Lucas Bassi Costa

Influência das abordagens metodológicas na reconstrução filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).

Assis

2018

LUCAS BASSI COSTA

INFLUÊNCIA DAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS NA RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA DE CERIANTHARIA (CNIDARIA, ANTHOZOA)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização da diversidade biológica).

Orientador(a): Dr. Sérgio Nascimento Stampar

Co-Orientador(a): Dr. Maximiliano Maronna

Bolsista: CAPES

Assis

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

C837r

Costa, Lucas Bassi
Influência das abordagens metodológicas na reconstrução filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa) / Lucas Bassi Costa. Assis, 2018.
48 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. Sérgio Nascimento Stampar
Coorientador: Dr. Maximiliano Maronna

1. Celenterado. 2. Filogenia. 3. Bioinformática. I. Título.

CDD 593.5

Folha de Aprovação

Lucas Bassi Costa

Reavaliação da posição filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa) com base em dados moleculares

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para obtenção do título de Mestrado Acadêmico em BIOCIÊNCIAS.
(Área de Conhecimento: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA)

Data da Aprovação: 06/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE: PROF. DR. Sérgio Nascimento Stampar - UNESP/ASSIS

MEMBROS:PROF. DR. Carlos Camargo Alberts - UNESP/ASSIS

PROFA. DRA. Julia Silva Beneti - USP/SÃO PAULO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos os familiares pelo apoio e amor incondicional.

Agradeço a Deus por tudo.

Agradeço ao Dr. Sérgio Nascimento Stampar pela oportunidade e pelos ensinamentos ao longo dos anos.

Agradeço aos meus amigos pela presença e pelos momentos compartilhados.

Agradeço a CAPES pelo fomento para que o projeto fosse realizado.

SUMÁRIO

Sumário.....5

Introdução Geral.....8

Referências Bibliográficas.....9

Capítulo 1:Influência das abordagens metodológicas na reconstrução filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).....13

Introdução.....13

Materiais e Métodos.....18

Resultados.....25

Discussão.....29

Conclusão.....34

Referências Bibliográficas.....36

Anexos.....43

COSTA, Lucas Bassi. **Influência das abordagens metodológicas na reconstrução filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).** 2018. 48 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2018.

Resumo

O filo Cnidaria pode ser considerado um dos mais distintos do reino animal. Dentre suas subclasses, encontra-se Ceriantharia, constituída pelas anêmonas de tubo. Esses animais são até o momento um desafio para a sistemática, uma vez que após diversas propostas, nenhuma se fez unânime até o momento. Grande parte da divergência encontrada em classificar o grupo, deve-se aos métodos/materiais utilizados para análise. Sendo assim, o presente trabalho buscou, através de dados moleculares, estudar as relações de Ceriantharia dentre os Anthozoa e os demais Cnidaria e comparar os resultados obtidos pelos diferentes métodos de reconstruções filogenéticas. Para tal, foram utilizados marcadores ribossomais completos (28S e 18S). Por meio de softwares específicos, as sequências genéticas foram analisadas e as reconstruções foram realizadas seguindo dois dos métodos mais utilizados atualmente (máxima verossimilhança e inferência bayesiana). Tendo em mãos inúmeras ferramentas, o presente trabalho é uma oportunidade de gerar conhecimento e buscar conceitos mais precisos dentro da sistemática do grupo.

Palavras-chave: Cnidaria, Filogenia, Bioinformática, Marcadores moleculares

COSTA, Lucas Bassi. **Influence of methodological approaches on phylogenetic reconstruction of Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).** 2018. 48 p. Dissertation (Masters in Biosciences). – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2018.

Abstract

The Cnidaria phylum can be considered one of the most distinguished of the animal kingdom. Among them, there is the subclass Ceriantharia, constituted by the tube anemones. These animals are so far a challenge to systematics, since after several proposals, none has been considered as unanimous yet. Much of the divergence found in classifying the group is due to the methods / materials used for analysis. Thus, the present work sough trough molecular data, to study the relationships of Ceriantharia among the Anthozoa and the other Cnidaria and to compare the results obtained by the different methods of phylogenetic reconstruction. For this, complete ribosomal markers (28S and 18S), were used. By means of specific softwares, the genetic sequences were analyzed and the reconstruction were performed following two of the most commonly used methods (maximum likelihood and Bayesian inference). Having in hand numerous tools, the present work was a very important opportunity to generate knowledge and to search for more precise concepts within the systematics of the group.

Keywords: Cnidaria, Phylogeny, Bionformatic, Molecular markers.

Introdução Geral

O filo Cnidaria abrange um grupo diverso de organismos relativamente simples, todos unidos pela peculiar capacidade de sintetizar uma estrutura celular de alta complexidade, denominada cnida (Daly et al., 2007). Na célula, é vista como uma cápsula que apresenta túbulos eversíveis em seu interior (Watson, 1988) e que pode ser classificada em três tipos: Nematocistos, Espirocistos e Pticocistos (Daly et al., 2007). Dentre esses tipos, apenas os nematocistos são encontrados em todos os representantes do clado. A presença abundante pode indicar que os nematocistos foram o primeiro tipo de cnidas a aparecer, servindo ainda como acestral para os demais tipos encontrados (Marques e Collins, 2004; Daly et al., 2007).

Apesar de unidos pela presença de um tipo celular singular, o filo também é conhecido por apresentar uma grande disparidade morfológica por parte de seus integrantes (Collins, 2002). Algumas características morfológicas e do ciclo de vida chegaram a ser tratadas como diagnósticas para o filo, porém, com o tempo, todas apresentaram problemas e deixaram de ser unânimes (Daly et al., 2007).

Esta disparidade pode ser evidenciada dentro dos Cnidarios por serem encontrados indivíduos que vão desde os sifonóforos, corais de diversos tipos, anêmonas, até chegar em águas-vivas apresentando estruturas oculares complexas (Collins, 2002). Todos estes bastante abundantes e comuns, principalmente quando se trata de ambientes marinhos (Daly et al., 2007).

Podem ser encontradas cinco grandes classes de cnidarios: Anthozoa (corais, anêmonas, gorgônias), Scyphozoa (Águas-vivas verdadeiras), Staurozoa (Medusas sésseis), Hydrozoa (Hídras) e Cubozoa (vespas marinhas) (Kayal et al., 2013). Nas classificações atuais, as quatro últimas classes citadas podem ser agrupadas em um sub-filo denominado Medusozoa, deixando Anthozoa como a única classe do subfilo Anthozoaria (Stampar et al., 2014). Sendo assim, a distinção entre os dois principais clados do filo é muito bem suportada por fatores como ciclo de vida (Brigde et al., 1995), sequências de DNA (Bernston et al., 1999) e também estrutura genômica (Bridge et al., 1992).

A existência do subfilo Medusozoa apresenta também um grande suporte devido à similaridade na combinação de caracteres moleculares (genoma mitocondrial, por exemplo) e caracteres morfológicos (estágio de vida adulto) (Kayal 2013), sendo que a presença da forma de medusa é tratada como uma das principais apomorfias do grupo (Collins, 2006). Sendo assim, Medusozoa é considerado como um grupo monofilético sem muitos questionamentos (Kayal et al., 2013).

Anthozoa, por sua vez, é o clado com maior número de espécies registradas, cerca de 7500 (Daly et al. ,2007). Os indivíduos deste grupo são definidos pela presença de três caracteres morfológicos principais: Presença de sifonóglife, actinofaringe e de mesentérios com filamentos trilobados, sendo esta última uma característica única para todos os membros de Anthozoa (Won et al., 2001). Outros fatos que chamam atenção estão relacionados a não apresentarem a fase livre-natante de medusa, como as outras classes, em contrapartida, permanecem com a morfologia de pólipo por toda sua vida adulta (Bernston, 1999), e por apresentarem o maior grau de diversidade de cnidas (Watson & Wood, 1988).

Atualmente, os antozoários estão dividos em quinze ordens dispostas dentro de três subclasses (Won, 2001). Todavia, a valide das subclasses pertencentes à Anthozoa vem sendo constante alvo de debates (Bernston et al., 1999). Os antozoários são tradicionalmente divididos em duas grandes subclasses: Hexacorallia e Octocorallia (Daly et al., 2007). Dentre elas, os octocorais são representados pelos corais macios, gorgonias, entre outros. As principais características exclusivas deste grupo são a presença de oito ramificações de tentáculos braquiais e também de oito mesentérios completos (Bernston et al., 1999).

A outra grande subclasse de Anthozoaria é Hexacorallia, composta por corais duros e anêmonas (Pratlong et al., 2016). As características apresentadas pelos seus representantes são: ausência de ramificação em seus tentáculos, os mesentérios sempre aos pares e a presença de espículas livres em seus esqueleto (quando presente no indivíduo). Nesse grupo, podem ser encontrados tanto indivíduos solitários como associados em colonias (Bernston et al., 1999).

Dentre as ordens que formam Anthozoa, Ceriantharia merece destaque, pois é constituída por pólipos que apresentam uma morfologia peculiar, que os difere dos demais antozoários. Os cnidários deste grupo apresentam dois discos de tentáculos (denominados tentáculos marginais e labiais), seus mesentérios não aparecem pareados e sua principal cnida é o pticocisto (Bernston et al., 1999). Outra característica apresentada exclusivamene por Ceriantharia é com relação à seu ciclo de vida diferente dos demais Anthozoa, principalmente no estágio larval (Stampar et al., 2012).

Ceriantharia, no passado, já fora considerado como um grupo monofilético, entretando, suas relações com as demais ordens de anthozoários ainda não é inteiramente clara (Bernston et al., 1999). Devido às suas característica singulares, acredita-se que de todas as demais ordens de Hexacorais, a linhagem de Ceriantharia foi a que divergiu há mais tempo (Bernston et al., 2001 ; Won et al., 2001 ; Daly et al., 2002,2003).

Referências Bibliográficas.

BERNTSON, Ewann A.; FRANCE, Scott C.; MULLINEAUX, Lauren S. Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 13, n. 2, p. 417-433, 1999.

BERNTSON, E. A. et al. Phylogenetic relationships within the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. **Marine Biology**, v. 138, n. 2, p. 235-246, 2001.

BRIDGE, Diane et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. **Proceedings of the National academy of Sciences**, v. 89, n. 18, p. 8750-8753, 1992.

BRIDGE, Diane et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 679-689, 1995.

COLLINS, Allen G. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, n. 3, p. 418-432, 2002.

COLLINS, Allen G. et al. 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**, v. 55, n. 1, p. 97-115, 2006.

COLLINS, Allen G. Recent insights into cnidarian phylogeny. **Smithsonian contributions to the marine sciences**, n. 38, 2009.

DALY, Marymegan; FAUTIN, Daphne G.; CAPPOLA, Valerie A. Systematics of the hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 139, n. 3, p. 419-437, 2003.

DALY, Marymegan et al. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. 2007.

HESSINGER, David A.; LENHOFF, Howard M. **Biology of nematocysts**. Academic Press, 1988.

KAYAL, Ehsan et al. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 5, 2013.

MARQUES, Antonio C.; COLLINS, Allen G. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. **Invertebrate Biology**, v. 123, n. 1, p. 23-42, 2004.

NEI, Masatoshi; KUMAR, Sudhir. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford university press, 2000.

PRATLONG, Marine et al. Monophyly of Anthozoa (Cnidaria): why do nuclear and mitochondrial phylogenies disagree?. **Zoologica Scripta**, v. 46, n. 3, p. 363-371, 2017.

SCHMIDT, Heiko A.; VON HAESELER, Arndt. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. **The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**, p. 181-209, 2009.

STAMPAR, Sergio N. et al. Evolutionary diversification of banded tube-dwelling anemones (Cnidaria; Ceriantharia; Isarachnanthus) in the Atlantic Ocean. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41091, 2012.

WON, J.; RHO, B.; SONG, J. A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. **Coral Reefs**, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2001.

Capítulo 1: Influência das análises metodológicas na reconstrução filogenética de Ceriantharia (Cnidaria, Anthozoa).

Introdução

Anthozoaria (Anthozoa) é foco de trabalho de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. Entretanto, o escopo de interesse dos pesquisadores não é uniforme dentre os grandes grupos e muito menos nas temáticas de pesquisa (Daly et al., 2007). Uma grande série de trabalhos com viés evolutivo-sistemático já foi realizada em determinados grupos, principalmente nas ordens Actiniaria e Scleractinia (ver mais em Kitahara et al., 2014). Apesar de intensamente estudado, a sistemática dentro de Anthozoa ainda é bastante problemática, e a posição filogenética de grupos pouco estudados, como Ceriantharia, tem sido bastante controversa (ver exemplos na Fig.1). As anêmonas de tubo (Anthozoa, Ceriantharia) perfazem um grupo muito particular de Cnidaria (tipo de cnidas, forma de crescimento e simetria exclusivos). Andres (1884) iniciou a proposta de agrupamento de Ceriantharia dentro da classe Hexacorallia (estando mais proximamente relacionada às ordens Anthipatharia e Actiniaria). Porém, essa idéia foi refutada posteriormente por van Beneden (1898), indicando que, na verdade, o correto seria a criação de um novo clado, onde Ceriantharia e Anthipatharia seriam agrupados em uma subclasse denominada Cerianthipatharia. Ao longo dos anos, diversos estudos a respeito de Ceriantharia lhe propuseram diferentes classificações filogenéticas, porém, nenhum deles obteve completa aceitação.

Um exemplo pode ser o trabalho de McMurrich (1910), onde foi apresentada uma classificação alternativa, onde Ceriantharia seria considerado um ramo independente dentro de Anthozoa. Entretando, não houve aceitação dessa nova proposta, e a tendência de utilização da subclasse Cerianthipatharia aumentou devido à sua presença em mais trabalhos, como os de Hyman (1940) e Manuel (1981). Um dos fatores analisados por van Beneden (1898) que conferiam maior confiabilidade para o táxon Cerianthipatharia estava relacionado à semelhança observada por ele entre as larvas de Anthipatharia e Ceriantharia.

Porém, os avanços nos estudos na área de biologia molecular mostraram que a existência desse novo clado proposto por van Beneden

(1948) não estava correto, sendo assim, as suas duas ordens constituintes foram novamente alocadas dentro da subclasse Hexacorallia (Chen et al., 1995; Berntson et al., 1999).

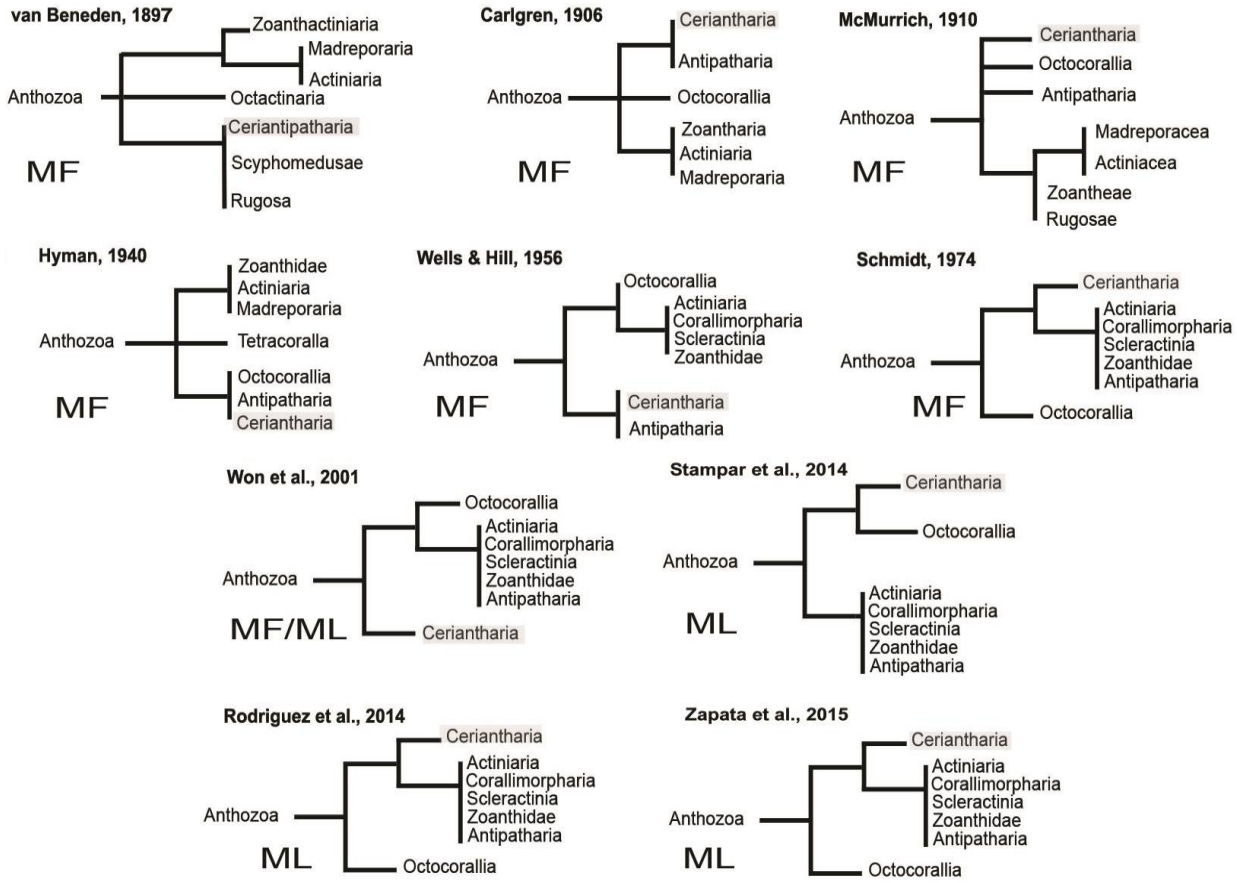


Figura 1 – Exemplos de propostas filogenéticas que abordaram Ceriantharia em relação aos demais antozoários (sendo: MF – Morfologia; MF/ML – Morfologia/Molecular e ML – Molecular) (Retirado de Stampar et al., 2016).

Análises moleculares que incluíram sequências de Ceriantharia foram iniciadas em 1995 por Chen e colaboradores. Nesse estudo os autores descreveram um resultado “estranho” em relação às análises de sequências do marcador ribossomal nuclear 28S de *Cerianthus* sp. (posteriormente identificado com *Pachycerianthus magnus*). Nessa análise, o ramo que representa Ceriantharia ficou alocado entre o grupo externo (Cubozoa, *Chironex fleckeri*) e os demais Anthozoa. Os autores discutiram que a posição de Ceriantharia era muito confusa e não entraram em detalhes. Ainda sim, foi possível verificar que a antiga proposição do grupo Ceriantipatharia não era válida. Posteriormente, Song & Won (1997) apresentaram uma análise

baseada no marcador ribossomal nuclear 18S. Os autores concluíram que Ceriantharia é grupo irmão do clado Octocorallia+Hexacorallia. Berntson et al. (1999) conduziram uma análise também de 18S utilizando duas espécies de Ceriantharia, sendo esse o primeiro estudo a empregar mais do que uma espécie em uma mesma análise. Entretanto, as sequências utilizadas neste estudo não são coerentes com as demais obtidas para Ceriantharia em diversos outros estudos (provavelmente contaminação - ver mais em Stampar et al., 2014). Mesmo assim, os autores discutiram que a posição de Ceriantharia não foi consistente nas análises. Dois trabalhos subsequentes, Won et al. (2001) e Daly et al. (2003), abordaram a classe Anthozoa integrando dados morfológicos e diferentes marcadores moleculares. Ainda assim, os resultados são inconsistentes em relação à posição de Ceriantharia . Por outro lado, os estudos mais recentes apresentaram dois padrões muito distintos.

O primeiro padrão apresenta Ceriantharia como sendo uma das linhagens dentre os demais membros de Hexacorallia (Kayal et al., 2013; Rodriguez et al., 2014). Este padrão foi obtido com base em marcadores mitocondriais, onde foi observado grande similaridade entre Ceriantharia e Hexacorallia em setores com grande conservação. Porém, este padrão só pode ser observado após manipulação das sequências estudadas (exclusão/ pesagem de setores, inferência de raiz, por exemplo).

Outros padrões observados apresentaram Ceriantharia como sendo um grupo externo à Hexacoralia, grupo irmão de Hexacorallia+Octocorallia ou também como sendo um grupo irmão de Cnidaria. Estes últimos resultados foram coerentes com alguns já apresentados anteriormente por Won & Song (1997) e Chen et al., (1995). Mais sobre este padrão pode ser encontrado em Stampar et al., 2014).

Um trabalho baseado em genes codificantes de proteínas e realizado por Park et al., (2012), apontou a classe Anthozoa como sendo parafilética, onde a classe Octocorallia seria um grupo irmão de Medusozoa. Essa possibilidade já havia sido observada em trabalhos anteriores de Kayal et al., (2013), porém, os autores preferiram não discutir muito a respeito. Importante ser levado em conta o fato que nesta análise citada, nenhum indivíduo de Ceriantharia foi utilizado.

Mais recentemente, Zapata et al., 2015 e Kayal et al., 2017 realizaram estudos filogenéticos utilizando técnicas de transcriptoma para buscar resolver as principais dúvidas a cerca da filogenia dos cnidarios. Em ambos os estudos, ceriantharia foi posicionado pertencendo à Anthozoa e sendo grupo irmão de Hexacorallia, contestando os resultados obtidos por Stampar (2014) e corroborando os obtidos por Bernston et al., 1999, Daly et al., 2013 e Kayal et al.,2013, por exemplo.

O primeiro estudo obteve resultados que apontaram Ceriantharia como grupo irmão tanto de Hexacorallia quanto de Octocorallia, entretando, tende ao agrupamento Ceriantharia+Hexacorallia devido à similaridade entre algumas características específicas. Já o estudo de 2017 infere que a real posição das anêmonas de tubo é dentro do clado Anthozoa, sendo grupo irmão de Hexacorallia, devido ao grande suporte apresentado por seus resultados.
Considerando os estudos citados anteriormente, pode-se notar a indefinição quanto a real posição ocupada por Ceriantharia na filogenia dos cnidários, o que deixou de ser uma discussão sem importância, ainda mais após análises dos resultados que apontam o grupo como uma das linhagens de derivação mais basais do filo.

Dentre as ordens que tradicionalmente compõem Hexacorallia, apenas Ceriantharia não tem representantes com ao menos um genoma mitocondrial descrito até o momento. Os estudos filogenéticos de Ceriantharia baseados em marcadores mitocondriais e nucleares apresentam resultados divergentes daqueles baseados na morfologia (ver discussão em Stampar et al., 2014). Desta forma Ceriantharia pode ser considerado como um grupo "*incertae sedis*" dentre Anthozoaria (Stampar et al., 2012).

Atualmente, os estudos de reconstruções filogenéticas utilizam métodos para obtenção de seus resultados que podem ser baseados ou não em modelos (Swofford, 1996). Os métodos não baseados em modelos compreendem matrizes de distância e parcimônia, já os métodos baseados em modelos correspondem à máxima verossimilhança (Schmidt & Haesler, 2009).

Para os métodos baseados em matrizes de distância, computam-se as distâncias evolutivas para cada um dos pares de táxons e a árvore filogenética é construida através da comparação entre esses valores de distância entre táxons (Nei & Kumar, 2000).

Quanto ao método de parcimônia, que foi inicialmente criado visando análises morfológicas, analisa-se os nucleotídeos/aminoácidos do táxon ancestral separadamente para cada sítio dentro da topologia. A árvore selecionada será a que obtiver menor número de substituições (Nei & Kumar, 2000).

Os métodos de máxima verossimilhança são métodos baseados em modelos estatísticos de evolução. Estes métodos necessitam de uma capacidade computacional maior para serem realizados, porém, estão livres de algumas limitações presentes em outros métodos (Felsestein, 1981). Neste método, cada topologia tem a verossimilhança para um conjunto de sequências maximizado, sendo escolhida como árvore final a que apresentar o maior de verossimilhança. Para estes tipos de reconstruções, os parâmetros considerados não devem ser as topologias em si, mas sim os comprimentos dos ramos de cada topologia, sendo que a otimização da verossimilhança se dá justamente para se possa estimar o comprimento destes ramos (Nei & Kumar, 2000).

A inferência bayesiana trata-se de um processo de decisão baseado em análises de probabilidades, sendo assim, mais simples do que os métodos estatísticos clássicos (Ronquist et al., 2009). Para análises filogenéticas, este método parte de realções pré-estabelecidas entre as espécies. Caso essas relações não sejam especificadas *a priori*, o método então assume probabilidades iguais para todas as árvores, utilizando técnicas de simulação denominadas Cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC) (Ronquist et al., 2009).

Em geral, a reconstrução de filogenias de níveis taxonômicos elevados (ex. classe, ordem) demanda marcadores moleculares com “baixa” taxa (acúmulo) de mutações (menos do que 1% de divergência/milhão de anos, por exemplo) (Vandamme, 2009). Desta maneira, os genes nucleares ribossomais 28S e 18S têm sido aceitos como adequados (Cruickshank, 2002). Esses marcadores são conservados o bastante para produzir alinhamentos sem ambiguidades e para produzir sinal filogenético apropriado para relações basais (Higgins & Lemey, 2009).

Dentre os dois genes citados acima, o proveniente da menor subunidade ribossomal (18S) apresenta uma taxa de variação menor do que o proveniente

da maior subunidade ribossomal (28S), podendo, assim, ser utilizado em questões evolutivas de períodos mais distantes (Hills et al., 1991).

Os marcadores mitocondriais também podem ser utilizados nesse tipo de avaliação, mas em alguns casos estes podem apresentar alguns problemas (por exemplo, saturação) (Blouin et al., 1998; Liu et al., 2014). Uma alternativa nova e abrangente é a utilização de sequências de transcriptomas na reconstrução de filogenias para grandes grupos (ex. Borner et al., 2014). Para todas essas abordagens, Ceriantharia é um dos grupos em Cnidaria com menor quantidade e confiabilidade de dados.

Com o cenário acima, fica evidente a necessidade de uma abordagem abrangente na posição relativa de Ceriantharia dentre os demais clados de Cnidaria, além de uma análise sobre os principais métodos empregados em estudos deste tipo. Desta forma, o presente estudo teve como intuito propor uma ampla avaliação sobre a posição filogenética do grupo e a influência que os diferentes métodos de reconstrução podem promover.

Materiais e Métodos

Para o presente estudo, foram analisadas sequências de um total de 73 espécies de cnidarios para o marcador ribossomal 18S e 25 espécies para o também marcador ribossomal 28S. As espécies selecionadas estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1: Espécies cujas sequências foram utilizadas para recontstruções filogenéticas.

Sub-Filo	Classe	Ordem	Espécie
Anthozoa	Hexacorallia	Actiniaria	*Aiptasia insignis*
			Aiptasia pulchella
			Anemonia sulcata
			Edwardisella lineata
			Nematostella vectensis
			Paracondylactis hertwigi
			Paracondylactis hertwigi
			Parazoanthus sp.
			Stychodactyla haddoni
		Anthipatharia	*Anthipathes galapagensis*
			Anthipathes griggi

			Cirripathes anguina
			Dendrobathypathes boutillieri
			Phanopathes expansa
			Tanacetipathes barbadensis
			Trissopathes pseudotristicha
		Coralimorpharia	*Corynactis californica*
			Corynactis viridis
			Discosoma neglecta
			Discosoma nummiforme
			Discosoma sp.
			Ricordea florida
		Scleractina	*Montrastaea franksi*
			Phyllangia americana mouchezzi
			Rhyzopsammia minuta
			Tubastraea coccinea
		Zoantharia	*Palythoa variabilis*
			Savalia savaglia
	Ceriantharia	Penicillaria	*Isarachnanthus maderensis*
			Isarachnanthus nocturnus
		Spirularia	*Ceriantheomorphe brasiliensis*
			Ceriantheomorphe membranaceus
			Pachycerianthus fimbriatus
			Pachycerianthus magnus
			Pachycerianthus sp.
	Octocorallia	Alcyonaceae	*Anthothela nuttingi*
			Calyptophora microdentata
			Clavularia rudis
			Leptogorgia capverdensis
			Metallogorgia melanotrichos
			Pseudochryssogorgia bellona
Medusozoa	Cubozoa	Carybdeida	*Carybdea arborifera*
			Carybdea marsupialis

		Carybdea mora
		Tamoya haplonema
		Tripedalia cystophora
	Chirodropida	*Chironex yamaguchii*
		Chiropsalmus quadrumanus
Hydrozoa	Anthoatecata	*Candelabrum cocksii*
		Cordylophora caspia
		Cordylophora caspia
		Dipurena halterata
		Ectopleura larynx
		Euphysa tentaculata
		Hydra circumcincta
		Hydra vulgaris
		Hydractinia echinata
		Neoturris breviconis
		Podocorynoides minima
		Velella velella
		Zanclea costata
	Lepthotecata	*Clytia linearis*
		Obelia longissima
		Orthopyxis integra
	Limnomedusae	*Craspedacrusta sowerbyi*
		Limnocnida tanganyicae
		Olindias phosphorica
	Siphonophorae	*Nectopyramis* sp.
		Physalia physalis
	Trachymedusae	*Liriope tetraphylla*
Scyphozoa	Coronatae	*Atolla vanhoeffeni*
		Linuche aquila
		Nautishoe rubra
		Nausithoe sp.
	Rhizostomeae	*Cassiopea xamachana*
		Cotylorhiza tuberculata
		Crambionella orsini
	Semaeostomeae	*Aurelia aurita*
		Chrysaora melanaster
		Chrysaora sp.
		Drymonema dalmatinum
		Nemopilema nomurai
Staurozoa	Stauromedusae	*Craterolophus convolvulus*

		Haliclystus sanjuanensis	

As sequências dos indivíduos de Ceriantharia já estavam disponíveis para análises no Laboratório de Evolução e Diversidade Aquática – LEDA – da FCL Assis, e as demais foram obtidas no Genbank. Após isso, foram selecionados os grupos externos que seriam utilizados nas análises propostas.

Para isso, foram definidos que duas espécies pertencentes aos Filos Porifera, Ctenophora e Placozoa seriam grupos externos, sendo que todos os testes seriam realizados utilizando apenas um de cada vez, para posterior comparação entre os resultados obtidos. As espécies escolhidas para o estudo estão dispostas na tabela 2.

Tabela 2: Espécies utilizadas como grupos externos.

Filo	**Marcador**	**Espécie**	**GenBank ID**
Ctenophora	18S	*Cestum veneris*	KJ754161.1
		Pulchella strain	HQ912611.1
	28S	*Mnemiopsis leidyi*	AY026373.1
		Pleurobrachia bachei	AY026378.1
Placozoa	*18S*	*Trichoplax* sp.	AY652578.1
		Trichoplax sp.	AY652581.1
	28S	*Trichoplax* sp.	AY652583.1
		Trichoplax sp.	AY652584.1
Porifera	18S	*Sarcotragus spinosulus*	HE591467.1
		Verongiida sp.	KC902024.1
	28S	*Acanthacora* sp.	KC869649.1
		Xenospongia pateliformis	KC869650.1

Após a escolha dos grupos, as análises filogenéticas puderam ser conduzidas no software GENEIOUS 7®. Primeiramente, foi realizado o alinhamento via MUSCLE, mantento os parâmetros básicos do software, entre as sequências dos cnidarios com as sequências de cada um dos grupos externos. Após o alinhamento, as sequências foram editadas para que todas apresentassem o mesmo tamanho. Feito isso, os alinhamentos foram então

analisados com programas de reconstrução filogenética. Os programas que puderam ser utilizados pelo software GENEIOUS 7® foram ambos de máxima verossimilhança : RaxML e Phyml.

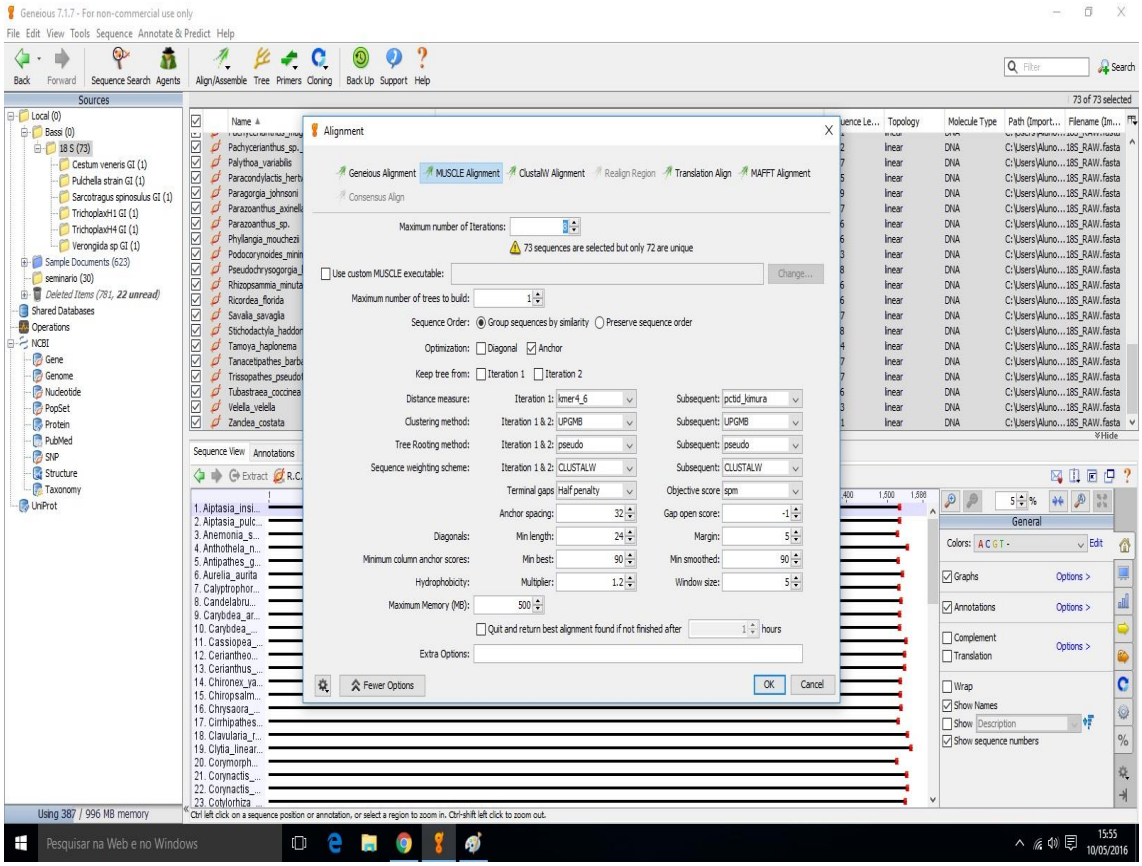


Figura 2: Aba de alinhamento do software Geneious 7®

Figura 3: Exemplo de alinhamento fornecido pelo software Geneious 7®

A edição dos alinhamentos mencionada acima ocorreu devido às sequências obtidas para o estudo apresentarem tamanhos variáveis. Desta forma, após a obtenção dos alinhamentos, algumas bases nitrogenadas das sequências de algumas espécies foram excluídas para que todas ficassem com o mesmo tamanho.

Tabela 3: Tamanho dos alinhamentos utilizados para as reconstruções filogenéticas. Onde pb= pares de bases.

	18 S	**28S**	
Grupo externo	**Alinhamento**	**Grupo Externo**	**Alinhamento**
Cestum veneris	2188 pb	*Acanthancora* sp.	3131 pb
Pulchella strain	1777 pb	*Mnemiopsis leidyi*	3336 pb
Sarcotragus spinosulus	1763 pb	*Pleurobrachia bachei*	3336 pb
Verongiida sp.	1746 pb	*Xenospongia pateliformis*	3088 pb
Trichoplax sp.	1736 pb	*Trichoplax* sp.	3487 pb
Trichoplax sp.	1773 pb	*Trichoplax* sp.	3473 pb

Para as reconstruções via Phyml, foram utilizados todos os modelos de substituição disponíveis: GTR, F81, F84, HKY, JC, Kimura e TN. Assim como também foram utilizados todos os suportes de braço: aLRT, Bootstrap (1000 repetições para o marcador 18S e 500 repetições para o marcador 28S), Chi2 e SHlike. Já para as reconstruções via RaxML, os parâmetros adotados foram os seguintes: GTR+GAMMA para o modelo de nucleotídeo e Rapid hill-climbing para o algorítimo. Os demais parâmetros de ambos os mmodelos foram mantidos default.

Já as reconstruções feitas através do programa de Inferência bayesiana (Mr.Bayes) precisaram ser realizadas através de outro software. Para isso, os alinhamentos obtidos no Geneious foram exportados para o softwarer BEAUti, onde foram convertidos em arquivos de formato “.xml”. Feito isso, os arquivos puderam ser abertos no software BEAST, onde a reconstrução por inferência baynesiana pode ser realizada, também mantendo os parâmetros default.

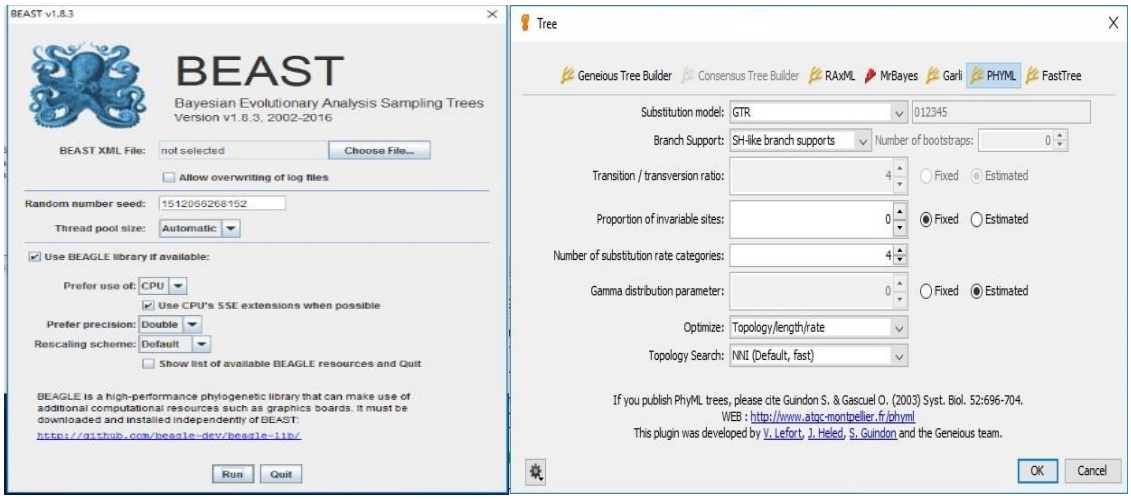


Figura 4: Layout dos programas utilizados para as reconstruções de Inferência bayesiana (esquerda) e máxima verossimilhança (direita).

O próximo passo foi a introdução de um novo grupo para as análises seguintes. Trata-se do grupo de Cnidaria denominado Myxozoa, grupo onde, assim como Ceriantharia, apresentou uma série de dúvidas a respeito de sua posição filogenética ao longo da história. O intuito era perceber se a presença de sequências de indivíduos pertencentes à Myxozoa traria alguma variação com relação à Ceriantharia em compração ao que fora apresentado anteriormente.

O procedimento realizado foi basicamente o mesmo citado acima. Foram feitas buscas na plataforma GenBank de sequências de espécimes de Myxozoa para ambos os marcadores do trabalho. Sendo assim, as espécies selecionadas foram as seguintes para o marcador 18 S: *Myxobolus wooteni* (ID DQ231157), *Ellipsomyxa adlardi* (ID JX443488), *Ceratomyxa labracis* (ID AF411472) e *Ceratomyxa sparusaurati* (ID AF411471). Já para o marcador 28 S foram selecionadas as seguintes : *Palliatus indecorus* (ID FJ417069), *Myxidium incurvatum* (ID FJ417064), *Kudoa hexapunctata* (ID AB902957) e *Kudoa neothunni* (ID AB902961).

O intuito para a adição de Myxozoa foi realizar uma comparção entre as duas séries de reconstruções e verificar se a posição de Ceriantharia sofre ou não alterações devido à presença de sequências de espécies pertencentes à um grupo que por muito tempo também deve sua posição filogenética questionada.

Resultados

Após a realização de todas as reconstruções, foram obtidas 360 árvores filogenéticas, dentre elas, 348 provenientes de reconstruções de máxima versossimilhança (12 via RaxML e 336 via PhyML) e 12 proveninentes de reconstruções de inferência bayesiana. Alguns exemplos de árvores geradas pelos softwares para o estudo estão ilustradas nas figuras 5, 6 e 7.

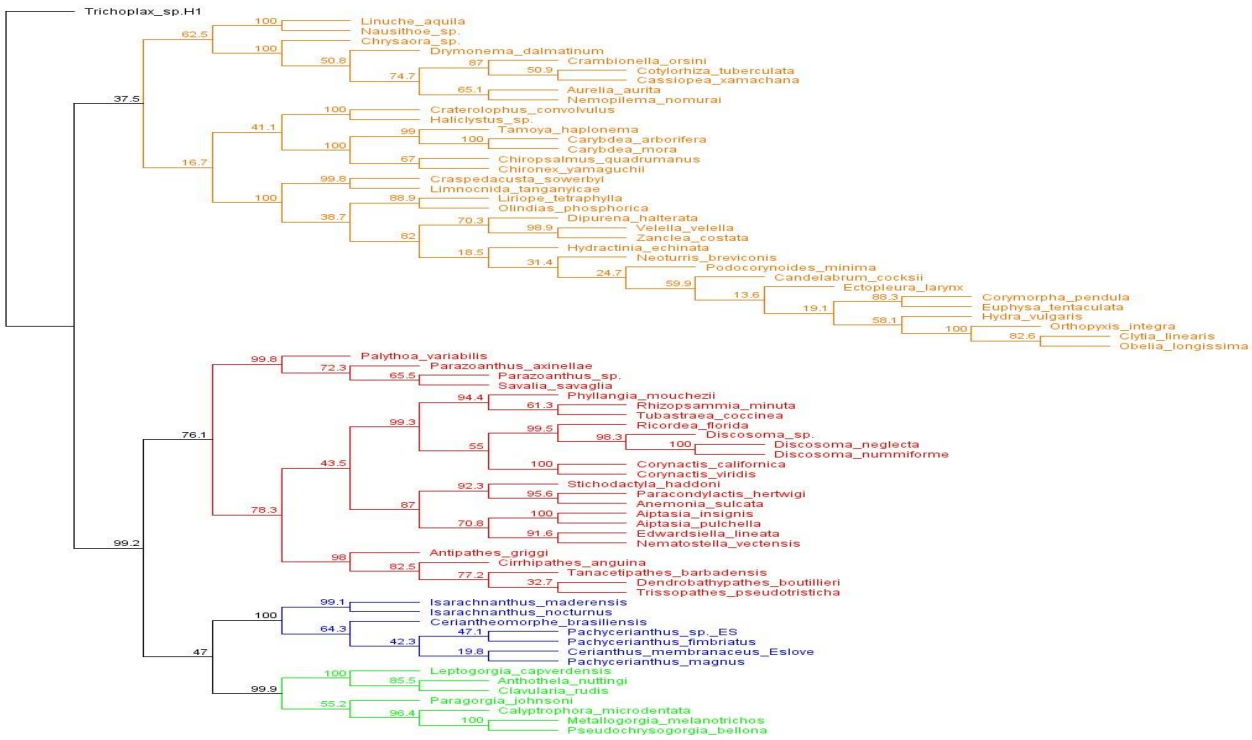


Figura 5: Reconstrução filogenética via PhyML (F81/Bootstrap) com marcador 18S e grupo externo *Trichoplax sp*. Onde: Laranja (Medusozoa), Azul (Ceriantharia), Vermelho (Hexacorallia) e Verde (Octocorallia).

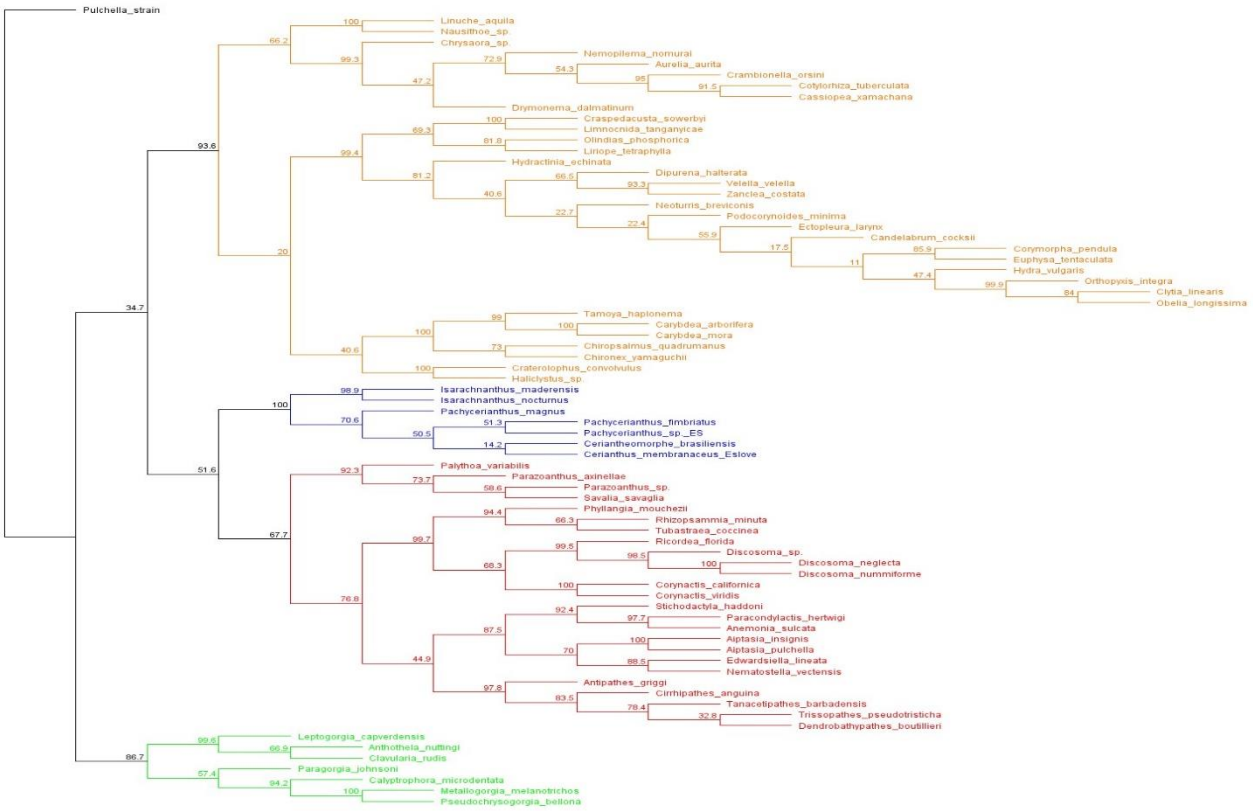


Figura 6: Reconstrução filogenética via PhyML com o marcador 18S e grupo externo *Pulchella strain*. Onde: Laranja (Medusozoa), Azul (Ceriantharia), Vermelho (Hexacorallia) e Verde (Octocorallia).

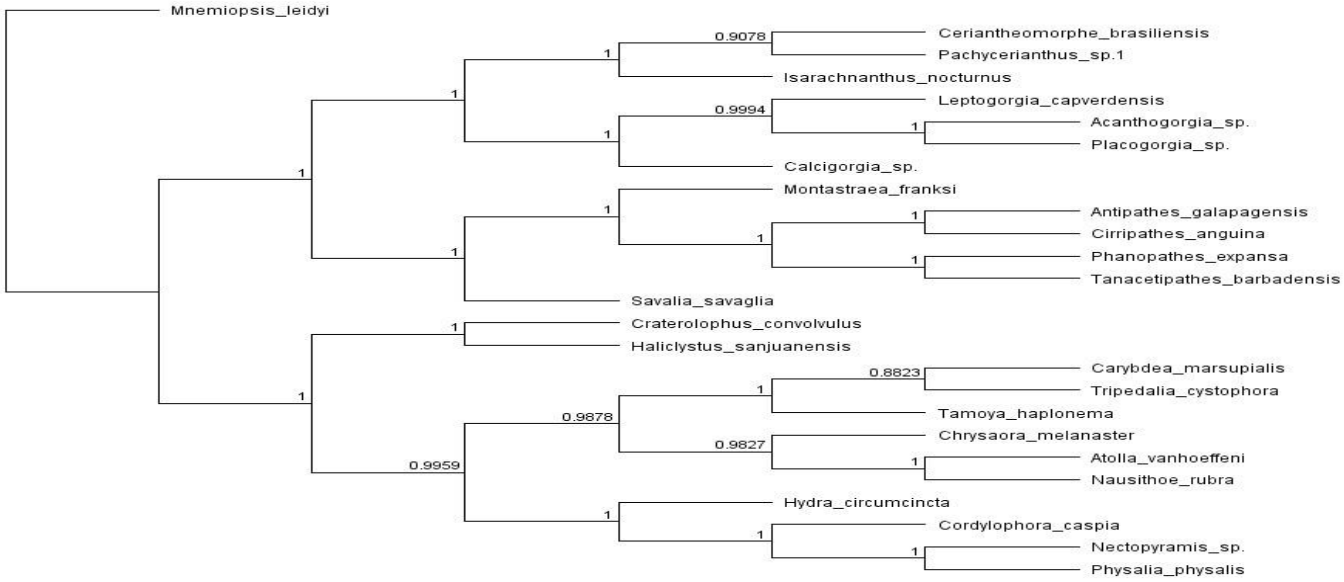


Figura 7: Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana via software BEAST, com o marcador 28S e grupo externo *Mnemiopsis leidyi*.

Para a primeira série de reconstruções.foram observadas basicamente quatro possibilidades de posição para Ceriantharia. Dentre todas, três vão de encontro com os resutados mais comumente obtidos em estudos deste tipo. Estes resultados estão apresentados pela Tabela 4.

Tabela 4 : Resultados obtidos na primeira série de reconstruções

	18 S	**28S**	**Frequência (%)**
Ceriantharia grupo irmão de Cnidaria	65	-	18
Ceriantharia grupo irmão de Hexacorallia	98	-	27
Ceriantharia grupo irmão de Octocorallia	17	175	53
Ceriantharia e Octocorallia irmãos de Cnidaria	-	5	1

Das quatro possibilidades de posição filogenética para Ceriantharia, as que mais apareceram nas reconstruções foram as que os agrupam dentro do clado de Anthozoa. Porém, as relações de Ceriantharia com os outros grupos de anthozoários apresentaram variações. A possibilidade que mais se fez presente foi a já proposta por Stampar et al 2014, onde Ceriantharia fora apresentado como grupo irmão de Octocorallia.

Quando analisadas as diferenças obtidas nas reconstruções para cada método empregado (Máxima verossimilhança e Inferência bayesiana), os resultados foram distribuídos conforme a tabela a seguir.

Tabela 5: Resultados obtidos para os diferentes métodos de reconstrução filogenética.

Método	**Posições filogenéticas**			
	Ceriantharia irmão de Cnidaria	**Ceriantharia dentro de Anthozoa irmao de Hexacorllia**	**Ceriantharia dentro de Anthozoa irmao de Octocorallia**	**Ceriantharia + Octocorallia irmão de Cnidaria**
PhyML	64	87	180	5
RaxML	1	5	6	-
Mr.Bayes	-	6	6	-

Quando analisados os resultados obtidos para cada grupo externo individualemente, pode-se verificar que ocorreram alterações de topologias nas árvores mesmo quando os grupos externos eram indivíduos pertencentes ao mesmo filo, algo que não era esperado no começo do estudo.

Tabela 6: Resultados obtidos para grupos externos individualmente

Grupo Externo	**Possibilidades**			
	Ceriantharia irmão de Cnidaria	**Ceriantharia dentro de Anthozoa irmao de Hexacorllia**	**Ceriantharia dentro de Anthozoa irmao de Octocorallia**	**Ceriantharia + Octocorallia irmão de Cnidaria**
Sarcotragus spinosulus	**12**	**18**	**-**	**-**
Verongiida sp.	**16**	**14**	**-**	**-**
Cestum veneris	**29**	**1**		
Pulchella strain	**8**	**22**	**-**	**-**
Trichoplax sp.	**-**	**22**	**8**	**-**
Trichoplax sp.	**-**	**21**	**9**	**-**
Acanthancora sp.	**-**	**-**	**25**	**5**
Xenospongia pateliformis	**-**	**-**	**30**	**-**
Mnemiopsis leidyi	**-**	**-**	**30**	**-**
Pleurobrachia bachei	**-**	**-**	**30**	**-**
Trichoplax sp.	**-**	**-**	**30**	**-**
Trichoplax sp.	**-**	**-**	**30**	**-**

Para as reconstruções que contaram com a inclusão dos indivíduos pertencentes à Myxozoa, não foram constatadas grandes variações no panorama geral, permacendo a possibilidade de Ceriantharia como pertencente aos Anthozoários e mais proximamente relacionado com Octocorallia como a mais obtida após os testes. A principal diferença obtida pela segunda série de recontruções foi a não obtenção de uma das possibilidades vistas na primeira série, onde Ceriantharia e Octocorallia formavam um grupo à parte dos demais Cnidarios.Estes resultados estão ilustrados na tabela 6.

Tabela 7 : Resultados obtidos com a presença de Myxozoa

	18 S	**28S**	**f (%)**
Ceriantharia como grupo irmão de Cnidaria	6	-	17
Ceriantharia dentro de Anthozoa e grupo irmao de Hexacorallia	12	-	33
Ceriantharia dentro de Anthozoa e grupo irmao de Octocorallia	-	18	50

O clado Medusozoa não apresentou variações nas reconstruções, sendo sua constituição mantida em 100% das mesmas pelos clados Staurozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Hydrozoa. O que não se alterou com a inclusão de Myxozoa, que apresentou uma relação de irmandade já conhecida com Medusozoa (Chang, et al. 2015; Jimenez-Guri, et al. 2007; Sidall, et al. 1995).Análises mais profundas acerca das relações filogenéticas mais profundas acerca deste clado não foram realizadas devido ao foco deste estudo ser a respeito do outro clado de Cnidaria, Anthozoa.

Discussão

Apesar das difierentes possibilidades de agrupamento filogenético assumindas pelo grupo Ceriantharia, é válido elucidar alguns pontos importantes obtidos pelas reconstruções filogenéticas.

Para os Anthozoários, então, nossas análises corroboraram sua monofilia, obtendo excelente suporte para a mesma. Já as relações filogenéticas entre os grupos representantes apresentaram variações consideráveis, principalmente tendo em vista o grupo Ceriantharia.

As anêmonas de tubo apresentam uma séries de caracerísticas que lhes tornaram diferentes dos demais indivíduos pertencentes aos demais grupos de Anthozoa, como por exemplo o arranjo de seus mesentérios que não respeitam o padrão apresentado pelos demais anthozoários (Daly et al. 2003) e por

apresentar uma lava denominada cerinula muito parecida as larvas de Medusozoa (Molodstova, 2003).

Apesar das diferenças citadas acima, os primeiros estudos envolvendo Ceriantharia o colocaram como pertencente a Classe Anthozoa, sendo grupo irmão de Hexacorallia. Estes estudos foram realizados utilizando bases morfológicas (Daly et al., 2003), genomas mitocondriais (Kayal et al., 2013) e conjuntos de dados filogenômicos (Zapata et al., 2015). Este panorama foi alterado por Stampar et al., 2014, que alocou as anêmonas de tubo como grupo irmão dos demais Anthozoários, passando a ser a hipótese filogenética mais favorecida.

Para o presente estudo, foram obtidas quatro possibilidades de colocação filogenética para Ceriantharia, sendo uma delas (onde Ceriantharia e Octocorallia formam um clado irmão dos demais Cnidarios) ainda não havia sido obtida em nenhum estudo anterior. Entretanto, este padrão foi notado em um número extremamente baixo de reconstruções (aproximadamente 1%). Outra possibilidade interessante trata Ceriantharia como um terceiro clado de Cnidaria, sendo assim, um grupo irmão tanto de Anthozoa como de Medusozoa. Essa possibilidade já havia sido levantada em estudos anteriores, como o de Chen et al., 1995.

As outras duas possibilides de posição filogenética de Ceriantharia foram as mais frequentemente obtidas e vão de encontro às hipóteses mais fortes até o momento, pois tratam as anêmonas de tubo como pertencentes ao clado de Anthozoa, porém, apresentando grande variação quanto ao grupo de anthozoários com quem apresentam relação mais forte de irmandade. Dentre o conjunto de dados obtidos pelo presente estudo, a posição filogenética de Ceriantharia que mais foi obtida trata o mesmo como pertencente a Anthozoa e como grupo irmão de Octocorallia (Figura 5) com mais da metade das reconstruções apontando para este padrão, seguido pela colocação de Ceriantharia como grupo irmão de Hexacorallia (Figura 6).

Com base nos resultados obtidos pela série de reconstruções, o presente estudo contesta parcialmente as hipóteses obtidas pelos estudos atuais de Zapata et al., 2015 e Kayal et al. 2017, onde Ceriantharia foi

agrupado como Anthozoário e grupo irmão de Haxacoralia. Embora utilizando conjutos de dados diferente dos outros estudos citados, o que pode se inferir é que com a utilização de marcadores ribossomais, os resultados reforçam hipóteses de agrupamento de Ceriantharia como as propostas por Stampar et al., 2014, onde também trata as anêmonas de tubo como antozoários, porém, com maior proximidade de Octocorallia.

A adição de indivíduos pertencentes à Myxozoa, grupo onde a posição filogenética também apresenta algumas incertezas, não influenciou a posição filogenética de Ceriantharia em nenhum aspecto. Os padrões de agrupamento das anêmonas de tubo continuaram os mesmos, enquanto que o myxozoários também apresentaram algumas variações de posição filogenética, porém, na grande maioria das reconstruções, foram realmente agrupados como grupo irmão de Medusozoa.

O ponto que mais merece destaque foi a diferença de agrupamento dos indivíduos dependendo dos indivíduos selecionados como grupo externo. Foram utilizadas duas espécies de Porifera, Placozoa e Ctenophora para realizarem o papel de grupo externo para que se pudesse verificar se haveria alguma diferença na filogenia comparando-se indivíduos do mesmo Filo, porém, sendo de espécies diferentes. Os resultados mostram realmente uma variação filogenética dos indivíduos conforme muda-se a espécie utilizada como grupo externo dentro de um mesmo filo. Como ilustrado nas figuras abaixo, utilizando o exemplo de duas reconstruções com grupos externos representantes do filo Ctenophora onde a posição de Ceriantharia não foi a igual, mesmo as reconstruções sendo realizadas com exatamente os mesmos marcadores, testes e parâmetros.

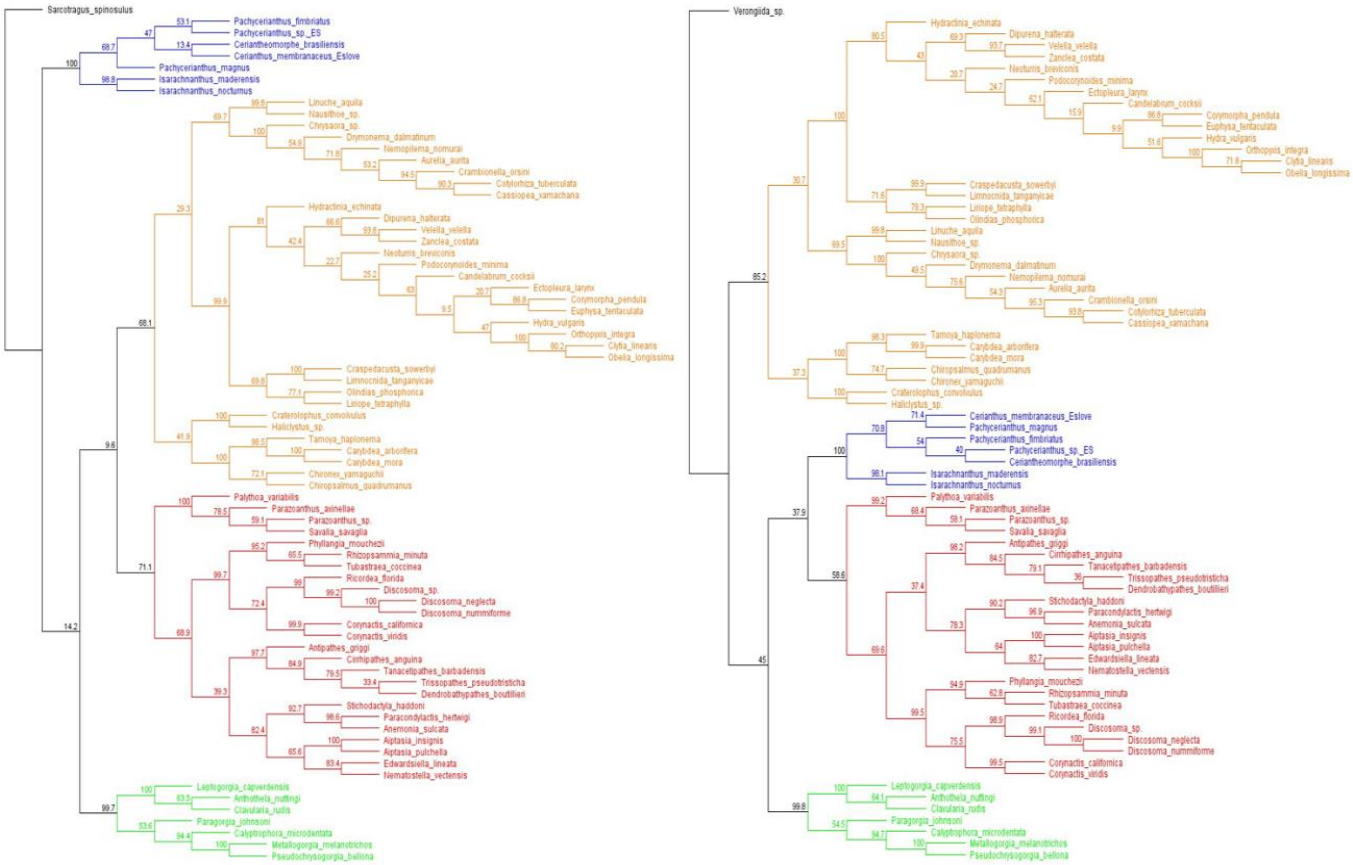


Figura 8: Reconstruções filogenéticas via PhyML utilizando espécies diferentes de Ctenophora como outgroup. Onde: Laranja (Medusozoa), Azul (Ceriantharia), Vermelho (Hexacorallia) e Verde (Octocorallia). Nota-se que Ceriantharia foi colocado em posições filogenéticas diferentes, mesmo com os grupos externos pertencentes ao mesmo filo.

Ainda não foram realizados estudos para averiguar a influência que a mudança dos grupos externos promovem na filogenia de cnidarios. Entretanto, o tema já foi abordado, por exemplo, por Ware et al., 2008. Em uma pesquisa envolvendo o grupo de artrópodes Dictyoptera e utilizando marcadores moleculares ribossomais e mitocondriais (18S, 28S e COI), foi obtido que o grupo de estudo também teve sua posição influenciada pela diferença entre grupos externos que apresentaram maior e menor proximidade com o grupo em questão.

Outro estudo sobre o tema foi realizado por de la Torre-Bárcena et al., 2009, em estudo que buscava elucidar o impacto da escolha dos grupos externos na filogenia de vegetais superiores com semente. Neste trabalho, a

posição filogenética do grupo desejado sofreu alterações dependendo da quantidade de indivíduos utilizados como grupos externos.

Em ambos os estudos foram utilizadas grandes quantidades de dados para se inferir resultados com maior precisão. Para se fazer o mesmo em Cnidaria, devem ser selecionados uma maior quantidade e maior diversidade de grupos externos.

Quando comparados os métodos de reconstrução empregados, obteve-se uma considerável divergência entre as reconstruções obtidas por máxima verossimlhança e inferência bayesiana. Estudos comparando os dois métodos vem desde Puttick et al., 2007, que inferiu que análises que utilizam o modelo de máxima versomilhança possuem menor acurácia e, sendo assim, que as análises de inferência bayesiana deveriam ser consideradas padrão para estudos filogenéticos. Posteriormente, Brown et al., 2017, realizou um estudo que contestou os resultados obtidos por Puttick, alegando que os métodos de análise de máxima verossimilhança apresentaram maior congruência do que o sugerido pelo estudo prévio

Para o presente estudo, foi obtida uma grande variação de possibilidades de filogenia de Ceriantharia nas árvores de máxima verossimilhança (as quatro possibilidades citadas anteriormente foram apresentadas por esse teste), enquanto que as árvores de bayes apontam somente para as duas principais hipóteses (Ceriantharia irmão de Octocorallia/Ceriantharia irmão de Hexacorallia), podendo ser notado também uma mudança significativa dependendo do marcador molecular empregado na reconstrução.

Quanto aos marcadores empregados, é possível notar uma grande diferença nos padrões de reconstrução. Como trata-se de um estudo envolvendo filogenia de grupos taxonomicos elevados,a escolha foi por utilizar marcadores ribossomais, pois sua baixa taxa de variação confere uma maior confiança nos resultados (Vandamme, 2009).

Os resultados obtidos pelos marcadores também apresentaram diferença de padrões. Reconstruções feitas com o marcador 18S apresentaram

uma grande variação de possibilidades filogenéticas (quatro), sendo que as com maiores frequências tratam Ceriantharia como grupo irmão de Cnidaria (36%) e como Anthozoa sendo grupo irmão de Hexacorallia (55%)

Já o marcador 28S apresentou uma variação bem menor de possibilidades de posição filogenética para as anêmonas de tubo que, em todas a reconstruções, foram colocadas como grupo irmão de Octocorallia. A única variação ocorreu quando algumas reconstruções apontaram que Ceriantharia+Octocorallia poderiam formar um grupo monofilético e irmão dos demais Cnidarios. As demais indicam Ceriantharia como anthozoário e grupo irmão dos octocorais. A diferença entre os resultados pode se dar devido à uma diferente taxa de mutação entre os marcadores utilizados, já que, mesmo ambos apresentando variação pequena, a taxa do marcador 18S ainda é menor do que a apresentada pelo 28S.

Conclusão

Para se inferir a real posição filogenética das anêmonas de tubo mais estudos ainda são necesários. Estudos esses que abranjam uma quantidade maior de dados (genomas completos, por exemplo), mas algumas conclusões podem ser inferidas dos resultados obtidos.

Primeiramente, marcadores moleculares, mesmo que pertencentes ao mesmo grupo (ribossomais, mitocondriais, etc), podem apresentar resultados diferentes, como visto acima, onde os resultados de 18S e 28S não foram totalmente congruentes para os dados analisados. Também é valido mencionar que houve diferenças entre os métodos de análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

Também pode-se destacar a variação apresentada nos resultados dependendo do grupo externo, pois houve diferença mesmo quando estes pertencem ao mesmo filo. Diferente do esperado, onde a filogenia seria semelhante quando grupos externos próximos fossem utilizados, foram obtidos casos de grande mudança da posição de Cerintharia nestas condições. Porém, mais estudos precisam ser realizados, com um universo amostral

consideravelmente maior, para que algo possa ser concluído com maior certeza.

Quanto a última variável apresentada, não foi detectada mudança no padrão de posicionamento filogenético de Ceriantharia devido a presença do também confuso grupo Myxozoa, como pensado. O novo grupo apresentou diferentes possibilidades assim como Ceriantharia, porém, nenhuma delas apresentou relação com as anêmonas.

Como análise da influência das abordages metodológicas para reconstrução filogenética de Ceriantharia, pode-se notar uma sensível variação dos resultados perante os diferentes métodos de reconstrução empregados (máxima verossimilhança e inferência bayesiana). Pode-se notar, também, que existe uma grande tendência de agrupamento deste clado como um grupo dentre os Anthozoários, e que dentro deste grupo seu parentesco mais forte se daria com o grupo de corais Octocorallia, corroborando assim a hipótese proposta por Stampar et al. 2014. Porém, as outras hipóteses, principalmente a que coloca seu parentesco mais proximamente relacionado com os Hexacorallia, não devem ser descartadas.

Referências Bibliográficas

BENTLAGE, Bastian et al. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, p. rspb20091707, 2009.

BERNTSON, Ewann A.; FRANCE, Scott C.; MULLINEAUX, Lauren S. Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 13, n. 2, p. 417-433, 1999.

BERNTSON, E. A. et al. Phylogenetic relationships within the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. **Marine Biology**, v. 138, n. 2, p. 235-246, 2001.

BIELEJEC, Filip et al. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. **Bioinformatics**, v. 27, n. 20, p. 2910-2912, 2011.

BLOUIN, Michael S. et al. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 12, p. 1719-1727, 1998.

BORNER, Janus et al. A transcriptome approach to ecdysozoan phylogeny. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 80, p. 79-87, 2014.

BRIDGE, Diane et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. **Proceedings of the National academy of Sciences**, v. 89, n. 18, p. 8750-8753, 1992.

BRIDGE, Diane et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 679-689, 1995.

BROWN, Joseph W. et al. On the importance of credibility: Bayesian and likelihood phylogenetic reconstructions of morphological traits are concordant. A comment on Puttick et al. **bioRxiv**, p. 114793, 2017.

CHANG, Jia-Ming; DI TOMMASO, Paolo; NOTREDAME, Cedric. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 6, p. 1625-1637, 2014.

CHEN, C. A. et al. Systematic relationships within the Anthozoa (Cnidaria: Anthozoa) using the 5′-end of the 28S rDNA. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 4, n. 2, p. 175-183, 1995.

COLLINS, Allen G. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, n. 3, p. 418-432, 2002.

COLLINS, Allen G. et al. 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**, v. 55, n. 1, p. 97-115, 2006.

COLLINS, Allen G. Recent insights into cnidarian phylogeny. **Smithsonian contributions to the marine sciences**, n. 38, 2009.

CRUICKSHANK, Robert H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic and Applied Acarology**, v. 7, n. 1, p. 3-14, 2002.

DALY, Marymegan; FAUTIN, Daphne G.; CAPPOLA, Valerie A. Systematics of the hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 139, n. 3, p. 419-437, 2003.

DALY, Marymegan et al. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. 2007.

DAWSON, Michael N. Five new subspecies of Mastigias (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) from marine lakes, Palau, Micronesia. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 679-694, 2005.

DE LA TORRE-BÁRCENA, Jose Eduardo et al. The impact of outgroup choice and missing data on major seed plant phylogenetics using genome-wide EST data. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5764, 2009.

DRUMMOND, Alexei J.; RAMBAUT, Andrew. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 214, 2007.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FELSENSTEIN, Joseph. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

GUINDON, Stéphane et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

HESSINGER, David A.; LENHOFF, Howard M. **Biology of nematocysts**. Academic Press, 1988.

HO, Simon YW. An examination of phylogenetic models of substitution rate variation among lineages. **Biology letters**, v. 5, n. 3, p. 421-424, 2009.

HUELSENBECK, John P.; CRANDALL, Keith A. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, n. 1, p. 437-466, 1997.

HYMAN, Libbie Henrietta. **The Invertebrates: smaller coelomate groups**. McGraw-Hill, 1940.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KAYAL, Ehsan et al. Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. **Genome biology and evolution**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2011.

KAYAL, Ehsan et al. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 5, 2013.

KAYAL, Ehsan et al. Comprehensive phylogenomic analyses resolve cnidarian relationships and the origins of key organismal traits. **PeerJ Preprints**, 2017.

KELCHNER, Scot A.; THOMAS, Michael A. Model use in phylogenetics: nine key questions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2007.

KITAHARA, Marcelo V. et al. The “naked coral” hypothesis revisited–evidence for and against scleractinian monophyly. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94774, 2014.

LANFEAR, Robert et al. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. **BMC evolutionary biology**, v. 14, n. 1, p. 82, 2014.

LIU, Yang et al. Mitochondrial phylogenomics of early land plants: mitigating the effects of saturation, compositional heterogeneity, and codon-usage bias. **Systematic biology**, v. 63, n. 6, p. 862-878, 2014.

MADDISON, Wayne P. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. **Evolution**, v. 62, p. 1103-1118, 2008.

MANUEL, Richard L. **British anthozoa**. Published for the Linnean Society of London and the Estuarine and Brackish-water Sciences Association by Academic Press, 1981.

MCMURRICH, James Playfair. **The Actiniaria of the Siboga Expedition**. EJ Brill, 1910.

MARQUES, Antonio C.; COLLINS, Allen G. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. **Invertebrate Biology**, v. 123, n. 1, p. 23-42, 2004.

PARK, Eunji et al. Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 62, n. 1, p. 329-345, 2012.

PUTTICK, Mark N. et al. Uncertain-tree: discriminating among competing approaches to the phylogenetic analysis of phenotype data. In: **Proc. R. Soc. B**. The Royal Society, 2017. p. 20162290.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PRATLONG, Marine et al. Monophyly of Anthozoa (Cnidaria): why do nuclear and mitochondrial phylogenies disagree?. **Zoologica Scripta**, v. 46, n. 3, p. 363-371, 2017.

RIPPLINGER, Jennifer; SULLIVAN, Jack. Does choice in model selection affect maximum likelihood analysis?. **Systematic Biology**, v. 57, n. 1, p. 76-85, 2008.

RODRÍGUEZ, Estefanía et al. Hidden among sea anemones: the first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96998, 2014.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SALEMI, Marco; LEMEY, Philippe; VANDAMME, Anne-Mieke (Ed.). **The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. Cambridge University Press, 2009.

SONG, Jun-Im; WON, Jung Hye. Systematic relationship of the anthozoan orders based on the partial nuclear 18S rDNA sequences. **Korean Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 43-52, 1997.

SPALDING, Mark D. et al. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. **BioScience**, v. 57, n. 7, p. 573-583, 2007.

STAMATAKIS, Alexandros; HOOVER, Paul; ROUGEMONT, Jacques. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771, 2008.

STAMPAR, Sergio N. et al. Evolutionary diversification of banded tube-dwelling anemones (Cnidaria; Ceriantharia; Isarachnanthus) in the Atlantic Ocean. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41091, 2012.

STAMPAR, Sergio N. et al. Fast-evolving mitochondrial DNA in Ceriantharia: a reflection of hexacorallia paraphyly?. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86612, 2014.

STAMPAR, Sérgio N.; MORANDINI, André C. Occurrence of Isarachnanthus (Cnidaria: Anthozoa: Ceriantharia) at Ascension Island: a test of hypothesis. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 97, n. 4, p. 689-693, 2017.

STEEL, Mike; PENNY, David. Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 6, p. 839-850, 2000.

STOCSITS, Roman R. et al. Accurate and efficient reconstruction of deep phylogenies from structured RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, p. 6184-6193, 2009.

SWOFFORD, David L. et al. Phylogenetic inference. 1996.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

van Beneden, E. (1898) Les Anthozoaires de la “Plankton-Expedition”**. Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humbolt-Stiftung**, 2, 1-222

VANDAMME, Anne-Mieke. Basic concepts of molecular evolution. **The Phylogenic Handbook-A practical approach to DNA and protein phylogeny**, p. 1-23, 2003.

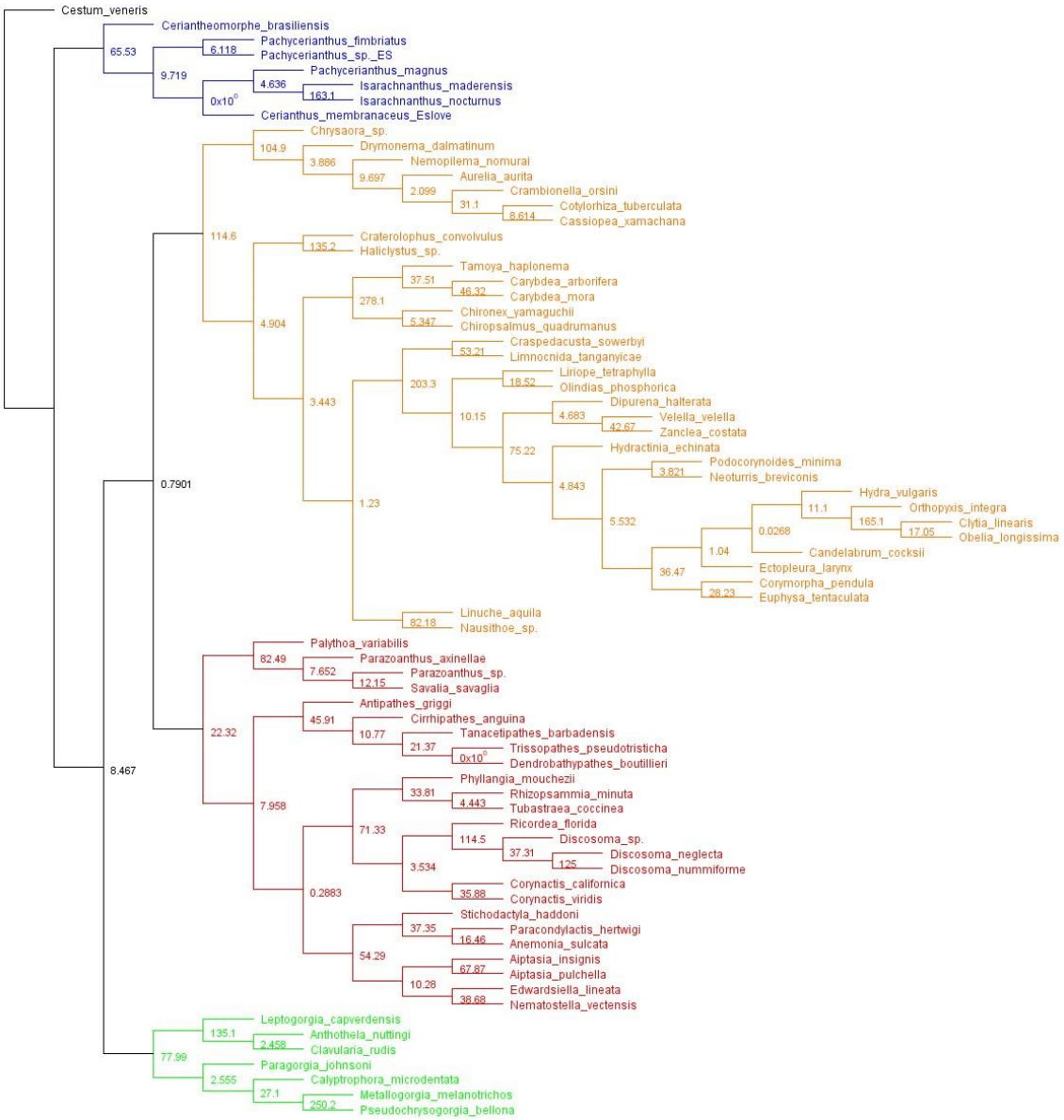
WON, J.; RHO, B.; SONG, J. A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. **Coral Reefs**, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2001.

ZAPATA, Felipe et al. Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139068, 2015.

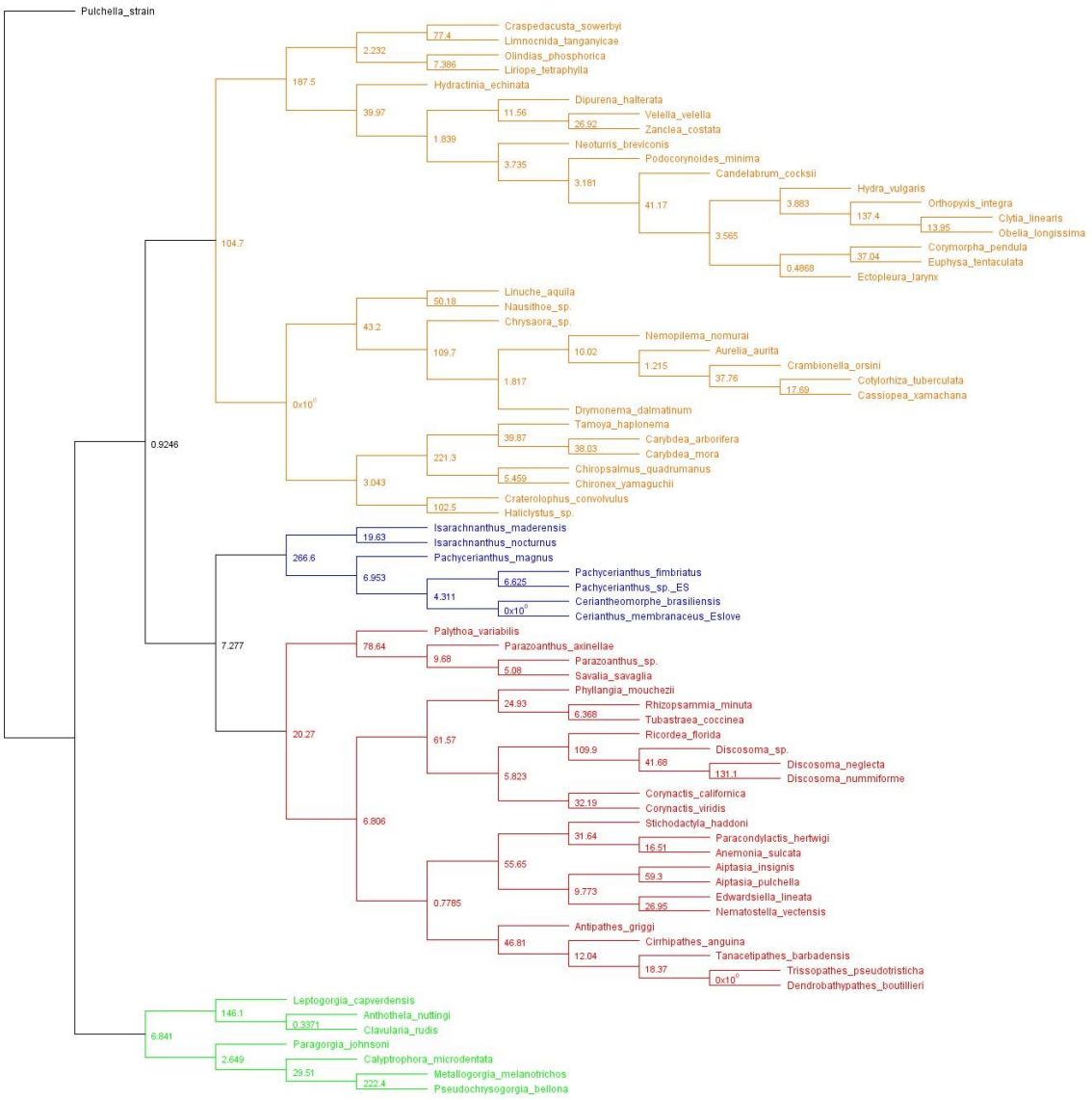
ZWICKL, Derrick Joel. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. 2006. Tese de Doutorado.

WARE, Jessica L. et al. Relationships among the major lineages of Dictyoptera: the effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology. **Systematic Entomology**, v. 33, n. 3, p. 429-450, 2008.

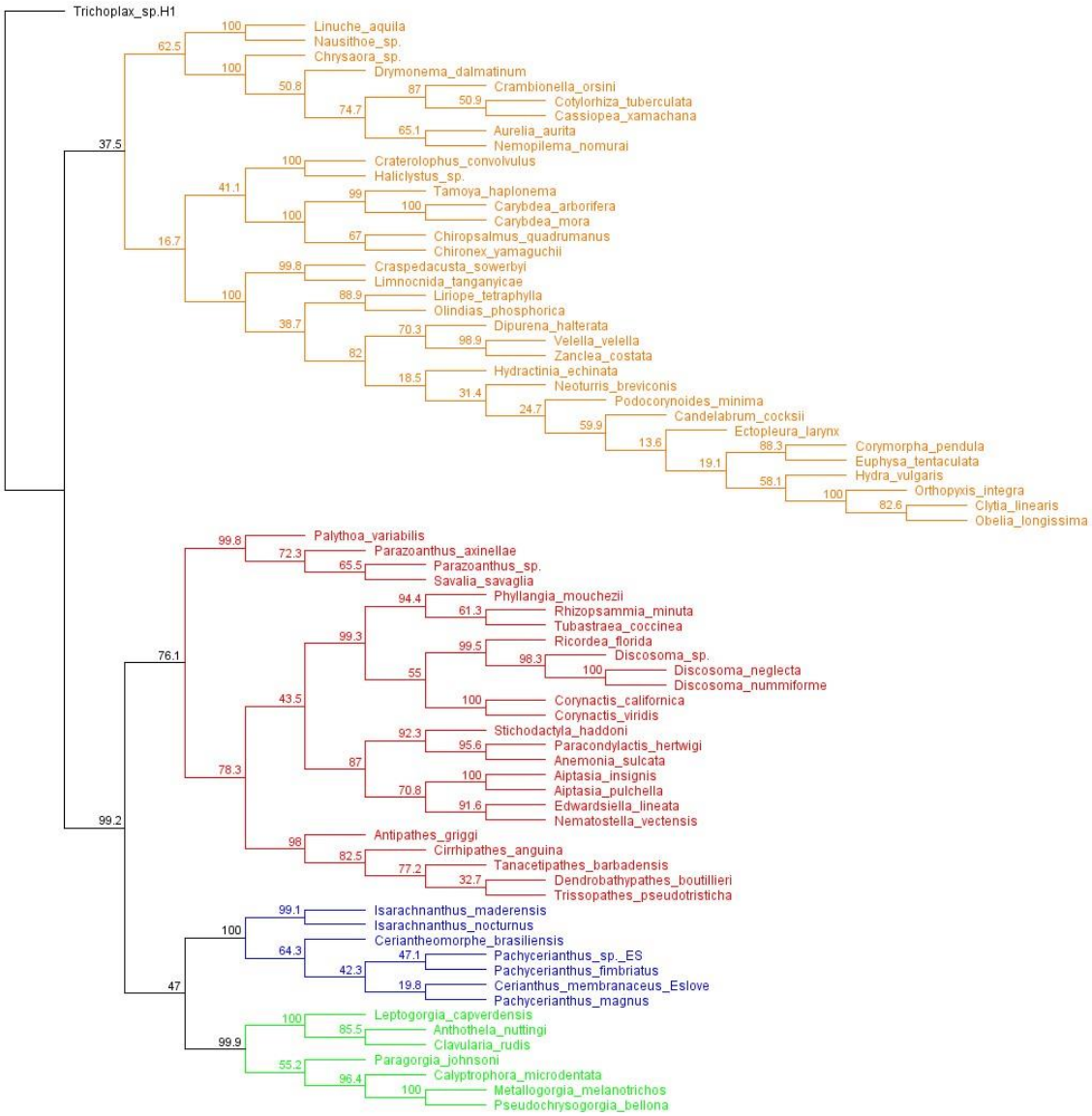
Anexos



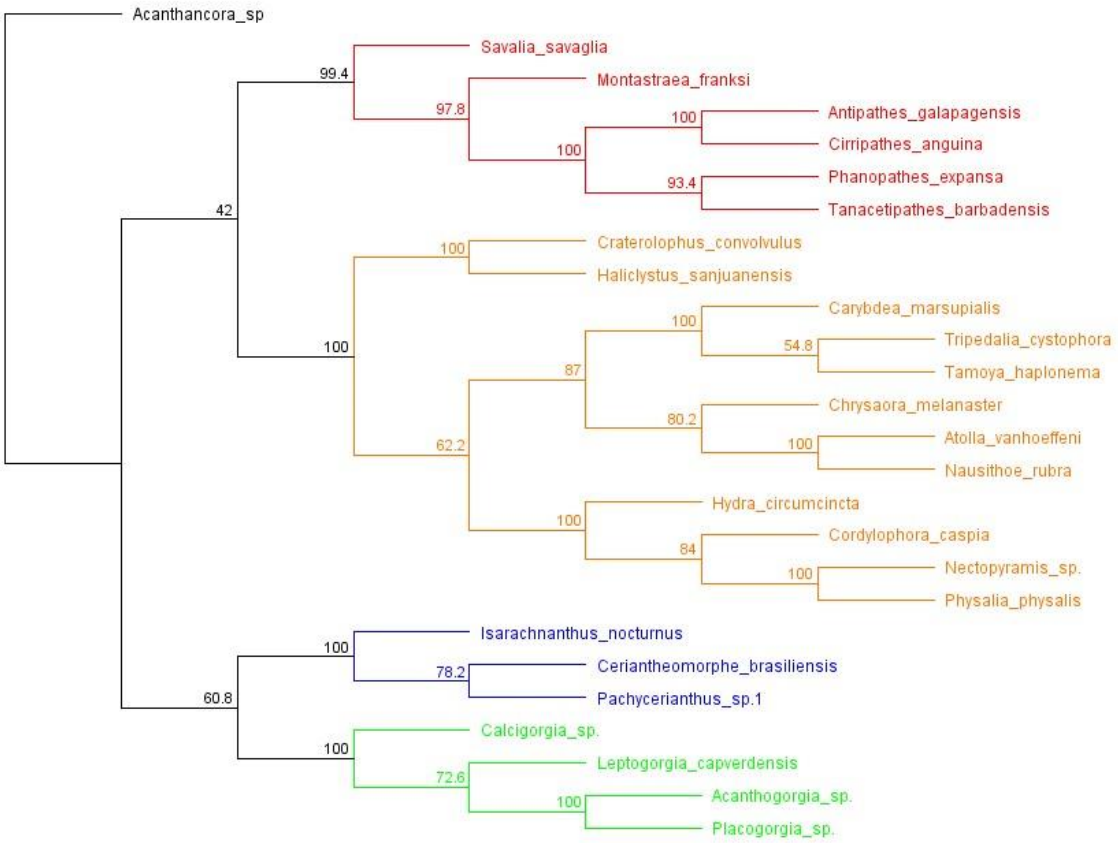
Anexo 1: Reconstrução Filogenética de máxima verossimilhança, com o marcador 18S, onde Ceriantharia está posicionado como grupo irmão de Cnidaria. Esta topologia se repetiu 65 vezes



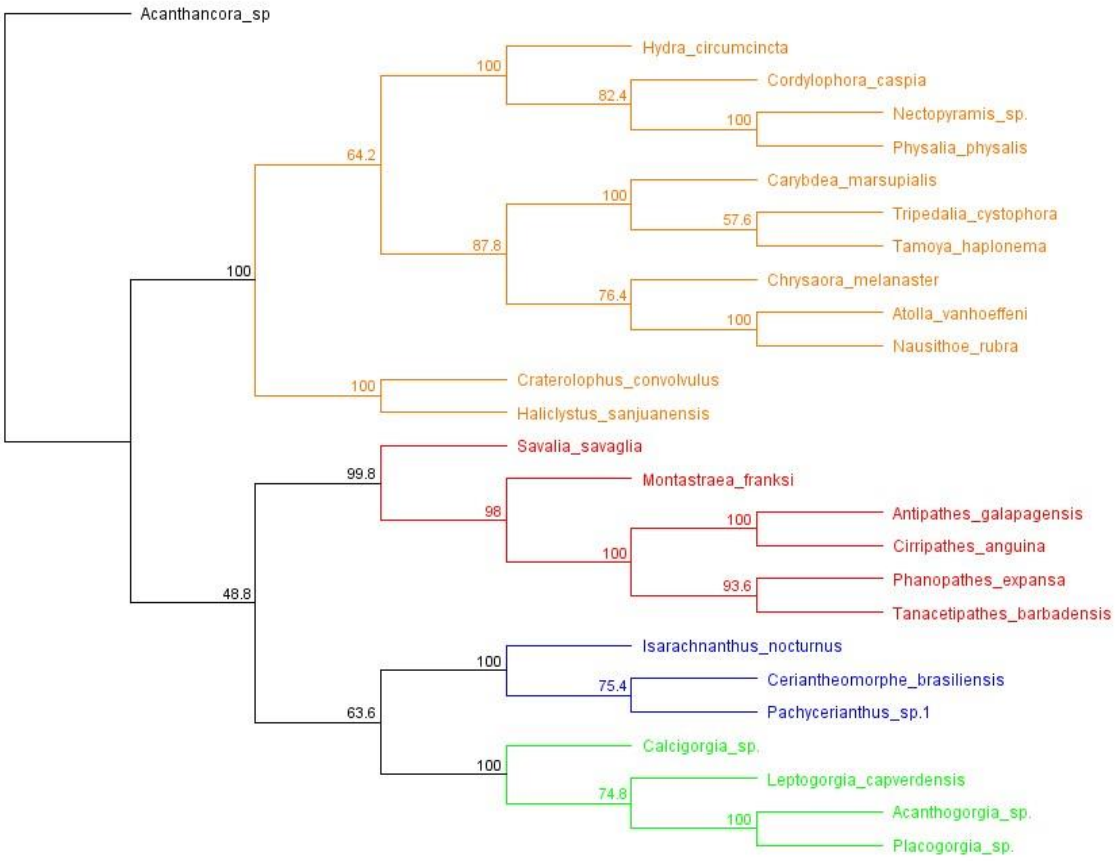
Anexo 2: Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança com o marcador 18S, onde Ceriantharia está posicionado como antozoário e irmão de Hexacorallia. Esta topologia se repetiu 92 vezes nas séries de recontruções.



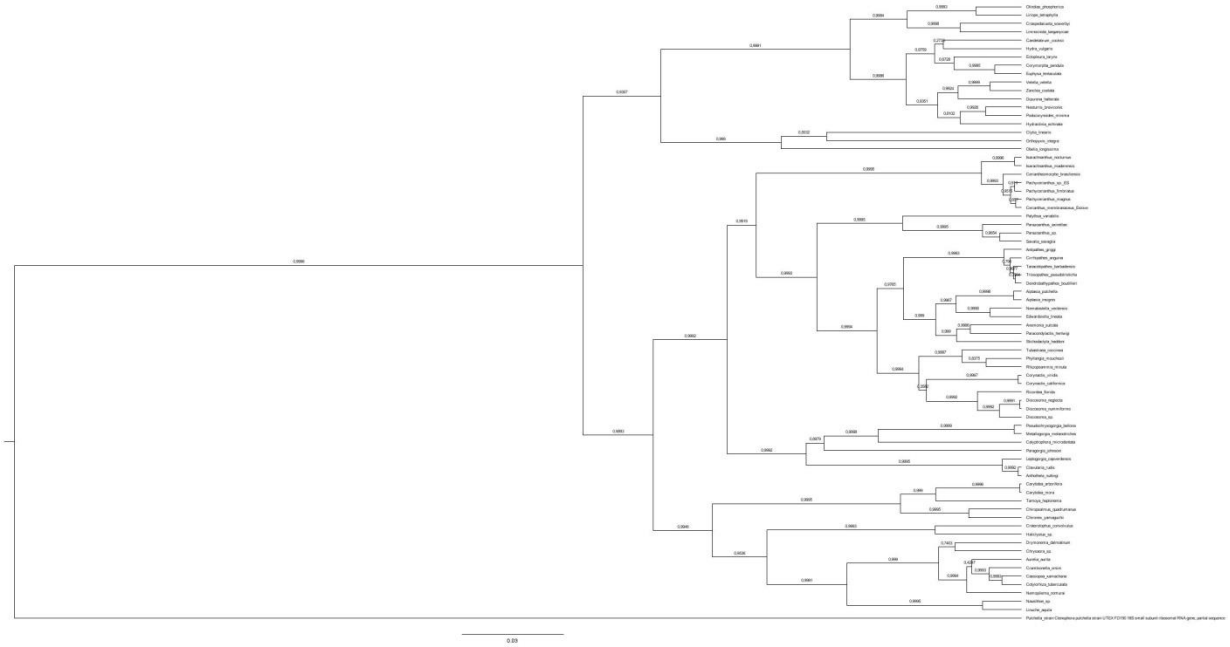
Anexo 3: Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança, com o marcador 18S, onde Ceriantharia está posicionado como antozoário e grupo irmão de Octocorallia. Esta topologia se repetiu 17 vezes nas séries de reconstruções.



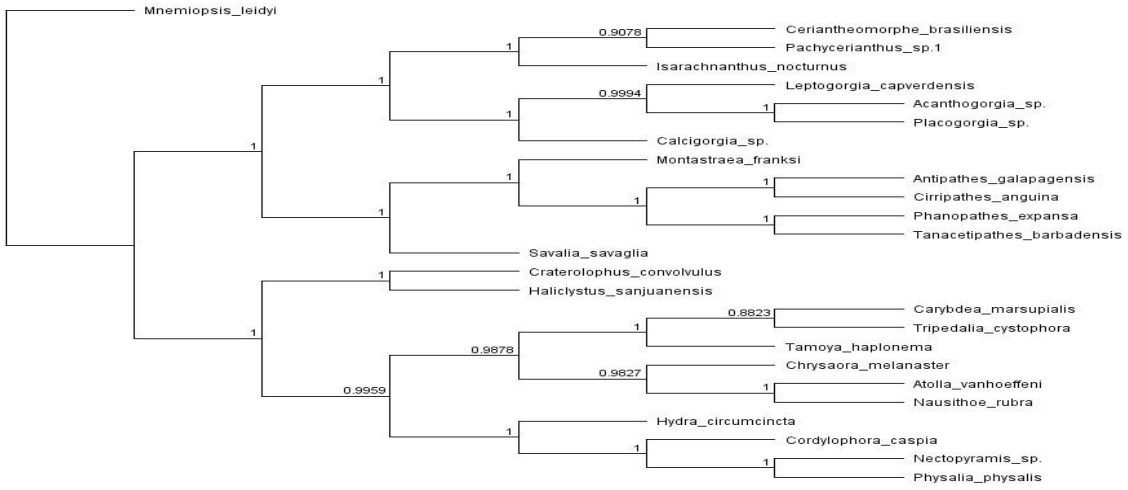
Anexo 4: Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança com o marcador 28S, onde Ceriantharia está posicionado como grupo irmão de Octocorallia e ambos formando um clado irmão de Cnidaria. Esta topologia se repetiu 5 vezes.



Anexo 5: Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança com o marcador 28S, onde Ceriantharia está posicionado como antozoário e grupo irmão de Octocorallia. Esta topologia se repetiu 169 vezes.



Anexo 6: Reconstrução de Inferência bayesiana com o marcador 18S, onde Ceriantharia está posicionado com antozoário e grupo irmão de Hexacorallia. Esta topologia se repetiu por 6 vezes.



Anexo 7: Reconstrução de Inferência Bayesiana com o marcador 28S, onde Ceriantharia está posicionado como antozoário e grupo irmão de Octocorallia. Esta topologia se repetiu 6 vezes.