 1991). Numa sequência típica de comportamento, segundo Turner et al. (2003), após o contacto inicial entre os tentáculos de duas anêmonas, podem ocorrer expansão e contração da coluna, insuflação dos acrorhagi, sobre-elevação dos acrorhagi com contacto com a coluna do adversário. Estes

contactos levam normalmente a que o tecido do adversário sofra necrose (Turner et al., 2003; Williams, 1991). Pensa-se que estes comportamentos agonísticos em que se observa a existência de um “vencedor” e de um “perdedor” (que acaba por se afastar lentamente e criar uma distância considerável) promovem uma distribuição espacial característica em *Actinia equina* (Linnaeus, 1758), possível de ser observada em meio natural (Briffa & Greenaway, 2011; Francis, 1988). Alguns estudos têm-se debruçado sobre a relação entre a proximidade genética e os tipos de intensidade agressiva existente neste grupo de invertebrados. Segundo os resultados de Foster e Briffa (2014) aproximadamente 73% dos ensaios de comportamento em *A. equina* são resolvidos com um dos indivíduos a picar o outro, sendo que a probabilidade deste acontecimento se dar aumenta com o grau de parentesco, o qual sugere que existe uma relação positiva entre parentesco e agressão, ao contrário do que se esperava em estudos anteriores os quais deduziam que a agressão era baseada no valor do recurso (Foster & Briffa, 2014). Além disso, este acontecimento revela que existe reconhecimento quer do nível de parentesco próximo ou afastado revelando-se importante no processo de agressão para a aquisição de recursos (Foster & Briffa, 2014).

Por outro lado, os indivíduos da espécie *Actinia fragacea* Tugwell, 1856 manifestavam agressividade menos intensa, ao contrário dos altos valores de agressividade apresentados para a espécie *A. equina* (Turner et al., 2003). As respostas comportamentais obtidas revelaram que a utilização de acrorhagi apenas ocorreu entre indivíduos da espécie *A. equina* como resposta de reconhecimento do outro organismo como seu igual ou não. Por outro lado, a insuflação do disco pedal com “fuga” ocorreu em *A. equina* mas também em *A. fragacea*, sendo que nesta última espécie a utilização de acrorhagi estava ausente (Turner et al., 2003). No entanto, estas conclusões relativas à espécie *A. fragacea* dizem respeito a estudos de agressividade interespecífica, nunca tendo sido estudada a agressividade intraespecífica nesta espécie.

Desta forma, o principal objetivo desta secção é estudar a relação da proximidade genética com os comportamentos agressivos em anémonas da espécie *A. fragacea* recolhidas na costa portuguesa.

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Amostragem**

A amostragem foi realizada entre 2014 e 2015, a qual consistiu em recolher anémonas na praia de São Pedro do Estoril (38° 41' 30.446" N e 9° 21' 56.809" W) da espécie *Actinia fragacea*. Para cada período de teste, recolheram-se quatro indivíduos, de poças distintas de forma a reduzir a probabilidade de recolher indivíduos com a mesma informação genética (clones).

### **3.2.2. Transporte dos organismos**

O transporte dos organismos vivos levou em média 2 horas desde o local de amostragem até chegarem ao laboratório de processamento (laboratório de biologia do ISPA-IU). Este foi realizado numa caixa de plástico (dimensão: 6 cm de altura por 19 cm de comprimento), na qual foi colocada areia (3 cm de altura da caixa) e 4 copos de plástico (dimensão: 8,5 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro), de maneira a garantir a ausência de contacto entre indivíduos e reduzir possíveis variáveis parasitas que pudessem existir resultando desse contacto. Além disso, foi colocado um exemplar vivo em cada copo e adicionada água salgada (0,2 l) do seu ambiente natural. A areia foi colocada de forma a evitar que os copos tombassem e entornassem a água. Além disso, foi recolhido 1,5 l de água salgada.

### **3.2.3. Preparação dos exemplares**

Chegando ao laboratório, os indivíduos foram deixados a repousar do transporte por 10 minutos e de seguida cada indivíduo sofreu um corte longitudinal com uma lâmina retangular (4,2 cm de comprimento por 2,1 cm de altura). O corte foi efetuado para garantir 2 partes iguais do mesmo indivíduo (Clones), obtendo-se assim 8 indivíduos (2 clones provenientes de cada indivíduo).

Durante 2 semanas após o corte, cada indivíduo foi colocado num recipiente individual de plástico transparente (650 ml) com arejamento. A alimentação foi executada durante 3 dias consecutivos, após 1 semana do corte ter sido efetuado. Nesta, cada indivíduo recebeu uma porção de alimento que consistiu num  $\frac{1}{4}$  de mexilhão, previamente descongelado, e uma porção de flocos de comida de peixe em quantidade semelhante. Na última semana os animais não foram alimentados, após o que se procedeu à observação comportamental.

#### 3.2.4. Observação do comportamento

No final da segunda semana de regeneração foram colocados conjuntos de 2 indivíduos em aquários distintos e após 15 minutos ambos os indivíduos foram colocados um com o outro. Estes foram fixos manualmente e individualmente a um substrato sólido (pedra ou concha) no respetivo aquário (1300 ml) com a água que cada recipiente de plástico continha, segundo o esquema representado na **Figura 3a (Anexos III)**.

O procedimento de amostragem, transporte dos organismos e preparação dos exemplares foi repetido 8 vezes, obtendo-se no total 24 testes de comportamento, 16 dos quais entre clones, e 8 entre organismos geneticamente diferentes.

Nestes testes, averiguou-se o tipo de comportamento agonístico mais frequente entre clones e não-clones, assim como a sua duração. Efetuou-se uma observação direta para cada teste (30 minutos), tendo-se realizado por cada ensaio dois testes de confrontos entre anémonas geneticamente iguais (clones) e um entre anémonas geneticamente diferentes. Desta forma, cada indivíduo foi apenas testado uma vez. Durante esta observação foram colocadas duas webcam (Logitech Webcam Software, modelo C170, n.º do modelo V-U0026), uma num plano frontal (observação da coluna de cada indivíduo e movimento dos tentáculos) e a outra num plano “superior” (observação do disco oral dos dois indivíduos).

Posteriormente, executou-se uma observação indireta por visualização dos vídeos recolhidos. Os comportamentos agonísticos exibidos por cada indivíduo foram registados, assim como a existência de afastamento ou

aproximação, desprendimento ou agregação ao substrato, de um ou de ambos os indivíduos.

### 3.3. Resultados/Discussão

Verificou-se que houve comportamentos agonísticos nos 24 testes realizados (100%), tendo 79% dos testes resultado no afastamento de uma das anêmonas. Através da análise da **Tabela I**, verifica-se que em todos os testes efetuados se observou contactos entre tentáculos, sendo a sobreposição face ao adversário um comportamento de elevada frequência quer em indivíduos geneticamente diferentes (não-clones) quer iguais (clones).

**Tabela I** – Percentagem de testes com ocorrência dos três comportamentos agonísticos, entre clones e não-clones.

	Testes com presença de contacto de tentáculos	Testes com presença de sobreposição do adversário	Testes com presença de contacto com acrorhagial
<b>Clones</b>	100%	93,8%	50%
<b>Não-clones</b>	100%	100%	37,5%

Verifica-se ainda que a picada com acrorhagial é o comportamento mais raro, não estando presente em todos os testes. Comparando a sua ocorrência em testes utilizando clones e não clones, verifica-se que embora seja mais frequente entre clones, esta diferença não é significativa (Teste exato de Fisher = 0.679; **Tabela 4.1** – Anexo V).

Na **Tabela II** (ou Tabela 4.2 – Anexo V) apresenta-se a frequência de três comportamentos agonísticos em indivíduos geneticamente diferentes (não clones) e iguais (clones) no total dos testes realizados. Tendo em conta o desigual número de testes realizados nas duas condições, verifica-se que não existem diferenças substanciais na ocorrência de comportamentos agonísticos entre os dois grupos.

**Tabela II** – Frequência absoluta dos comportamentos agonísticos no total dos comportamentos realizados e número médio dos mesmos por ensaio em clones e não-clones.

Grupo	Comportamento	Número de ocorrências (N)	Número médio de ocorrências por teste
Clone	Contacto entre tentáculos (a)	100	6,25
	Sobreposição do adversário (b)	82	5,13
	Ocorrência de picada com acrorragial (c)	13	0,81
Não-clone	Contacto entre tentáculos (a)	50	6,25
	Sobreposição do adversário (b)	25	3,13
	Ocorrência de picada com acrorragial (c)	7	0,88

**Legenda:** O “N” representa a totalidade de ocorrências no total dos ensaios realizados. O número médio de ocorrências por teste foi calculado dividindo o total de ocorrências pelo número de testes realizados (para clones 16 testes; para não-clones 8 testes).

Uma análise detalhada da frequência dos vários comportamentos mostra pouca variabilidade entre clones e não-clones (**Tabela III** e Tabela 4.3 – Anexo V).



**Tabela III** – Medidas de estatística descritiva obtidas para a frequências dos três comportamentos agonísticos por teste (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorragial).

Grupo	Comportamentos agonístico <sup>(1)</sup>	Estatística Descritiva				
		Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Clone	a	6,25	5,50	3,62	2	15
	b	5,13	4,00	3,40	0	13
	c	0,81	0,50	1,05	0	3
Não-clone	a	6,25	6,00	3,69	1	14
	b	3,13	3,00	1,89	1	6
	c	0,88	0,00	1,25	0	3

**Legenda:** <sup>(1)</sup> Comportamento agonísticos entre indivíduos: **(a)** contacto entre um ou mais tentáculos; **(b)** Sobreposição do adversário e **(c)** picada com o acrorragial. Salienta-se que a unidade de tempo utilizada são minutos.

No entanto, a análise da duração dos vários comportamentos em clones e não clones, mostra existir uma elevada variabilidade entre testes (**Tabela IV** e e Tabela 4.4 – Anexo V).

**Tabela IV** – Medidas de estatística descritiva obtidas para a duração dos três comportamentos agonísticos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorragial) por teste.

Grupo	Comportamentos agonístico <sup>(1)</sup>	Estatística Descritiva				
		Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Clone	a	15,14	12,34	9,84	2	34
	b	10,95	9,54	7,09	0	21
	c	1,84	1,76	1,10	0	3
Não-clone	a	18,48	17,75	11,74	2	41
	b	7,88	6,44	6,55	1	21
	c	5,33	6,72	2,67	2	7

**Legenda:** <sup>(1)</sup> Comportamento agonísticos entre indivíduos: **(a)** entre um ou mais tentáculos; **(b)** Sobreposição do adversário e **(c)** picada com o acrorragial. Comportamento realizado após um dado comportamento agonístico. Salienta-se que a unidade de tempo utilizada nesta tabela foram os minutos, sendo contabilizado o tempo total (num máximo de 60 minutos) dispendido pelas duas anémonas por teste, tendo cada anémona um total de 30 minutos.

Em termos médios, verifica-se que o tempo despendido em contactos entre tentáculos é o maior (15,14 minutos por teste em clones e 18,48 minutos em não-clones), seguido de sobreposição (10,95 minutos por teste em clones e 7,88 minutos em não-clones) e de picada com acrorragial (1,84 minutos por teste em clones e 5,33 minutos em não-clones).

Estes resultados permitem verificar que existem diferenças comportamentais entre *A. equina* e *A. fragacea*, as quais permitiram verificar que *A. fragacea* apresenta 3 tipos de comportamentos (contacto com os tentáculos, sobreposição e ataque acrorragial) semelhantes a *A. equina*, não tendo sido possível observar a existência de um quarto tipo de comportamento (libertação do acrorragi) sugerido na literatura como existente na espécie *A. equina* (por ex. Turner et al. 2003 e Foster & Briffa, 2014).

Além disso, os resultados indicam que os indivíduos da espécie *A. fragacea* podem apresentar diferentes tipos de comportamentos agressivos em diferentes sequências, sem que estes terminem com ataques com acrorragial, ao contrário do que foi sugerido por Turner et al. (2003) para *A. equina*. De facto, em apenas 46% dos testes se verificou a presença deste comportamento, tendo 79% resultado no afastamento de uma das anémonas. Ao contrário do que foi encontrado em *A. equina*, em *A. fragacea* a proximidade genética não parece estar relacionada com a presença e intensidade de comportamentos agonísticos.

### 3.4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que não existem diferenças na presença e intensidade de comportamentos agonísticos entre indivíduos geneticamente iguais e diferentes na espécie *A. fragacea*.

Foster e Briffa sugeriram que poderia existir uma relação entre os resultados que obtiveram e a ecologia da espécie *A. equina* (Foster & Briffa, 2014), na medida em que o aumento da agressividade associado à proximidade genética poderia estar associado a estratégias que promovam a dispersão numa espécie que apresenta reprodução assexuada.

Em *A. fragacea*, a reprodução assexuada é mais rara que em *A. equina* (Carter & Thorpe, 1981) e os indivíduos em meio natural encontram-se afastados uns dos outros, sendo o seu habitat mediolitoral e infralitoral, ocupando em média habitats mais profundos que *A. equina* (Carter Thorpe, 1981). Assim, o facto de nesta espécie a presença de comportamentos agonísticos ser independente da relação genética entre indivíduos parece estar relacionado mais com competição interespecífica e proteção, do que com competição intraespecífica.

### 3.5. Referências

- Ager, O. (2015). *Actinia fragacea*. Strawberry anemone. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme. Retrieved from <http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=2360>
- Barnes, R. D., Ruppert, E. E., & Litvaitis, M. K. (1968). Invertebrate zoology. (W. B. S. Company, Ed.) (Philadelph.). Tokyo, Japan: WB Saunders Philadelphia.
- Bigger, C. H. (1976). The acrorhagial response in anthopleura KREBS I: intraspecific and interspecific recognition. In U. of Mackie, Edited by G. O. Victoria & B. C. Victoria (Eds.), Coelenterate ecology and behavior (Mackie, George Owen) (Springer S., Vol. 3, pp. 127–136). Canada: Springer Science & Business Media.
- Bigger, C. H. (1980). Interspecific and intraspecific acrorhagial aggressive behavior among sea anemones: a recognition of self and not-self. The Biological Bulletin, 159(1), 117–134. Retrieved from <http://www.biolbull.org/content/159/1/117.short>
- Brace, R. C. (1981). Intraspecific aggression in the colour morphs of the anemone *Phymactis clematis* from Chile. Marine Biology, 64(1), 85–93. doi:10.1007/BF00394084
- Brace, R. C., & Pavey, J. (1978). Size-dependent dominance hierarchy in the anemone *Actinia equina*. Nature, 273, 752–753. doi:10.1038/273752a0
- Briffa, M., & Greenaway, J. (2011). High in situ repeatability of behaviour indicates animal personality in the beadlet anemone *Actinia equina*

- (Cnidaria). PLoS One, 6(7), e21963. doi:e21963. doi:10.1371/journal.pone.0021963
- Carter, M. A., & Thorpe, J. P. (1981). Reproductive, genetic and ecological evidence that *Actinia equina* var. *mesembryanthemum* and var. *fragacea* are not conspecific. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 61(01), 79–93. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400045926
- Cortazares, J. F., Campos, R. C., & Moreno, J. L. S. y. (2011). Picadura por Anémona. Bol Clin Hosp Infant Edo Son, 28(1), 34–37. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2011/bis111i.pdf>
- Foster, N. L., & Briffa, M. (2014). Familial strife on the seashore: Aggression increases with relatedness in the sea anemone *Actinia equina*. Behavioural Processes, 103, 243–245. doi:10.1016/j.beproc.2014.01.009
- Francis, L. (1988). Cloning and aggression among sea anemones (Coelenterata: Actiniaria) of the rocky shore. The Biological Bulletin, 174(3), 241–253. Retrieved from <http://www.biolbull.org/content/174/3/241.short>
- Sebens, K. P. (1984). Agonistic behavior in the intertidal sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. The Biological Bulletin, 166(3), 457–472.
- Shick, J. M. (1991). A Functional Biology of Sea Anemones. Chapman & Hall. London.
- Ocaña, O., Brito, A., & González, G. (2005). The genus *Actinia* in the Macaronesian archipelagos: a general perspective of the genus focussed on the North-oriental Atlantic and the Mediterranean species (Actiniaria: Actiniidae). Viera, 33(0210-945X), 477–494. Retrieved from [http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes\\_Vier33-034.pdf](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes_Vier33-034.pdf)
- Turner, V. L. G., Lynch, S. M., Paterson, L., León-Cortés, J. L., & Thorpe, J. P. (2003). Aggression as a function of genetic relatedness in the sea anemone *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniaria). Marine Ecology Progress Series, 247, 85–92. doi:10.3354/meps247085

Williams, R. B. (1991). Acrorhagi, catch tentacles and sweeper tentacles: a synopsis of aggression of actiniarian and scleractinian Cnidaria. *Hydrobiologia*, 216(1), 539–545. doi:10.1007/BF00026511

## Anexos

### **Anexo I – Revisão Bibliográfica**

As anêmonas-do-mar são organismos que se encontram inseridos no Filo Cnidaria Hatschek, 1888; Classe Anthozoa Ehrenberg, 1834; Subclasse Hexacorallia (Haeckel, 1866); ordem Actiniaria Hertwig, 1882 (Rodríguez et al., 2014).

O filo Cnidaria é constituído por cerca de 10 000 espécies (Chapman, 2009). Histologicamente, os cnidários são organismos primitivos com estruturas simples, apesar de apresentarem algumas estruturas especializadas semelhantes aos metazoários superiores (Barnes & Ruppert, 1993). Além disso, podem ter duas ou apenas uma forma de vida (sésil ou móvel) (Veale & Lavery, 2012).

Morfologicamente, os organismos pertencentes a este filo possuem simetria radial primária, cavidade intestinal revestida por uma endoderme, cavidade gastrovascular e uma parede corporal com três camadas – epiderme, mesoglêia e gastoderme (Barnes & Ruppert, 1993). As características consideradas diagnosticantes deste filo são o fato dos organismos possuírem simetria radial, assim como um estágio de plânula e de pólipos, durante o desenvolvimento (Daly et al., 2007).

No entanto, existem algumas problemáticas associadas à utilização destas características, tais como: o fato de alguns cnidários apresentarem simetria assimétrica, alguns possuem uma organização biradial ou bilateral, levando alguns autores a concluir que a simetria bilateral é a condição ancestral para o filo (Daly et al., 2007).

Além disso, existem outras características difíceis de definir nestes organismos (por ex. distinção entre a fase móvel do embrião e do juvenil), tal como a existência de várias formas de pólipos (Daly et al., 2007).

Por outro lado, os organismos podem ser solitários ou coloniais (Daly et al., 2007). Sendo que, quando estão agrupados em colónias, os pólipos podem ser: monomórfico ou polimórfico, ausentes ou não de um esqueleto mineralizado, bentónicos ou pelágicos, e os tentáculos tanto podem estar presentes como ausentes (Daly et al., 2007).

De fato, a única característica comum a todos os elementos deste grupo é a presença de cnidas, estruturas com função de defesa (Daly et al., 2007). Alguns cnidas são constituídos por nematocistos, os quais podem injetar toxinas na presa ou predador (Carrette & Seymour, 2004). Este produto encontra-se, geralmente, distribuído pela epiderme e, esporadicamente, pode ser encontrado na gastroderme (Daly et al., 2007).

As cnidas são estruturas especializadas, derivadas de organelos, compostas por uma cápsula que contém um filamento urticante reversível. Existem vários tipos de cnidas, sendo os nematocistos o único tipo de cnida presente em todos os cnidários (Daly et al., 2007).

A estrutura taxonómica tradicional do filo é concordante, de uma maneira geral, com as relações filogenéticas entre os grupos que compõem este filo. No entanto, algumas discordâncias existem entre a classificação taxonómica clássica e a filogenética (Daly et al., 2007). O estudo das relações genéticas entre clades neste grupo têm utilizado sequenciação dos genes nucleares e mitocondriais que codificam as subunidades ribossomais nucleares (por ex. as subunidades 28S e 16S), averiguando as relações entre diferentes classes (Collins et al., 2006; Rodríguez et al., 2014).

Geograficamente, este filo possui uma distribuição alargada, devido à sua alta dispersão, embora esta seja dependente de vários fatores ambientais, os quais facilitam o ciclo reprodutivo e conseqüentemente permitem uma melhor dispersão dos gâmetas e a colonização dos organismos nos habitats (Gadelha, 2007).

Em Portugal, os cnidários ocupam uma ampla área da nossa costa, sendo importante do ponto de vista ecológico a sua preservação, conhecer a sua ecologia em detalhe e estudar os padrões que regulam as suas populações (Gadelha, 2007). Estas informações são importantes para a gestão das várias espécies, como base para o desenvolvimento de vários estudos de crescimento, colonização e povoamento que forneçam ferramentas para a gestão ambiental nos ecossistemas marinhos e sejam direcionados no sentido de alcançarem um equilíbrio sustentável do ambiente (Gadelha, 2007).

Estes organismos encontram-se na base da cadeia trófica dos ecossistemas e possuem várias adaptações alimentares e de defesa (Gadelha, 2007). Estas características destacam a importância da compreensão e do funcionamento

dos mecanismos de sobrevivência e colonização destes organismos, os quais deram origem a vários estudos ecológicos, que permitiram estabelecer bases científicas que melhoram a compreensão do funcionamento ambiental e/ou dos organismos (Gadelha, 2007).

Além disso, os estudos de sucessão que fornecem informações sobre a dinâmica das comunidades (por ex. Foster, 1975) e garantem a percepção: dos padrões de recolonização, das consequências, das adaptações fisiológicas, das histórias de vida, dos padrões demográficos e das interações inter e intraespecífica (Gadelha, 2007).

Em termos reprodutivos e de ciclo de vida, estes organismos podem ser hermafroditas ou dióicos (Barnes & Rupert, 1993). Apresentam dois tipos de reprodução: sexuada (com autofecundação ou fecundação cruzada) e assexuada (fissões longitudinais ou transversais, laceração do disco pedal ou dos tentáculos e ainda por regeneração epimórfica) (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin, Thorpe, & Solé-Cava, 1999), sendo que a reprodução sexuada ocorre após o desenvolvimento dos gametas (Bocharova & Kozevich, 2011).

A origem e o desenvolvimento das células germinativas, nestes invertebrados, têm várias características específicas (Bocharova & Kozevich, 2011). Alguns investigadores consideram que as células germinativas nestes animais são provenientes da diferenciação de várias células epiteliais presentes na epiderme e/ou na gastroderme (Bocharova & Kozevich, 2011). Outros cientistas, defendem que os gametas são oriundos de células intersticiais (Bocharova & Kozevich, 2011).

Assim, o sistema reprodutivo é relativamente simples, visto não existirem “verdadeiras” gónadas os gametas entram na cavidade gastrovascular, após existirem “cortes” no epitélio mesentérico e posteriormente pode ser ejetados pela cavidade oral (Bocharova & Kozevich, 2011). Esta gónada indiferenciada surge após um inchado longitudinal no mesentérico, entre o filamento gástrico e o feixe muscular (Bocharova & Kozevich, 2011). Os locais de desenvolvimento gonadal variam entre as espécies, ou seja as gónadas tanto podem desenvolver-se em quaisquer mesentérios ou apenas nos mesentérios do primeiro círculo ou em outros (Bocharova & Kozevich, 2011).



O desenvolvimento das células femininas (oócitos), ao contrário das células germinais masculinas, não levam à formação de agregados, e dá-se por alterações pré-meióticas nos seus núcleos (Bocharova & Kozevich, 2011). Além disso, os oócitos podem-se desenvolver e diferenciar, por tamanhos, relativamente cedo (Bocharova & Kozevich, 2011). Assim, as gónadas contêm óvulos separados em diferentes estágios de desenvolvimento (Bocharova & Kozevich, 2011). Os oócitos possuem diferentes polaridades e várias substâncias no citoplasma (Bocharova & Kozevich, 2011). Uma característica morfológica que facilita a identificação dos oócitos maduros é a de várias dezenas de microvilosidades dispostas de forma radicular, à superfície do oócito, permitindo o fornecimento de nutrientes (Bocharova & Kozevich, 2011).

Em contraste, as células germinativas masculinas são semelhantes em tamanho, e os seus núcleos permanecem relativamente leves, com granulação fina da cromatina (Bocharova & Kozevich, 2011). A ausência de acrossoma é uma característica distintiva dos espermatozóides das anémonas-do-mar, como em outros cnidários (Bocharova & Kozevich, 2011). A espermatogénese dá-se pela formação do folículo no mesentério da gastroderme, causando uma mutação na aparência, enquanto se move para a base da camada epitelial e se diferencia (Bocharova & Kozevich, 2011). Assim, as gónadas masculinas desenvolvem-se na mesogleia do mesentério, através da formação de aglomerados densos (Bocharova & Kozevich, 2011). A estrutura resultante é semelhante à ligação endodérmica que executa uma função nutritiva (por ex. fornece ácidos nucleicos) e seus precursores para o folículo durante oogénese (Bocharova & Kozevich, 2011).

A fertilização pode ocorrer externamente, na coluna de água ou internamente nas gónadas – formada na epiderme, enquanto os óvulos e o espermatozóide estão presentes nas células intersticiais, também elas presentes na epiderme (Barnes & Ruppert, 1993).

A reprodução assexuada, em anémonas, pode ocorrer por fissão longitudinal ou transversal, por laceração do disco pedal, por fragmentação dos tentáculos, e por regeneração epimórfica, levando à existência de clones (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin et al., 1999).

A fissão longitudinal é a reprodução mais frequente e ocorre mais vezes quando os tempos de jejum dos organismos são mais longos (Bocharova & Kozevich, 2011; Smith & Lenhoff, 1976), iniciando-se perto do disco pedal e consiste num “estrangulamento” longitudinal terminando na separação do corpo da anêmona em duas partes (Bocharova & Kozevich, 2011). Estes mecanismos fornecem vantagens adaptativas, pois permitem uma diminuição da energia durante o tempo de ingestão uma vez que implica uma redução da cavidade oral (Bocharova & Kozevich, 2011). Por vezes, inicia-se na parede lateral da coluna, levando à formação de vários novos indivíduos após a separação (Bocharova & Kozevich, 2011).

Por outro lado, a fissão transversal começa com o aparecimento de uma “gema”, semelhante a uma banda de tentáculo, na parte central do corpo (Bocharova & Kozevich, 2011). De seguida, dá-se um estrangulamento transversal por cima da banda e o corpo separa-se em duas partes (Bocharova & Kozevich, 2011). A parte superior regenera, o disco pedal e a parte inferior forma a boca no centro da corola de tentáculos (Bocharova & Kozevich, 2011). Por vezes, existem sinais da ocorrência de uma nova fissão pouco antes da primeira fissão ficar concluída (Bocharova & Kozevich, 2011).

A laceração no disco pedal consiste numa distensão radial do disco pedal seguida de uma separação de tecido (ou fragmentação) da margem periférica do disco pedal ou do mesentério ou de uma porção da parede lateral do corpo, por vezes após uma lesão do disco (por ex. resultante da locomoção no substrato) (Bocharova & Kozevich, 2011; Smith & Lenhoff, 1976).

Após a separação, os bordos da ferida fecham-se, e existe a formação de novos tentáculos e septos radiais formando, assim, os pólipos (Bocharova & Kozevich, 2011).

Já a reprodução por fragmentação dos tentáculos, dá-se após a separação de um ou mais tentáculos da coluna. Cada tentáculo possui uma zona exposta que é fechada por um "tampão de tecido", que acaba por cair com o início da proliferação celular (Bocharova & Kozevich, 2011). Subsequentemente, forma-se a coluna da nova anêmona e o desenvolvimento do novo indivíduo, por vezes, pode começar antes da separação do tentáculo, surgindo um pequeno pólipo que permanece no disco oral parental (Bocharova & Kozevich, 2011).

Por último, a regeneração epimórfica é a restauração de uma determinada zona ou órgãos do corpo que foram perdidos, a qual dá origem a um ou mais indivíduos (Bocharova & Kozevich, 2011; Perrin et al., 1999). Após a reprodução assexuada, existem as “segregações” de indivíduos geneticamente idênticos, os quais podem formar colónias (E. Purcell & Grove, 1982).

Taxonomicamente, o filo encontra-se agrupado em duas classes: Anthozoa e Medusozoa Petersen, 1979 (Marques & Collins, 2004), as quais se caracterizam por serem dois clados reciprocamente monofiléticos (Daly et al., 2007). A distinção entre estas classes é apoiada pela anatomia, história de vida (Daly et al., 2007), a estrutura do genoma e sequências de ADN (Daly et al., 2007; Marques & Collins, 2004).

Estas duas classes diferem pela presença ou ausência de pólipos sésseis e/ou de uma fase de medusa (Marques & Collins, 2004). Ambas apresentam diferentes caracteres filogenéticos (Daly et al., 2007), sendo a mais antiga a classe Anthozoa (Collins et al., 2006), a qual é constituída por cerca de 7.500 espécies e compreende duas linhagens reciprocamente monofiléticos, Octocorallia e Hexacorallia (Daly et al., 2007). Todos os membros desta classe são exclusivamente polipóides e tanto podem ser coloniais como solitários (Daly et al., 2007).

Desta forma, a classe Anthozoa, apresenta animais morfologicamente diferentes dos medusozoários, por serem polipóides, possuírem mobilidade e não exibirem no seu ciclo de vida a fase de medusa (por ex. Barnes & Ruppert, 1993; Bridge, Cunningham, Schierwater, DeSalle, & Buss, 1992; Collins, 2009; Collins et al., 2006; Kruger & Griffiths, 1996), pois na classe Medusozoa os organismos mantiveram a fase sésil e possuem ainda a fase de medusa no ciclo de vida (Bridge et al., 1992; Collins et al., 2006; Marques & Collins, 2004).

A subclasse Hexacorallia é composta por cerca de 4.300 espécies, abrangendo quer corais quer anémonas (Daly et al., 2007). A maioria dos indivíduos possui uma simetria hexamétrica e todos os membros têm espirocistos (cnida composto por uma única cápsula e por um túbulo minúsculo) (Daly et al., 2007). Além disso, a morfologia dos pólipos desta subclasse é amplamente variável, ao contrário dos pólipos da subclasse irmã

(Daly et al., 2007). No entanto, a monófilia do grupo e as relações dentro desta subclasse têm sido difíceis de interpretar (por ex. distinguir semelhanças morfológicas entre as larvas e pólipos), sendo necessário recorrer a análises genéticas (por ex. efetuar análises utilizando os genes nucleares que codificam as subunidades 18S ou 28S) (Daly et al., 2007).

A ordem é igualmente considerada monofilética e os indivíduos são compostos por: um plano corporal que demonstra altos níveis de convergência morfológica e os poucos caracteres morfológicos revelam que, os mesmos, foram perdidos durante o processo de evolução (Rodríguez et al., 2014).

Fenotipicamente, estão presentes três elementos triangulares no ápice das cápsulas que fletem para fora durante a descarga da toxina que produzem (Rodríguez et al., 2014). Estes organismos exibem uma notável diversidade: morfológica (por ex. os pólipos apresentam uma grande variedade de coluna e tentáculo) e estratégias evolutivas (por ex. simbioses com outros organismos) (Rodríguez et al., 2014).

Em termos sistemáticos, a família Actiniidae possui uma coluna lisa ou repleta de “rugos”, com: esferas marginais, pseudoesferas ou vesículas com amastigóforos macrobásicos ausentes (den Hartog & Ocaña, 2003). Encontra-se ausente o esfícter e não existe endoderme difusa circunscrita (den Hartog & Ocaña, 2003).

Os indivíduos desta família possuem tentáculos simples, dispostos em círculos e nunca existe mais do que um tentáculo a comunicar com cada endocélio e exocélio (den Hartog & Ocaña, 2003). Os mesentérios, por vezes, não se encontram divididos em macrocones (constituídos por um músculo retrator muito forte, encontrado-se composto ainda por filamentos e gónadas) nem microcones (designação dada quando os mesentérios estão ausentes do músculo retrator, dos filamentos e das gónadas) necessitando de um desenvolvimento faseado, o qual ocorre da fase menos desenvolvida para a fase mais desenvolvida (den Hartog & Ocaña, 2003). Além disso, os microcones, em toda as espécies de Actiniidae são facilmente reconhecidos e permitem a sua distinção (por ex. Ocaña, 1994) (den Hartog & Ocaña, 2003).

O género *Actinia* Linnaeus, 1767, morfologicamente, apresenta vários tipos de pólipos (Barnes & Ruppert, 1993; Perrin et al., 1999), os quais apresentam características externas semelhantes, tais como: uma coluna cilíndrica (lisa ou constituída por fibras visíveis), cavidade gastrovascular (onde circula a água que permite ao organismo suportar o esqueleto hidrostático, excretar fluídos; ocorrendo também a digestão), cavidade oral numa das extremidades (boca) rodeada por um círculo de tentáculos (ajudam na captura e ingestão das presas) e um disco basal (tecido fino que permite ao animal aderir ao substrato) (Barnes & Ruppert, 1993; Perrin et al., 1999). Internamente, possuem uma actinofaringe (origem ectodérmica) que faz a comunicação entre a boca e a cavidade gastrovascular, a qual está dividida em câmaras radiais (mesentérios ou septos constituídos por dobras longitudinais da gastroderme e da mesogleia). As gónadas encontram-se distribuídas nos mesentérios (Perrin et al., 1999).

Assim, a maioria das espécies do género *Actinia* podem ser reconhecidas por vários caracteres internos e externos, os quais podem ser apoiados por características morfológicas, ecológicas ou reprodutivas (den Hartog & Ocaña, 2003).

Neste grupo é possível observar ambas as formas de vida características dos cnidários, sendo que a forma móvel apenas se encontra presente na fase larvar do ciclo de vida (Veale & Lavery, 2012). Esta fase, permite às anémonas percorrer longas distâncias, garantindo uma modelação na: estrutura genética, conectividade e no autorecrutamento das populações (Veale & Lavery, 2012).

Segundo Perrin et al. (1999), este género inclui nove espécies, das quais sete ocorrem no Atlântico nordeste e Mediterrâneo. Destas, a espécie que ocupa uma maior área geográfica é *Actinia equina* (Linnaeus 1758). Esta espécie vive em substrato rochoso, no mediolitoral e infralitoral, até profundidades de 20m. É morfologicamente uma espécie muito lábil, apresentando múltiplos padrões de coloração. Macroscopicamente, esta espécie é muito difícil de distinguir de *Actinia schmidtii* (Monteiro, Sole-Cava & Thorpe, 1997). Esta última ocorre no Mediterrâneo e na costa Atlântica da Península Ibérica e ilhas macaronésias, e distingue-se de *A. equina* apenas microscopicamente, através da presença (na *Actinia schmidtii*) e ausência (na

*Actinia equina*) do filamentos p-mastigophores B1A (Ocaña, Brito, & González, 2005).

*Actinia fragacea* Tugwell, 1856, é outra espécie deste género com uma distribuição simpátrica com *A. equina*. De facto, foi considerada por Schmidt (1971) como uma subespécie desta última. Porém, Carter e Thorpe (1981) encontraram diferenças genéticas e ecológicas significativas entre *A. fragacea* e *A. equina* reconhecendo a primeira como uma espécie (den Hartog & Ocaña, 2003). Esta espécie distingue-se de outras espécies devido ao padrão de coloração apresentado - coluna e tentáculos avermelhados, e pintas amarelas, verdes ou azuis na coluna (den Hartog & Ocaña, 2003).

Em termos comportamentais, é possível compreender a distribuição taxonómica, através das diferentes respostas individuais, pois a evolução comportamental das espécies ocorre devido ao mecanismo fundamental da variação das respostas dos indivíduos ao meio ambiente (Rands, Cowlshaw, Pettifor, Rowcliffe, & Johnstone, 2003; Wolf, Van Doorn, Leimar, & Weissing, 2007) ou das respostas sociais (McNamara, Stephens, Dall, & Houston, 2009). Assim, os estudos populacionais em algumas espécies de anémonas permitem verificar que estes organismos se agregam em colónias e que as mesmas são constituídas por várias gerações, colocando-se a hipótese de que a competição e a predação podem atuar diretamente na estrutura populacional (Dayton, 1971), pois estas mudanças resultam de um comportamento territorial, o qual é determinante na organização social (Myrberg & Thresher, 1974). Ao estudar os comportamentos agressivos é possível verificar se existem ou não interações diretas entre indivíduos (Foster & Briffa, 2014). As observações em meio natural demonstram que uma determinada organização deve ser considerada tanto ao nível dos encontros conspecíficos (por ex. agressão intraespecíficas) como nos encontros que envolvam outras espécies (por ex. agressão interespecíficas), pois ambas compõem a comunidade (Myrberg & Thresher, 1974). Assim, as agressões interespecíficas podem interferir nos padrões de ocupação espacial (Pacala & Roughgarden, 1982).

Porém, por exemplo, nos indivíduos da espécie *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) as sequências comportamentais variam quer entre morfótipos

diferentes (vermelho, verde e castanho) quer entre morfótipos iguais (Ager, 2008; Brace & Pavey, 1978).

Embora, por vezes os resultado de uma competição pela posse de um recurso indivisível (por ex. espaço), determinem um comportamento agonístico não prejudicial (Foster & Briffa, 2014). Sempre que o valor do recurso é elevado ou quando os adversários possuem vantagens verifica-se um aumento do nível da agressividade e um aumento dos danos no indivíduo que se encontra em desvantagem (Foster & Briffa, 2014).

A espécie *Actinia equina*, é disso um exemplo, pois esta espécie possui padrões individuais independentes da heterogeneidade ambiental (por ex. temperatura e concentrações salinas, entre outras) (Briffa & Greenaway, 2011), mas dependente de vários processos evolutivos (por ex. seleção natural, seleção sexual e restrições na plasticidade comportamental) (Schuett, Tregenza, & Dall, 2010; Wolf et al., 2007) e de mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento (por ex. adaptação ao meio ou história de vida (Fraser, Gilliam, Daley, Le, & Skalski, 2001; McNamara et al., 2009).

A avaliação dos padrões de resposta individual de cada animal, podem ser obtidos estudando as variações comportamentais (por ex. repetibilidade, duração, diferenças entre habitats) existentes dentro de uma espécie (Bell, Hankison, & Laskowski, 2009; Schuett et al., 2010; Wolf et al., 2007). Além disso, as variações comportamentais resultam da capacidade dos indivíduos adaptarem o seu comportamento a novas situações, através da recolha e da avaliação da informação que obtêm do meio (Brace & Pavey, 1978).

Os estudos de agressões intraespecíficas, defendem que os indivíduos com a mesma informação genética (clones) e pertencentes à mesma espécie reconhecem-se num dado momento e não infligem “ataques” com o acrorhagi no oponente, o que poderá estar relacionado com o facto de partilharem alelos de reconhecimento (Turner, Lynch, Paterson, León-Cortés, & Thorpe, 2003). Porém, o sistema de reconhecimento não é específico, pois sempre que os organismos competem com anémonas de outras famílias, por exemplo com indivíduos da espécie *Metridium senil* (Linnaeus, 1761) existem na mesma altos níveis de agressão (Turner et al., 2003). Assim, as agressões podem ocorrer, também, entre indivíduos geneticamente diferentes – agressões interespecíficas (J. Purcell & Kitting, 1982).

Por outro lado, quando existe um (ou mais) reencontros entre os mesmos organismos a agressão pode ser reforçada positivamente pelo sucesso do agressor (indivíduo vencedor do primeiro encontro) (Potegal, 1979). Além disso, uma agressão defensiva, em condições de adversidade, pode reforçar positivamente, de igual modo, os indivíduos perdedores com este tipo de agressão, pois existe uma resposta adequada (por ex. fuga e/ou ataque) quando ocorre a interação entre os mesmos indivíduos (Potegal, 1979).

Todas estas questões biológicas, em anêmonas-do-mar, fazem com que ainda existam muitos campos por estudar, tais como determinar: possíveis distâncias percorrida pelos pólipos incubados, quais as situações internas e externas que levam uma dada espécie de anêmona a optar pela reprodução sexuada ou assexuada, entre outras.

## Referências

- Ager, O. (2008). *Actinia equina*. Beadlet anemone. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme. Retrieved from <http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=2359>
- Barnes, R. D., & Ruppert, E. E. (1993). *Invertebrate zoology*. (W. B. S. Company, Ed.). Philadelphia: WB Saunders Philadelphia.
- Bell, A. M., Hankison, S. J., & Laskowski, K. L. (2009). The repeatability of behaviour: a meta-analysis. *Animal Behaviour*, 77(4), 771–783. doi:10.1016/j.anbehav.2008.12.022
- Bocharova, E. S., & Kozevich, I. A. (2011). Modes of reproduction in sea anemones (Cnidaria, Anthozoa). *Biology Bulletin*, 38(9), 849–860. doi:10.1134/S1062359011090020
- Brace, R. C., & Pavey, J. (1978). Size-dependent dominance hierarchy in the anemone *Actinia equina*. *Nature*, 273, 752–753. doi:10.1038/273752a0
- Bridge, D., Cunningham, C. W., Schierwater, B., DeSalle, R., & Buss, L. W. (1992). Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), 8750–8753. doi:10.1073/pnas.89.18.8750
- Briffa, M., & Greenaway, J. (2011). High in situ repeatability of behaviour indicates animal personality in the beadlet anemone *Actinia equina*



- (Cnidaria). PLoS One, 6(7), e21963. doi:e21963. doi:10.1371/journal.pone.0021963
- Carlgren, O. H. (1949). A survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria (Vol. 1). Almqvist & Wiksells boktr.
- Carrette, T., & Seymour, J. (2004). A rapid and repeatable method for venom extraction from Cubozoan nematocysts. *Toxicon*, 44(2), 135–139. doi:10.1016/j.toxicon.2004.04.008
- Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world (2 nd.). Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts Canberra. Retrieved from <http://155.187.2.69/biodiversity/abrs/publications/other/species-numbers/2009/pubs/nlsaw-2nd-complete.pdf>
- Collins, A. G. (2009). Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to Marine Sciences*, 38, 139–149. Retrieved from [http://www.si.edu/marinescience/pdf/SCMS\\_Collins.pdf](http://www.si.edu/marinescience/pdf/SCMS_Collins.pdf)
- Collins, A. G., Schuchert, P., Marques, A. C., Jankowski, T., Medina, M., & Schierwater, B. (2006). Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology*, 55(1), 97–115. doi:10.1080/10635150500433615
- Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., others. (2007). The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, 1668, 127–182. Retrieved from <http://www.mapress.com/zootaxa/2007f/zt01668p182.pdf>
- Dayton, P. K. (1971). Competition, disturbance, and community organization: the provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecological Monographs*, 41(4), 351–389. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2307/1948498>
- Den Hartog, J. C., & Ocaña, O. (2003). A new endemic *Actinia* species (Actiniaria: Actiniidae) from the central Macaronesian Archipelagos. *Zoologische Mededelingen*, 77, 229–244. Retrieved from <http://www.repository.naturalis.nl/document/44268>

- Fautin, D. G. (1988). Importance of nematocysts to actinian taxonomy. (A. P. Limited, Ed.) The biology of nematocysts (Academic P., Vol. 25). San Diego, California 92101: Academic Press, San Diego, CA.
- Foster, N. L., & Briffa, M. (2014). Familial strife on the seashore: Aggression increases with relatedness in the sea anemone *Actinia equina*. Behavioural Processes, 103, 243–245. doi:10.1016/j.beproc.2014.01.009
- Fraser, D. F., Gilliam, J. F., Daley, M. J., Le, A. N., & Skalski, G. T. (2001). Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration. The American Naturalist, 158(2), 124–135. doi:10.1086/321307
- Gadelha, J. R. (2007). Estudos ecológicos preliminares e caracterização química dos Cnidaria da costa noroeste portuguesa. Universidade de Aveiro. Retrieved from <https://ria.ua.pt/handle/10773/759>
- Kruger, L. M., & Griffiths, C. L. (1996). Sources of nutrition in intertidal sea anemones from the south-western Cape, South Africa. Zoological Society of Southern Africa, 31(3), 110–119. doi:0967-0653
- Marques, A. C., & Collins, A. G. (2004). Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. Invertebrate Biology, 123(1), 23–42. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3227078>
- McNamara, J. M., Stephens, P. A., Dall, S. R. X., & Houston, A. I. (2009). Evolution of trust and trustworthiness: social awareness favours personality differences. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 276(1657), 605–613. doi:10.1098/rspb.2008.1182
- Myrberg, A. A., & Thresher, R. E. (1974). Interspecific aggression and its relevance to the concept of territoriality in reef fishes. American Zoologist, 14(1), 81–96. Retrieved from <http://icb.oxfordjournals.org/content/14/1/81.short>
- Ocaña, O., Brito, A., & González, G. (2005). The genus *Actinia* in the Macaronesian archipelagos: a general perspective of the genus focussed on the North-oriental Atlantic and the Mediterranean species (Actiniaria: Actiniidae). Viera, 33(0210-945X), 477–494. Retrieved from

[http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes\\_Vier33-034.pdf](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes_Vier33-034.pdf)

- Pacala, S., & Roughgarden, J. (1982). Resource partitioning and interspecific competition in two two-species insular *Anolis lizard* communities. *Science* (Washington), 217(4558), 444–446. Retrieved from [http://www.researchgate.net/profile/Joan\\_Roughgarden/publication/6057486\\_Resource\\_partitioning\\_and\\_interspecific\\_competition\\_in\\_two-species\\_insular\\_anolis\\_lizard\\_communities/links/546411c00cf2837efd-b3497a.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Joan_Roughgarden/publication/6057486_Resource_partitioning_and_interspecific_competition_in_two-species_insular_anolis_lizard_communities/links/546411c00cf2837efd-b3497a.pdf)
- Perrin, M. C. ., Thorpe, J. P. ., & Solé-Cava, A. M. (1999). Population structuring, gene dispersal and reproduction in the *Actinia equina* species group. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 37, 129–152.
- Potegal, M. (1979). The reinforcing value of several types of aggressive behavior: A review. *Aggressive Behavior*, 5(4), 353–373. doi:10.1002/1098-2337(1979)5:4<353::AID-AB2480050404>3.0.CO;2-7
- Purcell, J., & Kitting, C. (1982). Intraspecific aggression and population distributions of the sea anemone *Metridium senile*. *The Biological Bulletin*, 162(3), 345–359. Retrieved from <http://www.biolbull.org/content/162/3/345.short>
- Rands, S. A., Cowlshaw, G., Pettifor, R. A., Rowcliffe, J. M., & Johnstone, R. A. (2003). Spontaneous emergence of leaders and followers in foraging pairs. *Nature*, 423(6938), 432–434. doi:0.1038/nature01630
- Rodríguez, E., Barbeitos, M. S., Brugler, M. R., Crowley, L. M., Grajales, A., Gusmão, L., Daly, M. (2014). Hidden among sea anemones: The first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. *PloS One*, 9(5), e96998. doi:10.1371/journal.pone. 0096998
- Schuett, W., Tregenza, T., & Dall, S. R. X. (2010). Sexual selection and animal personality. *Biological Reviews*, 85(2), 217–246. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00101.x

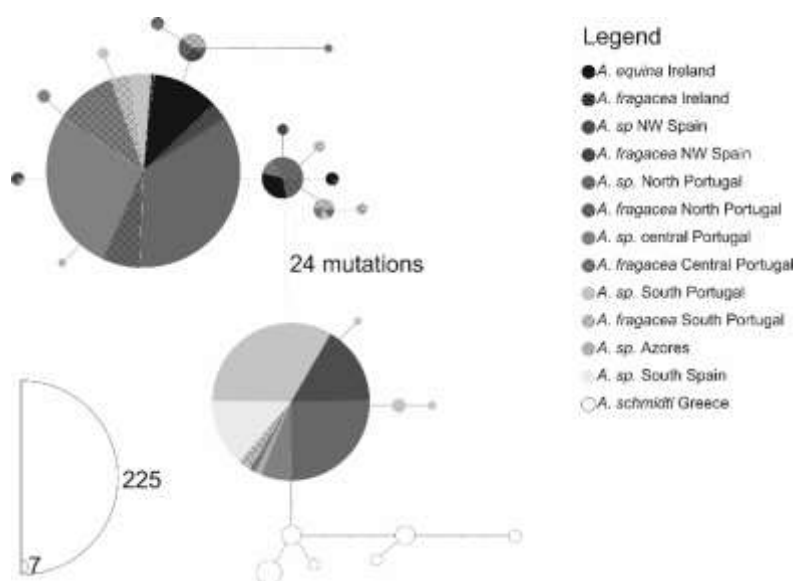
- Smith, N., & Lenhoff, H. M. (1976). Regulation of Frequency of Pedal Laceration in a Sea Anemone. *Microscopical Science*, (2-64), 425–572. doi:10.1007/978-1-4757-9724-4\_13
- Turner, V. L. G., Lynch, S. M., Paterson, L., León-Cortés, J. L., & Thorpe, J. P. (2003). Aggression as a function of genetic relatedness in the sea anemone *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniaria). *Marine Ecology Progress Series*, 247, 85–92. doi:10.3354/meps247085
- Veale, A. J., & Lavery, S. D. (2012). The population genetic structure of the waratah anemone (*Actinia tenebrosa*) around New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 46(4), 523–536. doi:10.1080/00288330.2012.730053
- Wolf, M., Van Doorn, G. S., Leimar, O., & Weissing, F. J. (2007). Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature*, 447(7144), 581–584. doi:10.1038/nature05835

## **Anexo II – Protocolo**

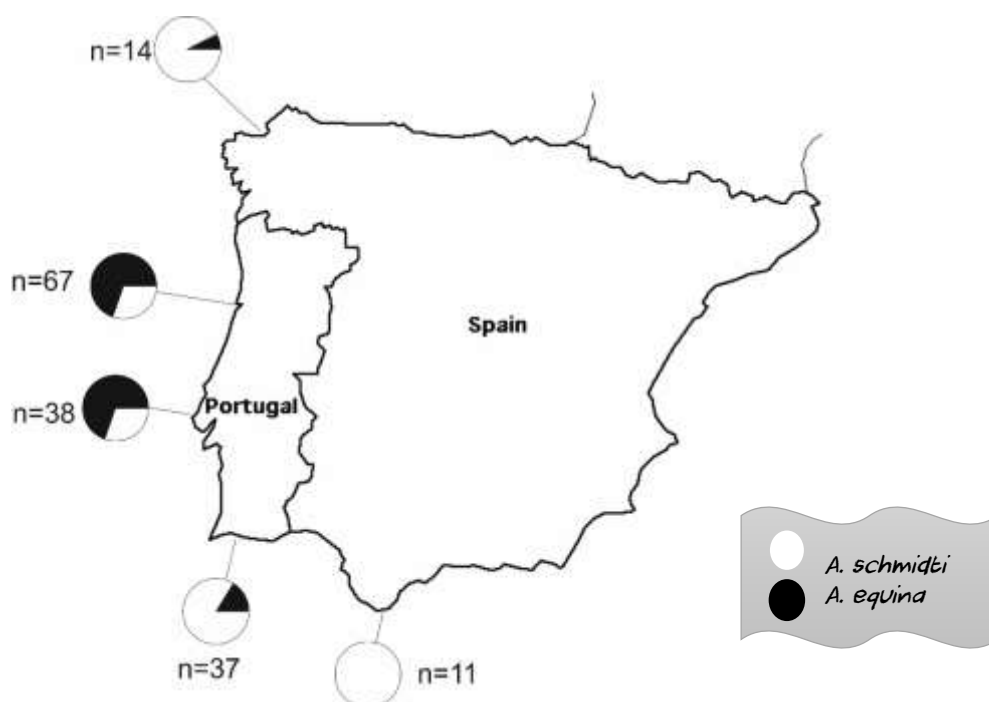
### **Protocolo I – Extração de ADN genómico**

1. Marcar os eppendorfs com o nome das amostras.
2. Adicionar 100 µl de solução de extração a cada tubo de 0,2 ml esterilizados.
3. Esterilizar a lâmina e a pinça com álcool e de seguida queima-las.
4. Após a esterilização cortar um pedacinho de tecido de cada amostra.
5. Adicionar 25 µl de solução de preparação de tecidos em cada tubo.
6. Incubar no Termociclador os tubos nos programa “Extração” (quantidade: 125µl; 15 minutos), de forma a extrair o DNA alvo.
7. Adicionar 100 µl de solução de neutralização, homogeneizar no vórtex e congelar.

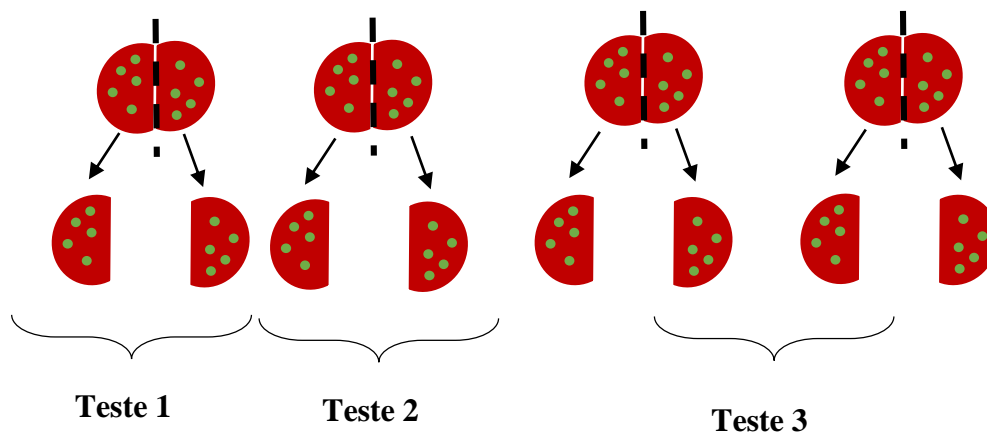
### Anexo III – Figuras complementares aos capítulos



**Figura 1a** – Representação da rede de haplótipos da Máxima parcimónia (utilizando os dados relativos ao gene 28S).



**Figura 1b** – Representação da abundância relativa das espécies *Actinia schmidtii*, e *A. equina* por local de amostragem.



**Figura 3a** – Esquema utilizado na seleção dos indivíduos em cada combate  
(© Cadeireiro, 2015).

## Anexo IV – Tabelas complementares aos capítulos

**Tabela 3.1** – Número de amostras realizadas por região e local de amostragem, assim como as espécies encontradas.

Espécie	Região	Local de Amostragem	Coordenadas	N
<i>A. equina</i>	Irlanda	Ballyloughane Beach	53° 16' 5.4"N, -9° 1' 2.19"W	21
<i>A. sp.</i>	Nordeste de Espanha	A Coruña	43°22'08"N, 8°24'31"W	14
	Norte de Portugal	Gaia	41°06'01"N, 8°39'39"W	52
	Sul de Portugal	Praia da Luz	37°05'11"N, 8°43'31"W	18
		Olhos de Água	37°05'26"N, 8°10'53"W	7
	Sudeste de Espanha	Tarifa	36°00'28"N, 5°36'20"W	11
	Açores	Santa Maria	6° 58' 14" N, 25° 06' 18"	1
<i>A. fragacea</i>	Nordeste de Espanha	A Coruña	43°22'08"N, 8°24'31"W	8
	Norte Portugal	Gaia	41°06'01"N, 8°39'39"W	15
	Sul Portugal	Portimão	37°06'30"N, 8°31'31"W	13
	Irlanda	Ballyloughane Beach	53° 16' 5.4"N, -9° 1' 2.19"W	1
<i>A. schmidtii</i>	Grécia	Raches	43°22'08"N, 8°24'31"E	23



## Anexo V – Informação de suporte da análise de dados

**Tabela 4.1** – Teste de independência entre a ocorrência de ataque dos acrorhagial e a relação genética entre indivíduos (Teste exato de Fisher).

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)	Probabilidade de ponto
<b>Qui-quadrado de Pearson</b>	,336 <sup>a</sup>	1	0,56	0,679	0,444	—
<b>Correção de continuidade<sup>b</sup></b>	0,02	1	0,89	—	—	—
<b>Razão de verossimilhança</b>	0,34	1	0,56	0,679	0,444	—
<b>Teste Exato de Fisher</b>	—	—	—	0,679	0,444	—
<b>Associação Linear por Linear</b>	,322 <sup>c</sup>	1	0,57	0,679	0,444	0,289
<b>N de Casos Válidos</b>	24	—	—	—	—	—

**Legenda:** **a.** 2 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 3,67; **b.** Computado apenas para uma tabela 2x2; **c.** Para a tabulação cruzada 2x2 e **c.** A estatística padronizada é -,567.

**Tabela 4.2** – Medidas de estatística descritiva obtidas para a frequências dos três comportamentos agonísticos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorhagial).

Descritivos				Estatística	Erro Padrão
	Clone	Média		6,25	,906
Frequência a contacto entre tentáculos	Clone	95% Intervalo de Confiança para Média		Limite inferior	4,32
				Limite superior	8,18
		5% da média aparada			6,00
		Mediana			5,50
		Variância			13,133

		Desvio Padrão		3,624	
		Mínimo		2	
		Máximo		15	
		Intervalo		13	
		Intervalo interquartil		5	
		Assimetria		1,095	,564
		Curtose		,959	1,091
	Não Clone	Média		6,25	1,306
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	3,16	
			Limite superior	9,34	
		5% da média aparada		6,11	
		Mediana		6,00	
		Variância		13,643	
		Desvio Padrão		3,694	
		Mínimo		1	
		Máximo		14	
		Intervalo		13	
		Intervalo interquartil		3	
		Assimetria		1,165	,752
		Curtose		3,198	1,481
<i>Frequência de sobreposição do adversário</i>	Clone	Média		5,13	,851
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	3,31	
			Limite superior	6,94	
		5% da média aparada		4,97	
		Mediana		4,00	
		Variância		11,583	
		Desvio Padrão		3,403	
		Mínimo		0	
		Máximo		13	
		Intervalo		13	
		Intervalo interquartil		4	
		Assimetria		,945	,564
		Curtose		,878	1,091
	Não Clone	Média		3,13	,666
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	1,55	

		Limite superior	4,70	
		5% da média aparada	3,08	
		Mediana	3,00	
		Variância	3,554	
		Desvio Padrão	1,885	
		Mínimo	1	
		Máximo	6	
		Intervalo	5	
		Intervalo interquartil	4	
		Assimetria	,275	,752
		Curtose	-1,483	1,481
<i>Frequência a ocorrência de picada com acrorragi al</i>	Clone	Média	,81	,262
	95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	,25	
		Limite superior	1,37	
	5% da média aparada		,74	
	Mediana		,50	
	Variância		1,096	
	Desvio Padrão		1,047	
	Mínimo		0	
	Máximo		3	
	Intervalo		3	
	Intervalo interquartil		1	
	Assimetria		1,219	,564
	Curtose		,546	1,091
	Não Clone	Média	,88	,441
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	-,17
			Limite superior	1,92
		5% da média aparada		,81
		Mediana		,00
		Variância		1,554
		Desvio Padrão		1,246
		Mínimo		0
		Máximo		3
		Intervalo		3
		Intervalo interquartil		2

Assimetria	,895	,752
Curtose	-1,132	1,481

**Tabela 4.3** – Medidas de estatística descritiva obtidas para a frequências dos três comportamentos agonísticos (contacto entre tentáculos, sobreposição do adversário e ocorrência de picada com acrorragial).

Descriptives				
Clone			Statistic	Std. Error
<i>Duração do contacto entre tentáculos</i>	Clone	Mean	15,14	2,461
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,89
		Upper Bound	20,38	
		5% Trimmed Mean	14,82	
		Median	12,34	
		Variance	96,907	
		Std. Deviation	9,844	
		Minimum	2	
		Maximum	34	
		Range	33	
		Interquartile Range	17	
		Skewness	,634	,564
		Kurtosis	-,723	1,091
	Não Clone	Mean	18,48	4,152
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8,66
		Upper Bound	28,30	
		5% Trimmed Mean	18,12	
		Median	17,75	
		Variance	137,908	
		Std. Deviation	11,743	
		Minimum	2	
		Maximum	41	
		Range	39	
		Interquartile Range	15	
		Skewness	,809	,752
		Kurtosis	1,398	1,481

Clone				Statistic	Std. Error
<i>Duração da sobreposição do adversário</i>	Clone	Mean		10,95	1,831
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7,02	
			Upper Bound	14,88	
		5% Trimmed Mean		10,99	
		Median		9,54	
		Variance		50,290	
		Std. Deviation		7,092	
		Minimum		0	
		Maximum		21	
		Range		21	
		Interquartile Range		8	
		Skewness		-,180	,580
		Kurtosis		-1,041	1,121
	Não Clone	Mean		7,88	2,476
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,82	
			Upper Bound	13,94	
		5% Trimmed Mean		7,56	
		Median		6,44	
		Variance		42,901	
		Std. Deviation		6,550	
		Minimum		1	
		Maximum		21	
		Range		20	
		Interquartile Range		8	
		Skewness		1,391	,794
		Kurtosis		2,306	1,587

Clone				Statistic	Std. Error
<i>Ocorrência de picada</i>	Clone	Mean		1,84	,389
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,92	
			Upper Bound	2,76	
		5% Trimmed Mean		1,86	
		Median		1,76	
		Variance		1,209	
		Std. Deviation		1,100	
		Minimum		0	
		Maximum		3	
		Range		3	
		Interquartile Range		2	
		Skewness		-,115	,752
		Kurtosis		-,706	1,481
	Não Clone	Mean		5,33	1,542
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-1,31	
			Upper Bound	11,97	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		6,72	
		Variance		7,137	
		Std. Deviation		2,672	
		Minimum		2	
		Maximum		7	
		Range		5	
		Interquartile Range		.	
		Skewness		-1,708	1,225
		Kurtosis		.	

**Tabela 4.4** – Análise estatística do tempo de latência da ocorrência de picada do acrorhagial.

**Case Processing Summary**

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
tempo_latencia	clone	7	100,0%	0	0,0%	7	100,0%
	não-clone	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%

**Descriptives**

grupo			Statistic	Std. Error
tempo_latencia	clone	Mean	9,9757	3,77086
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,7488
			Upper Bound	19,2027
		5% Trimmed Mean	9,7113	
		Median	6,0600	
		Variance	99,536	
		Std. Deviation	9,97675	
		Minimum	,12	
		Maximum	24,59	
		Range	24,47	
		Interquartile Range	21,67	
		Skewness	,874	,794
		Kurtosis	-1,079	1,587
	não-clone	Mean	4,5700	,85644
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,8444
			Upper Bound	7,2956
		5% Trimmed Mean	4,6078	
		Median	4,9100	
		Variance	2,934	
		Std. Deviation	1,71287	
		Minimum	2,22	
		Maximum	6,24	
		Range	4,02	
		Interquartile Range	3,20	
		Skewness	-1,058	1,014
		Kurtosis	1,415	2,619