

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

LEONARDO TRESOLDI GONÇALVES

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Temnocephala* BLANCHARD, 1849
(PLATYHELMINTHES, DALYTYPHLOPLANIDA)
EPIBIONTES EM CRUSTÁCEOS**

Porto Alegre

2015

LEONARDO TRESOLDI GONÇALVES

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Temnocephala* BLANCHARD, 1849
(PLATYHELMINTHES, DALYTYPHLOPLANIDA)
EPIBIONTES EM CRUSTÁCEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Bencke Amato

Porto Alegre
Novembro de 2015

**Análise filogenética de *Temnocephala* Blanchard, 1849
(Platyhelminthes, Dalytyphloplanida) epibiontes em crustáceos**

Leonardo Tresoldi Gonçalves

Aprovada em 25/11/2015

Dr.^a Samantha Alves Seixas

Dr.^a Viviane Gularte Tavares dos Santos

Dr.^a Suzana Bencke Amato

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	IX
INTRODUÇÃO	10
Os platelmintos	10
Os temnocefálicos	11
O gênero <i>Temnocephala</i>	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
Considerações preliminares	18
Análise filogenética	19
REFERÊNCIAS	24

ANEXOS

Anexo I. Lista de caracteres

Anexo II. Matriz de caracteres

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Alessandro e Mara, meus maiores exemplos! Obrigado por estarem sempre ao meu lado e por não medirem esforços para que eu vencesse mais esta etapa.

À minha orientadora Suzana Amato, por acreditar no meu potencial, pela confiança e por me orientar não só nesta monografia, mas durante mais da metade de minha graduação. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e entusiasmo pela helmintologia. Muito obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Helmintologia: Cláudia, Carol, Emília, Aline, Moisés, Tiago e Stephanie. Foi muito enriquecedor e prazeroso trabalhar com vocês. Além de todo o aprendizado, sou grato pelas risadas e pelos momentos de descontração.

A todos os amigos que fiz durante a graduação... foram tantos! E aos amigos de fora da Biologia também. A amizade e o apoio de vocês valem muito para mim.

Um agradecimento especial ao Henrique, por sempre estar ao meu lado. Sei que não foi fácil me aturar na reta final desta monografia. Agradeço de coração!

À Samantha Seixas, já que praticamente todo o material utilizado nesta monografia foi proveniente dos seus anos de trabalho com os temnocefálicos.

A todos, muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Árvore filogenética obtida, enraizada em *Diceratocephala boschmai* 20
- Figura 2** – Árvore consenso determinada por Bootstrap 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de Temnocephalida segundo TYLER <i>et al.</i> (2006-2015)	14
Tabela 2 – Espécies utilizadas neste estudo. As informações sobre a distribuição geográfica e sobre os grupos hospedeiros foram retiradas de MARTÍNEZ-AQUINO <i>et al.</i> (2014b)	17

RESUMO

A infraordem Temnocephalida Blanchard, 1849 é composta por platelmintos epibiontes de água doce. Cada espécie de temnocefálide vive sobre uma espécie ou em um grupo de espécies de hospedeiros relacionados filogeneticamente, ou seja, com uma história evolutiva em comum. A maioria tem como hospedeiros crustáceos parastacídeos, e há um consenso de que estes foram, evolutivamente, seus hospedeiros primitivos. O gênero-tipo de Temnocephalidae, *Temnocephala* Blanchard, 1849, ocorre exclusivamente na região Neotropical. Grande parte dos trabalhos com *Temnocephala* incluem descrições de novas espécies e registros em novos grupos e espécies hospedeiras, mas muito pouco se sabe a respeito das relações filogenéticas entre as espécies do gênero. O deste trabalho é propor, através de análise cladística, uma hipótese para as relações de parentesco entre as espécies do gênero *Temnocephala* epibiontes em crustáceos e verificar se estas espécies formam um grupo monofilético. O material estudado pertence à Coleção Helminológica do Departamento de Zoologia da UFRGS. Um total de 15 táxons terminais foram utilizados no presente estudo: oito espécies do gênero *Temnocephala* epibiontes em crustáceos foram incluídas no grupo interno, e como grupos externos foram utilizadas outras espécies do gênero *Temnocephala* epibiontes em moluscos e quelônios. As árvores foram enraizadas em *Diceratocephala boschmai* Baer, 1953. Foram considerados na análise filogenética um total de 44 caracteres morfológicos, considerados como de igual peso. Os dados foram submetidos a uma análise de parcimônia por busca heurística. A análise resultou em uma única árvore mais parcimoniosa, com 97 passos, índice de consistência de 52% e índice de retenção de 62%. A árvore mostra que os representantes do gênero *Temnocephala* epibiontes em crustáceos não formam um grupo monofilético. Ou seja, durante a história evolutiva do grupo, a diversificação dessas espécies ocorreu de forma independente. A partir de um ancestral com hospedeiro parastacídeo houve, evolutivamente, a conquista de outros grupos hospedeiros e o retorno para hospedeiros parastacídeos, visto que existem espécies atuais epibiontes em crustáceos desta família. A análise filogenética mostrou também que as espécies epibiontes em quelônios formam um grupo monofilético. As espécies epibiontes em moluscos também ficaram reunidas em um clado, conforme outros estudos já haviam mostrado, mas um próximo passo para verificar a monofilia deste grupo de espécies é incluir nas análises a espécie *Temnocephala euryhalina* Seixas, Amato & Amato, 2015, até agora a única espécie do gênero epibionte em moluscos neritídeos e de hábito eurialino.

INTRODUÇÃO

Os platelmintos

O filo Platyhelminthes Gegenbaur, 1859 inclui espécies de vida livre e parasitas. São animais de simetria bilateral, triploblásticos, acelomados, sem ânus, com baixo nível de cefalização, geralmente hermafroditas e de corpo achatado dorsoventralmente (LITTLEWOOD, 2006).

A delimitação do filo Platyhelminthes já foi considerada pouco questionável (NIELSEN, 1995). Atualmente, análises moleculares mostram que se trata de um grupo polifilético, mas mesmo assim a classificação interna do filo continua problemática (BOLL *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2015). A sistemática filogenética dos platelmintos é, por isso, um dos campos de pesquisa mais ativos em biologia de invertebrados nos dias de hoje, com inúmeros pesquisadores buscando maneiras de solucionar incógnitas na história evolutiva do grupo (ROBERTS & JANOVY JR., 2009).

Tradicionalmente, Platyhelminthes era subdividido em quatro classes: Turbellaria, Monogenea, Trematoda e Cestoda. Turbelários seriam os platelmintos de vida livre, enquanto as outras classes agrupariam espécies parasitas. Turbellaria é hoje considerada uma classe inválida, pois é um grupo polifilético. O termo "turbelário" ainda é utilizado para se referir aos platelmintos da extinta classe, e o táxon "Turbellaria" deve ser escrito entre aspas devido à sua polifilia. Nem todos os turbelários são de vida livre (TYLER *et al.*, 2006-2015).

O presente trabalho utilizará a proposta de classificação de RUGGIERO *et al.* (2015) até o nível de ordem. Níveis taxonômicos inferiores seguirão a classificação de TYLER *et al.* (2006-2015).

Os temnocefálidos

A infraclasse Rhabdocoela Ehrenberg, 1831 é um dos mais diversos grupos de platelmintos de vida livre, apresentando cerca de 1.530 espécies distribuídas em três ordens: Dalytyphloplanida Williems *et al.*, 2006, Endoaxonemata Jondelius & Thollessen, 1993 e Kalyptorhynchia Graff, 1905 (VAN STEENKISTE *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2015). Estudos moleculares dão suporte à monofilia da infraclasse e de suas ordens, entretanto não são claros os seus limites taxonômicos do ponto de vista morfológico (VAN STEENKISTE *et al.*, 2013).

Dentro de Dalytyphloplanida está incluída a infraordem Temnocephalida Blanchard, 1849, composta por organismos epibiontes de água doce. Os temnocefálidos apresentam uma morfologia muito distinta quando comparados aos demais platelmintos de vida livre: a epiderme não possui cílios locomotores e está organizada em placas sinciciais; além disso, a maioria das espécies apresenta tentáculos anteriores e um disco adesivo posterior para fixação no hospedeiro (JOFFE *et al.*, 1998).

Em Temnocephalida se distinguem duas superfamílias: Scutarielloidea Baer, 1953, e Temnocephaloidea Baer, 1953. A primeira superfamília contém uma única família, Scutariellidae, que inclui os temnocefálidos com boca anterior terminal e faringe tubular. Seus representantes são encontrados na Eurásia e, por isso, são chamados de “grupo do norte”. A segunda superfamília é característica do hemisfério sul (“grupo do sul”) e é constituído por animais de boca ventral e faringe globosa, distribuídos em três famílias: Actinodactylellidae, Diceratocephalidae e Temnocephalidae, sendo esta última a mais diversa (CANNON & JOFFE, 2001; TYLER *et al.*, 2006-2015; VOLONTERIO, 2007) (Tabela 1).

Cada espécie de temnocefálido vive sobre uma espécie ou em um grupo de espécies de hospedeiros relacionados filogeneticamente, ou seja, com uma história evolutiva em comum (MARTÍNEZ-AQUINO, 2014a). A maioria tem como hospedeiros crustáceos decápodos das famílias Parastacidae e Pseudotelphusidae, e há um consenso de que os primeiros foram seus

hospedeiros primitivos (BAER, 1931, 1935; CANNON & JOFFE, 2001). Em termos evolutivos, esta especificidade pode ser interpretada como os primeiros passos da transição de um modo de vida epibionte a um modo de vida parasitário (LITTLEWOOD *et al.*, 2001). Os temnocefálicos são capazes de sobreviver por períodos de até quatro meses em condições experimentais sem seu hospedeiro (HICKMAN, 1967).

Na literatura existem algumas propostas de filogenia das famílias de Temnocephalida com base em evidências moleculares, morfológicas e biogeográficas (WILLIAMS, 1986; JOFFE *et al.*, 1998; CANNON & JOFFE, 2001). Não há, entretanto, um consenso a respeito das hipóteses levantadas.

O gênero *Temnocephala*

O gênero-tipo da família Temnocephalidae, *Temnocephala* Blanchard, 1849, ocorre exclusivamente na região Neotropical e, das 33 espécies válidas descritas, 18 são encontradas no Brasil (TYLER *et al.*, 2006-2015; MARTÍNEZ-AQUINO *et al.*, 2014a; PONCE DE LEÓN *et al.*, 2015; SEIXAS *et al.*, 2015). Até o início do século XXI o gênero também compreendia espécies australasianas, hoje agrupadas no gênero *Temnosewellia* Damborenea & Cannon, 2001.

São consideradas autapomorfias de *Temnocephala* os ocelos com pigmentação vermelha, as quatro placas sinciciais epidérmicas e os poros excretores localizados dentro dos limites das placas sinciciais dorsolaterais pós-tentaculares "excretoras" (PSDPEs) (DAMBORENEA & CANNON, 2001). As espécies do gênero *Temnocephala* são epibiontes em crustáceos, insetos, moluscos e quelônios de água doce (MARTÍNEZ-AQUINO *et al.*, 2014b).

Grande parte dos trabalhos com o gênero *Temnocephala* incluem descrições de novas espécies bem como registros em novos grupos e espécies hospedeiras. Com o passar do tempo, formou-se uma extensa base de informação sobre a diversidade destes helmintos.

Entretanto, muito pouco se sabe a respeito das relações filogenéticas entre as espécies de *Temnocephala*.

VOLONTERIO (2007) realizou um estudo filogenético clássico com espécies de *Temnocephala*, dando ênfase àquelas epibiontes sobre moluscos da família Ampulariidae, as quais concluiu formarem um grupo monofilético. SEIXAS (2013) foi pioneira ao utilizar dados moleculares para levantar hipóteses de parentesco dentro do gênero, mas a falta de informações técnicas sobre este tipo de análise dentro do grupo levou a resultados não conclusivos.

O objetivo geral deste trabalho é propor, através de análise cladística, uma hipótese para as relações de parentesco entre as espécies do gênero *Temnocephala* epibiontes em crustáceos. O objetivo específico é verificar se espécies de *Temnocephala* epibiontes em crustáceos formam um grupo monofilético.

Tabela 1. Classificação de Temnocephalida segundo TYLER *et al.* (2006-2015). Os valores entre parênteses indicam o número de espécies válidas descritas.

SCUTARIELLOIDEA Baer, 1953

Família Scutariellidae Annandale, 1912

Subfamília Paracaridinicolinae Baer, 1953

Paracaridinicola Baer, 1953 (1)

Subfamília Scutariellinae Baer, 1953

Bubalocerus Matjasic, 1958 (2)

Caridinicola Annandale, 1912 (3)

Monodiscus Plate, 1914 (2)

Scutariella Mrazek, 1907 (4)

Stygodyticola Matjasic, 1958 (1)

Subtelsonia Matjasic, 1958 (1)

Troglocaridicola Matjasic, 1958 (10)

TEMNOCEPHALOIDEA Baer, 1953

Família Actinodactylellidae Benham, 1901

Actinodactylella Haswell, 1893 (1)

Família Diceratocephalidae Joffe, Cannon, & Schockaert, 1998

Decadidymus Cannon, 1991 (1)

Diceratocephala Baer, 1953 (1)

Família Temnocephalidae Monticelli, 1899

Achenella Cannon, 1993 (3)

Craniocephala Monticelli, 1905 (1)

Dactylocephala Monticelli, 1899 (1)

Didymorchis Haswell, 1900 (4)

Notodactylus Baer, 1953 (1)

Temnocephala Blanchard, 1849 (31)

Temnohaswellia Pereira & Cuocolo, 1941 (15)

Temnomonticellia Pereira & Cuocolo, 1941 (3)

Temnosewellia Damborenea & Cannon, 2001 (52)

Subfamília Craspedellinae Baer, 1931

Craspedella Haswell, 1893 (9)

Gelasinella Sewell & Cannon, 1998 (2)

Heptacraspedella Cannon & Sewell, 1995 (1)

Zygopella Cannon & Sewell, 1995 (3)

MATERIAL E MÉTODOS

O material estudado pertence à Coleção Helminológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os espécimes encontravam-se fixados, comprimidos e montados em lâminas permanentes. Medidas foram obtidas a partir de uma lente ocular com retículo milimetrado acoplada ao microscópio óptico. Algumas das informações foram retiradas das descrições originais das espécies. A terminologia aplicada neste trabalho segue a utilizada por SEIXAS (2013).

Este trabalho teve como base a dissertação de mestrado de VOLONTERIO (2007). Para a construção da matriz de dados, foram utilizados 15 táxons terminais (Tabela 2). As espécies foram selecionadas com base na disponibilidade do material. O grupo interno foi composto por oito espécies do gênero *Temnocephala* cujos hospedeiros são crustáceos. Como grupos externos, foram utilizadas outras espécies do gênero epibiontes em moluscos e quelônios. As árvores foram enraizadas em *Diceratocephala boschmai* Baer, 1953, uma das duas espécies que compõem a família Diceratocephalidae.

Foram considerados na análise filogenética um total de 44 caracteres. Todos estes caracteres foram propostos e amplamente discutidos em VOLONTERIO (2007) e, por esse motivo, serão apenas citados neste trabalho (Anexo I).

A polarização dos caracteres seguiu a do trabalho de VOLONTERIO (2007). Foram codificados como "?" os caracteres faltantes ou que não puderam ser observados, e como "-" os caracteres não aplicáveis.

A construção da matriz foi desenvolvida no programa WinClada 1.00.08 (NIXON, 2002). O mesmo software foi utilizado para a edição do cladograma resultante, para a otimização dos caracteres (otimização ambígua) e para o cálculo dos índices de consistência (IC) e de retenção (IR).

A busca pela árvore mais parcimoniosa foi realizada no programa TNT (GOLOBOFF *et al.*, 2008). Os caracteres foram considerados não ordenados, não aditivos e de igual peso. Os cladogramas foram gerados por meio de análises heurísticas (comando *Traditional search*), com sequências de adições ao acaso, retenção de 100 árvores a cada etapa de adição e 10.000 replicações. Para o cálculo do suporte dos ramos realizou-se Bootstrap (busca heurística, 1.000 repetições).

Tabela 2. Espécies utilizadas neste estudo. As informações sobre a distribuição geográfica e sobre os grupos hospedeiros foram retiradas de MARTÍNEZ-AQUINO *et al.* (2014b).

Espécie	Distribuição Geográfica	Hospedeiros
Grupo Interno		
<i>Temnocephala axenos</i> Monticelli, 1899	Brasil, Argentina e Uruguai	Crustacea (Aeglidae e Parastacidae)
<i>Temnocephala cyanoglandula</i> Amato, Amato & Daudt, 2003	Brasil	Crustacea (Aeglidae)
<i>Temnocephala longivaginata</i> Seixas, Amato & Amato, 2011	Brasil	Crustacea (Trichodactylidae)
<i>Temnocephala lutzi</i> Monticelli, 1913	Brasil e Argentina	Crustacea (Pseudotelphusidae e Trichodactylidae)
<i>Temnocephala mertoni</i> Volonterio, 2007	Uruguai	Crustacea (Aeglidae)
<i>Temnocephala pignalberiae</i> Dioni, 1967	Brasil e Argentina	Crustacea (Trichodactylidae)
<i>Temnocephala talicei</i> Dioni, 1967	Argentina, Uruguai e Paraguai	Crustacea (Aeglidae)
<i>Temnocephala trapeziformis</i> Amato, Amato & Seixas 2006	Brasil	Crustacea (Trichodactylidae)
Grupo Externo		
<i>Temnocephala brevicornis</i> Monticelli, 1889	Brasil, Uruguai, Argentina, Venezuela e El Salvador	Testudines
<i>Temnocephala cuocoloi</i> Volonterio, 2010	Uruguai	Testudines
<i>Temnocephala haswelli</i> Ponce de León, 1989	Brasil e Uruguai	Mollusca
<i>Temnocephala iheringi</i> Haswell, 1893	Brasil, Argentina e Uruguai	Mollusca
<i>Temnocephala pereirai</i> Volonterio, 2010	Uruguai	Testudines
<i>Temnocephala rochensis</i> Ponce de León, 1979	Brasil e Uruguai	Mollusca
<i>Diceratocephala boschmai</i> Baer, 1953	Austrália	Crustacea (Parastacidae)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de revisão bibliográfica e desenvolvimento desta monografia, algumas dificuldades foram encontradas. Portanto, antes de serem apresentados e discutidos os resultados da análise filogenética, serão brevemente abordados aspectos históricos sobre os estudos realizados com o grupo.

Considerações preliminares

Os temnocefálidos são animais de pouco interesse econômico, e por isso existem poucos grupos de pesquisa ativos trabalhando com estes helmintos. Sabe-se que a quantidade de estudo sobre um determinado grupo taxonômico influencia, diretamente, o conhecimento sobre a sua diversidade (SEIXAS, 2013). Se considerarmos que, além disso, existem historicamente uma série de hiatos nos estudos dos temnocefálidos, podemos supor que a diversidade deste grupo é consideravelmente maior do que a conhecida.

A descrição taxonômica dos temnocéfalos era tradicionalmente realizada utilizando-se aspectos de sua morfologia externa. Com o tempo surgiram técnicas de coloração histoquímica que auxiliaram na visualização das estruturas internas. Em meados dos anos 2000, novas metodologias para fazer a diferenciação específica dentro do gênero *Temnocephala* foram propostas: a utilização de microscopia óptica com contraste diferencial de interferência com prismas de Nomarski para a visualização do cirro montado em meio 'de Faure' e a impregnação por prata ou fixação em formalina 10% tamponada à 90°C para visualização das placas sinciciais dorsolaterais pós-tentaculares "excretoras" (PSDPEs) (JOFFE & CANNON, 1998; DAMBORENEA & CANNON, 2001; AMATO *et al.*, 2003).

Este avanço metodológico foi fundamental para descrições taxonômicas mais completas e, conseqüentemente, permitiu a observação de caracteres com grande valor taxonômico desconsiderados até então. Revisando a literatura, verifica-se que mesmo

descrições recentes de novas espécies dos outros gêneros da família Temnocephalidae não seguem estas técnicas mais recentes, dificultando muito a diagnose das espécies e até mesmo estudos filogenéticos como esta monografia.

É muito importante que sejam consideradas em uma análise filogenética envolvendo *Temnocephala*, por exemplo, espécies do gênero *Temnosewellia*, pois são dois grupos de certa semelhança morfológica que certamente possuem um ancestral comum exclusivo. As publicações envolvendo espécies do gênero australiano, no entanto, possuem uma baixa quantidade de informações quando comparadas aos estudos com o gênero neotropical. Faz-se necessário uma atualização nas descrições das espécies do gênero *Temnosewellia*, ainda mais se considerarmos que é o gênero mais diverso dentro de Temnocephalida. Outros gêneros de Temnocephalida merecem esta mesma atenção.

Além da questão taxonômica, estudos de filogenia molecular dentro de Temnocephalida são escassos, e para o gênero *Temnocephala* estes estudos são praticamente inexistentes. Embora não se possa desconsiderar a importância da morfologia para análises filogenéticas, é muito provável que o uso integrado de dados genéticos e morfológicos possa fornecer subsídios mais consistentes na delimitação de espécies (BUENO-SILVA, 2012) e no estudo de suas relações de parentesco. Este tipo de abordagem é denominado “taxonomia integrativa” e possui potencial de trazer resultados muito satisfatórios no estudo dos temnocefálicos, assim como já trouxe para outros grupos de turbelários (SLUYS *et al.*, 2013; STOCCHINO *et al.*, 2013).

Análise filogenética

A análise resultou em uma única árvore mais parcimoniosa, com 97 passos, índice de consistência de 52% e índice de retenção de 62% (Fig. 1). A árvore mostra que os

representantes do gênero *Temnocephala* epibiontes em crustáceos não formam um grupo monofilético.

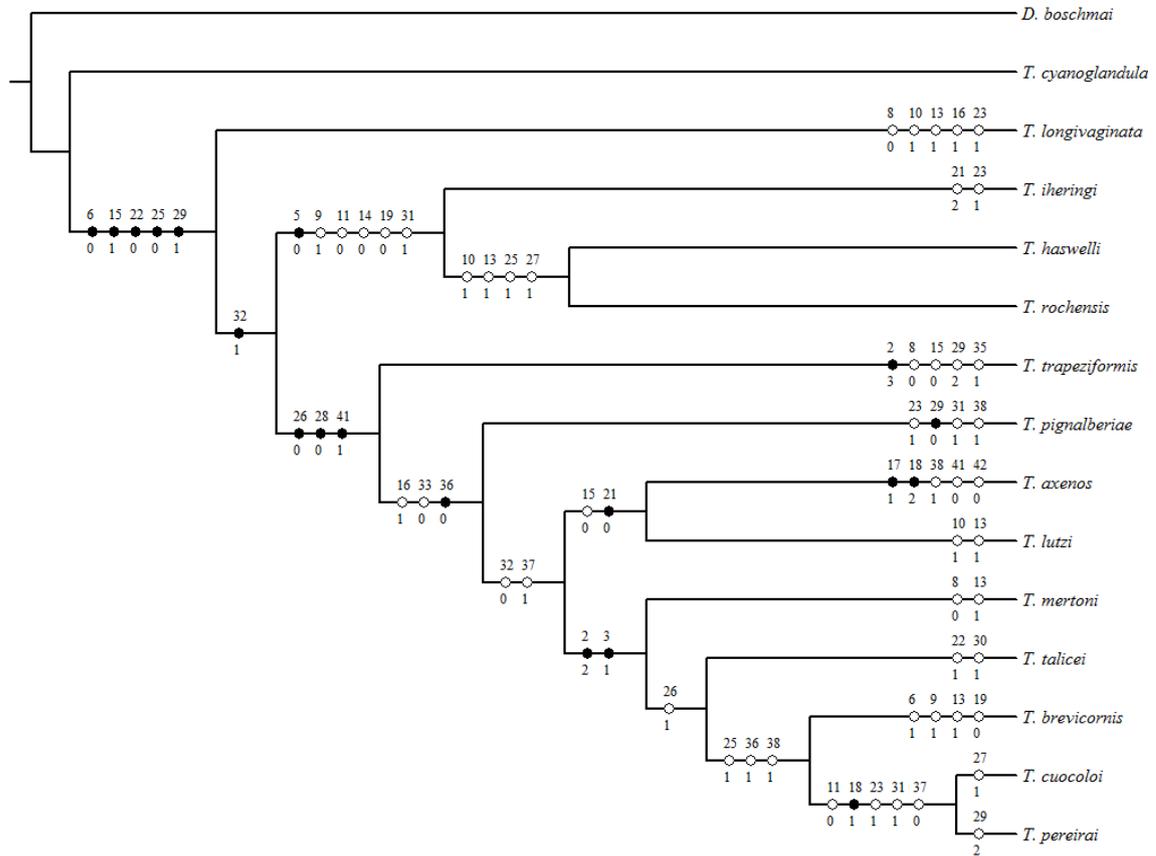


Figura 1. Árvore filogenética obtida, enraizada em *Diceratocephala boschmai*. Número de passos: 97; IC = 52%; IR = 62%. Os círculos pretos indicam sinapomorfias exclusivas e os círculos brancos indicam sinapomorfias homoplásticas. O número acima de cada círculo corresponde ao caracter e o número abaixo corresponde ao estado.

O cladograma obtido mostra *T. cyanoglandula* como grupo irmão de todas as outras espécies do gênero *Temnocephala* utilizadas no estudo (Fig. 1). Este grande grupo formado pelas outras espécies apresentou cinco sinapomorfias exclusivas: ocelos não melanizados (6), região glandular lateral ao intestino ampla (15.1), contorno dos testículos liso a levemente lobado (22), cirro com menos de 200 μm de comprimento (25) e introvert com dez ou menos

fileiras de espinhos (29.1). O elevado número de sinapomorfias exclusivas fez com que este grande grupo exibisse um suporte relativamente alto (66%).

Conforme mostrado e discutido por VOLONTERIO (2007), as espécies epibiontes em moluscos ampulariídeos (*T. iheringi*, *T. haswelli* e *T. rochensis*) formaram um grupo monofilético (Fig. 1), com suporte de 79% (Fig. 2). Dentro do mesmo, *T. iheringi* teve apoio consistente (73%) como grupo irmão de *T. haswelli* e *T. rochensis* (Fig. 2). As análises moleculares realizadas por SEIXAS (2013) também mostraram *T. haswelli* e *T. rochensis* reunidos em clados próximos – segundo a autora, são espécies que compartilham o mesmo grupo hospedeiro e, dessa forma, provavelmente são próximas geneticamente.

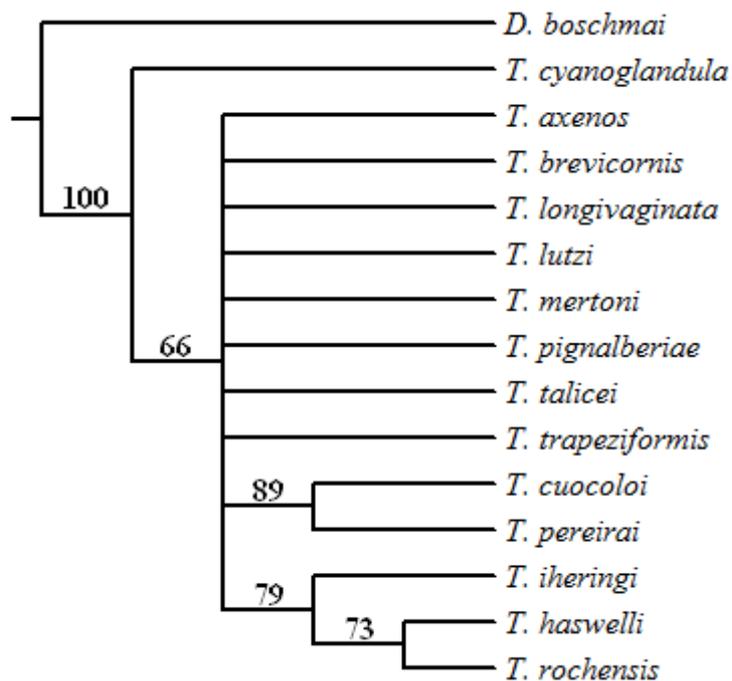


Figura 2. Árvore consenso determinada por bootstrap. Os números representam o valor de apoio aos ramos. São exibidos apenas valores superiores a 50%.

Recentemente foi descrita a espécie *Temnocephala euryhalina* Seixas, Amato & Amato, 2015, até agora a única espécie do gênero epibionte em moluscos neritídeos (SEIXAS

et al., 2015). *T. euryhalina* não foi incluído na filogenia porque o trabalho com a sua descrição foi publicado após a conclusão das análises filogenéticas feitas no presente estudo. Utilizar a espécie em estudos semelhantes, entretanto, seria um interessante passo para verificar a monofilia do grupo de temnocéfalos epibiontes em moluscos, já que o grupo monofilético formado pelas três espécies deste estudo possui apenas representantes epibiontes em ampulariídeos. *Temnocephala euryhalina* também é a única espécie do gênero até o momento encontrada em ambientes com maior salinidade.

As espécies *T. brevicornis*, *T. cuocoloi* e *T. pereirai*, todas epibiontes em quelônios, ficaram reunidas (Fig. 1). No entanto, o grupo formado não exibiu nenhuma sinapomorfia exclusiva, mas sim três sinapomorfias homoplásticas (ou seja, que surgiram independentemente): cirro com mais de 200 μm de comprimento (25.1), esfíncter proximal da vagina com diâmetro maior que 60 μm (36.1) e esfíncter distal da vagina presente (38.1). Atualmente, estas são as três únicas espécies válidas registradas em hospedeiros vertebrados, o que poderia explicar a sua suposta monofilia.

Ainda dentro do clado das espécies epibiontes em quelônios, formou-se uma dicotomia reunindo *T. pereirai* e *T. cuocoloi*, fortemente suportada de acordo com os valores de bootstrap (Fig. 2). Esta dicotomia apresentou como sinapomorfia exclusiva os paranefrócitos extratesticulares (18.1), além de quatro sinapomorfias homoplásticas. Ambas as espécies são endêmicas do Uruguai (Tabela 2) – embora *T. brevicornis* também ocorra no país, existem registros da espécie por toda a América do Sul. Esta proximidade geográfica e o compartilhamento do grupo hospedeiro podem ser uma justificativa plausível para a sua proximidade filogenética.

Os grupos formados com as espécies epibiontes em crustáceos no cladograma não reúnem sequer espécies de hospedeiros da mesma família. Isso mostra que, durante a história evolutiva do grupo, a diversificação ocorreu de forma independente. Sabe-se que o ancestral

do gênero *Temnocephala* provavelmente tinha um hospedeiro parastacídeo (CANNON & JOFFE, 2001). A partir desse ancestral houve, no decorrer da evolução do grupo, a conquista de outros grupos hospedeiros (crustáceos não parastacídeos, moluscos, quelônios, entre outros). Além disso, houve também o retorno para hospedeiros parastacídeos, visto que existem várias espécies atuais epibiontes em crustáceos desta família.

REFERÊNCIAS

- AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B.; DAUDT, L. C. C. New species of *Temnocephala* Banchard (Platyhelminthes, Temnocephalida) ectosymbiont on *Aegla serrana* Buckup & Rossi (Crustacea, Anomura) from southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 3, p. 493-500, 2003.
- BAER, J. G. Étude monographique du groupe des temnocéphales. **Bulletin Biologique de la France et de la Belgique**, v. 1, p. 1-67, 1931.
- BAER, J. G. Zoological results of the Dutch New Guinea expedition 1939. No. 4. Temnocephales. **Zoologische Mededelingen**, v. 32, p. 119-143, 1935.
- BOLL, P. K.; ROSSI, I.; AMARAL, S. V.; OLIVEIRA, S. M.; MÜLLER, E. S.; LEMOS, V. S.; LEAL-ZANCHET, A. M. Platyhelminthes ou apenas semelhantes a Platyhelminthes? Relações filogenéticas dos principais grupos de turbelários. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 1, p. 41-52, jan.-abr. 2013.
- BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia, Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 157-163, jul.-dez. 2012.
- CANNON, L. R. G.; JOFFE, I. V. Temnocephalida. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (Eds.). **Interrelationships of the Platyhelminthes**. Londres: Taylor and Francis, 2001. p. 83-91.
- DAMBORENEA, M. C.; CANNON, L. R. G. On neotropical Temnocephala (Platyhelminthes). **Journal of Natural History**, v. 35, n. 8, p. 1103-1118, 2001.
- GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, p. 1-13, 2008.
- HICKMAN, V. V. Tasmanian Temnocephalidea. **The Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania**, v. 101, p. 227-250, 1967.

- JOFFE, B.I.; CANNON, L. R. G.; SCHOCKAERT, E. R. On the phylogeny of families and genera within the Temnocephalida. **Hydrobiologia**, v. 383, p. 263-268, 1998.
- JOFFE, B.I.; CANNON, L. R. G. The organization and evolution of the mosaic of the epidermal syncytia in the Temnocephalida (Plathelminthes: Neodermata). **Zoologischer Anzeiger**, v. 237, p. 1-14, 1998.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; CRIBB, T. H.; OLSON, P. D.; BRAY, R. A. Platyhelminth phylogenetics - a key to understanding parasitism? **Belgian Journal of Zoology**, v. 131, p. 35-46, 2001.
- LITTLEWOOD, D. T. J. The Evolution of Parasitism in Flatworms. In: MAULE, A. G.; MARKS, N. J. (Eds.). **Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology**. Wallingford: CABI, 2006. p. 1-36.
- MARTÍNEZ AQUINO, A.; BRUSA, F.; DAMBORENEA, M. C. Los temnocéfalos: Simbiontes dulceacuícolas. **Biodiversitas**, v. 116, p. 12-16, 2014a.
- MARTINÉZ-AQUINO, A.; BRUSA, F.; DAMBORENEA, M. C. Checklist of freshwater symbiotic temnocephalans (Platyhelminthes, Rhabditophora, Temnocephalida) from the Neotropics. **Zoosystematics and Evolution**, v. 90, n. 2, p. 147-162, 2014b.
- NIELSEN, C. **Animal evolution: interrelationships of the living phyla**. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- NIXON, K. C. **WinClada** ver. 1.00.08. Ithaca, publicado pelo autor. 2002.
- PONCE DE LEÓN, R.; VERA, B. B.; VOLONTERIO, O. Description of a new *Temnocephala* species (Platyhelminthes) from the Southern Neotropical Region. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 4, p. 424-428, ago. 2015.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY JR., J. **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. Boston: The McGraw-Hill Companies, 2001.

- RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R. C. *et al.* A higher level classification of all living organisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, abr. 2015. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em 5 nov. 2015.
- SEIXAS, S. A. **O gênero *Temnocephala* Blanchard, 1849 (Platyhelminthes, Temnocephalida) no Brasil.** 2013. 239 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013.
- SEIXAS, S. A.; AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. A new species of *Temnocephala* (Platyhelminthes, Temnocephalida) ectosymbiont on *Neritina zebra* (Mollusca, Neritidae) from the Brazilian Amazonia. **Neotropical Helminthology**, v. 9, n. 1, p. 41-53, jan.-jun. 2015.
- SLUYS, R.; SOLÀ, E.; GRITZALIS, K.; VILA-FARRÉ, M.; MATEOS, E.; RIUTORT, M. Integrative delineation of species of Mediterranean freshwater planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesiidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 523-247, 2013.
- STOCCHINO, G. A.; SLUYS, R.; DERI, P.; MANCONI, R. Integrative taxonomy of a new species of planarian from the Lake Ohrid basin, including an analysis of biogeographical patterns in freshwater triclads from the Ohrid region (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesiidae). **ZooKeys**, v. 313, p. 25-43, 2013.
- TYLER, S.; SCHILLING, S.; HOOGE, M.; BUSH, L. F. Turbellarian taxonomic database. Versão 1.8. 2006-2015. Disponível em: <turbellaria.umaine.edu>. Acesso em: 13 mar. 2015.
- VAN STEENKISTE, N.; TESSENS, B.; WILLEMS, W.; BACKELJAU, T.; JONDELIUS, U.; ARTOIS, T. A comprehensive molecular phylogeny of Dalytyphloplanida (Platyhelminthes: Rhabdocoela) reveals multiple escapes from the marine environment and origins of

symbiotic relationships. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, mar. 2013. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em 2 fev. 2015.

VOLONTERIO, O. **Análisis filogenético de las especies de *Temnocephala* Blanchard, 1849 (Platyhelminthes, Temnocephalida) del Uruguay, con énfasis en la evaluación de la monofilia de las especies epizoicas de Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda)**. 2007. 279 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

WILLIAMS, J. B. Phylogenetic relationships of the Temnocephaloidea (Platyhelminthes). **Hydrobiologia**, v. 132, p. 59-67, 1986.

ANEXOS

Anexo I

Lista de caracteres

Descrição dos 44 caracteres utilizados na análise filogenética, retirados de VOLONTERIO (2007) e traduzidos livremente do Espanhol para o Português.

0. *Apêndices anteriores*: (0) dois apêndices tipo tentáculo, sem musculatura axial; (1) cinco tentáculos verdadeiros.
1. *Cílios locomotores*: (0) ausentes; (1) presentes.
2. *Formato das placas sinciciais dorsolaterais pós-tentaculares*: (0) reniformes ou em formato de “sola de sapato”; (1) elípticas; (2) alongadas; (3) trapeziformes. O estado 3 não está presente em VOLONTERIO (2007), mas foi adicionado devido ao formato característico das placas sinciciais dorsolaterais pós-tentaculares de *Temnocephala trapeziformis*.
3. *Extensão posterior do sincício pós-tentacular*: (0) não alcança a base da faringe; (1) alcança ou ultrapassa a base da faringe.
4. *Localização dos poros excretores*: (0) externos ao sincício pós-tentacular; (1) dentro dos limites do sincício pós-tentacular
5. *Posição do nefridióporo dentro dos limites das placas sinciciais dorsolaterais pós-tentaculares*: (0) centralizado; (1) excêntrico.
6. *Pigmentação dos ocelos*: (0) não melanizados; (1) melanizados.
7. *Disco adesivo verdadeiro*: (0) ausente; (1) presente.
8. *Diâmetro do disco adesivo*: (0) menor ou aproximadamente igual ao da faringe; (1) maior do que o da faringe.
9. *Cobertura do disco adesivo pelo corpo*: (0) total; (1) parcial.
10. *Posição do poro genital*: (0) na região dos testículos anteriores ou anterior à esta região; (1) entre os testículos anteriores e posteriores; (2) posterior aos testículos.
11. *Glândulas de Haswell*: (0) inconspícuas; (1) conspícuas.
12. *Distribuição da musculatura circular da faringe*: (0) distribuição homogênea em toda a extensão da faringe; (1) distribuída formando dois esfíncteres, um na porção anterior e outro na porção posterior.

- 13.** *Distância entre a faringe e a base dos tentáculos:* (0) menor ou igual à largura do parênquima lateral à faringe; (1) maior que a largura do parênquima lateral à faringe.
- 14.** *Septos intestinais:* (0) ausentes; (1) presentes.
- 15.** *Largura da região glandular lateral ao intestino:* (0) estreita, não ocupa toda a área do parênquima lateral ao intestino; (1) ampla, ocupa toda a área do parênquima lateral ao intestino.
- 16.** *Paranefrócitos:* (0) ausentes; (1) presentes.
- 17.** *Número de paranefrócitos:* (0) dois; (1) quatro.
- 18.** *Localização dos paranefrócitos:* (0) intratesticulares; (1) extratesticulares; (2) intra e extratesticulares.
- 19.** *Distribuição das glândulas do disco adesivo:* (0) não se estendem muito além da área testicular; (1) se estendem posteriormente à área testicular.
- 20.** *Número de testículos:* (0) dois; (1) quatro.
- 21.** *Posição dos testículos anteriores em relação ao intestino:* (0) lateral; (1) posterolateral; (2) posterior.
- 22.** *Contorno dos testículos:* (0) liso a levemente lobado; (1) irregular.
- 23.** *Formato da vesícula seminal:* (0) piriforme; (1) alongada.
- 24.** *Saco ejaculador acessório:* (0) ausente; (1) presente.
- 25.** *Comprimento total do cirro:* (0) curto, menor que 200 μm ; (1) longo, maior que 200 μm .
- 26.** *Largura da base do cirro:* (0) menor que 58 μm ; (1) maior que 58 μm .
- 27.** *Formato do cirro:* (0) reto a levemente curvado; (1) fortemente curvado.
- 28.** *Largura máxima de inflação do introvert:* (0) menor que 20 μm ; (1) maior ou igual a 20 μm .
- 29.** *Número de fileiras de espinhos no introvert:* (0) ausentes; (1) 10 ou menos; (2) mais de 14.
- 30.** *Disposição dos espinhos no introvert:* (0) presentes apenas na porção distal; (1) presentes em todo o *introvert*.

- 31.** *Posição da vesícula resorbens:* (0) mediana ou paramediana; (1) lateral, à direita do corpo.
- 32.** *Receptáculos seminais conspícuos, de parede espessa:* (0) ausentes; (1) presentes.
- 33.** *Musculatura da parede da vagina:* (0) pouco desenvolvida; (1) muito desenvolvida.
- 34.** *Esfíncter proximal da vagina:* (0) ausente; (1) presente.
- 35.** *Espessura do esfíncter proximal da vagina:* (0) menor que 60 μm ; (1) maior que 60 μm .
- 36.** *Diâmetro do esfíncter proximal da vagina:* (0) menor que 60 μm ; (1) maior que 60 μm .
- 37.** *Simetria do esfíncter proximal da vagina:* (0) simétrico a levemente assimétrico; (1) marcadamente assimétrico.
- 38.** *Esfíncter distal da vagina:* (0) ausente; (1) presente.
- 39.** *Estruturas esclerosadas na porção distal da vagina:* (0) ausentes; (1) presentes.
- 40.** *Disposição das glândulas vitelogênicas:* (0) rodeiam completamente o intestino; (1) se estendem apenas dorsalmente ao intestino.
- 41.** *Posição do filamento do ovo:* (0) polar a levemente subpolar; (1) claramente subpolar.
- 42.** *Tamanho do filamento do ovo:* (0) curto; (1) médio; (2) longo.
- 43.** *Disposição das placas operculares do ovo:* (0) perpendiculares ao eixo longitudinal do ovo; (1) oblíquas em relação ao eixo longitudinal do ovo.

Anexo II

Matriz de caracteres

	0										1										2										3										4			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3
<i>D. boschmai</i>	0	1	0	?	0	-	1	0	-	-	2	-	0	-	0	0	0	-	-	1	0	-	1	0	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	-	-	-	0	1	1	0	0	0
<i>T. axenos</i>	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>T. brevicornis</i>	1	0	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	?	1	1	0	0	?	0	0	?	0	1	?	1	1	1	0	?	?	?	?
<i>T. cuocoloi</i>	1	0	?	?	1	?	0	1	1	0	0,1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	2	1
<i>T. cyanoglandula</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	-	-	1	1	2	1	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	?	?	0
<i>T. haswelli</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	-	-	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0
<i>T. iheringi</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	-	-	0	1	2	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0
<i>T. longivaginata</i>	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	?	?	?
<i>T. lutzi</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	0,1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>T. mertoni</i>	1	0	2	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0,1	1	1	0	0	1	1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>T. pereirai</i>	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	0,1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0,1	1	0	1	1	0	0	2	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	2	1
<i>T. pignalberiae</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	?	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	?	0	1	0	0	0	0	0	0	-	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	?
<i>T. rochensis</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	-	-	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0
<i>T. talicei</i>	1	0	2	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0,1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>T. trapeziformis</i>	1	0	3	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	-	-	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	?