

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA

**Posição filogenética de linhagens de Phyllobothriidae
(Eucestoda: Tetraphyllidea) parasitas de raias de água doce
(Chondrichthyes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae) baseada
em otimização direta de dados moleculares**

Denis Jacob Machado

São Vicente

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA

**Posição filogenética de linhagens de Phyllobothriidae
(Eucestoda: Tetraphyllidea) parasitas de raias de água doce
(Chondrichthyes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae) baseada
em otimização direta de dados moleculares**

Bacharelando: Denis Jacob Machado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Julia Fernandes
Cardoso de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Portella de
Luna Marques

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas,
modalidade Biologia Marinha.

São Vicente

2009

Machado, Denis Jacob

Posição filogenética de linhagens de Phyllobothriidae (Eucestoda: Tetraphyllidea) parasitas de raias de água doce (Chondrichthyes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae) baseada em otimização direta de dados moleculares. / Denis Jacob Machado - São Vicente, 2009.

23 p.

Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista.

Orientadora: Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

Co-orientador: Fernando Portella de Luna Marques

1. Filogenia 2. Sistemática molecular

CDD 575.012

Palavras-chaves: Phyllobothriidae, IsrDNA, ssrDNA, otimização direta,
Rhinebothriidea.

Sal,

As dedicatórias serão sempre suas.

Vamos para a próxima!

**O Homem é incapaz de produzir um único trabalho sem a assistência do
lento,assíduo, corrosivo verme do pensamento.**

Eugenio Montale

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças ao apoio financeiro da FAPESP (processo 2009/00886-3) e à colaboração dos membros Laboratório de Helminologia Evolutiva e do Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Zoologia/IB/USP. Expresso minha gratidão a este Departamento, bem como à todo Instituto de Biociências e à Universidade de São Paulo por me acolherem durante o período de realização deste trabalho. Sou especialmente grato à Natalia da Mata Luchetti, pela montagem dos testemunhos, e à Maíra Concistré, pelo trabalho técnico que foi imprescindível para obtenção dos dados moleculares.

Sabrina Baroni e Karin Hoch Fehlaeur Ale, de certa forma vocês foram minhas tutoras e muito do que eu aprendi nos últimos dois anos foi graças à vocês. Sabrina, você foi obrigada a me tutoriar por mais tempo, por isso seu nome está na frente.

Nunca vou poder retribuir à ajuda e ao companheirismo do Almir Rogério Pepato, da Verônica Mantovani Bueno e do Maximiliano Maronna. Suas idéias e intervenções críticas foram muito valiosas e eu espero tê-las sempre por perto.

Cláudia Tangerino Olivares, amiga e mestra, muitos dos seus erros se tornaram meus acertos! Não há como agradecer-la pelo companheirismo e pela alegria que você me dá. Então não vou.

Não posso deixar de agradecer à Grace A. Wyngaard, uma amizade e uma professora inesperadas. Grace, I will always be thankful for the gift of helping me to learn more about systematic and friendship.

Todos estes agradecimentos são para pessoas que eu só conheci graças ao Fernando Portella de Luna Marques. Chefe, obrigado pelas oportunidades, obrigado pela orientação e obrigado pela amizade. Estou me divertindo muito e espero que você também!

Caro Augusto Alberto Valero Flores, foi você quem deu a dica! Sempre estarei em débito.

Quando eu precisei, a Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira estendeu a mão e permitiu a continuidade deste trabalho. Foi por pouco! Obrigado por tudo.

Finalmente, Bianca Regina da Hora, chegou a sua vez. Deixei você por último porque não encontrava palavras quem expressassem toda a minha gratidão à você. Se você ficar por perto, talvez eu as encontre da próxima vez...

RESUMO

Membros de Potamotrygonidae são elasmobrânquios estenohalinos endêmicos dos sistemas fluviais da região Neotropical, cujo o ancestral das aproximadamente 20 espécies reconhecidas provavelmente derivou de uma raia marinha durante as ingressões marinhas ao norte da América do Sul. A história biogeográfica destes hospedeiros impingiu padrões de diversificação em sua fauna parasitária composta de elementos endêmicos dos sistemas fluviais sul-americanos, bem como de linhagens compartilhadas com elasmobrânquios marinhos. Diante das discrepâncias entre as hipóteses de origem e diversificação destas raias, tanto daquelas sustentadas por dados provenientes do hospedeiro quanto das embasadas em informações parasitológicas, evidencia-se a necessidade de se examinar mais detalhadamente este sistema parasita/hospedeiro. Dentro deste contexto, este trabalho atende à urgência de se identificar a posição filogenética de três gêneros de filobotriídeos parasitas de potamotrigonídeos, através da otimização direta de dados moleculares (18S e 28S rDNA). Resultados preliminares são apresentados que confirmam a validade de *Rhinebothroides* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 como um clado derivado em relação aos demais céstodas de Rhinebothriidea. *Rhinebothroides* é grupo-irmão de linhagens dulcícolas de *Rhinebothrium* Linton, 1889, o qual assume uma condição polifilética em nossa análise. *Nandocestus* Reyda, 2008 é pela primeira vez contemplado em uma análise filogenética, ocupando posição derivada dentro do grupo-irmão de Rhinebothriidea e compartilhando um ancestral exclusivo com o gênero *Thysanocephalum* Linton, 1889.

Palavras-chave: Phyllobothriidae, lsrDNA, ssrDNA, homologia dinâmica, Rhinebothriidea.

ABSTRACT

Members of the family Potamotrygonidae are stenohaline elasmobranchs endemic to the South American river systems. The ancestor of the nearly 20 recognized species of this group probably derived from a marine ray during marine incursions at the north of this continent. The biogeographic history of these hosts imposed certain patterns of diversification over their parasitic fauna, which is composed of both exclusive freshwater stingrays parasites and other lineages shared with marine elasmobranchs. The need of further analysis of this host-parasite system came from the discrepancies among distinct biogeographic scenarios proposed to explain the diversification of this element of the Neotropical fauna, based on host and/or parasite data. This study was proposed in order to fulfill the urgency to identify the phylogenetic position of freshwater lineages of Phyllobothriidae in this context, using for that purpose the Direct Optimization algorithm for complete 18S and partial (D1-D3) 28S rDNA. Rhinebothriidea is corroborated and the validity of *Rhinebothroides* Mayes, Brooks & Thorson, 1981, a phyllobothriid that is found only in potamotrygonids' spiral valves and occupies a derived position within this order. *Rhinebothroides* is sister-group of freshwater lineages of *Rhinebothrium* Linton, 1889, which is polyphyletic. *Nandocestus* Reyda, 2008 is for the first time included in a systematics analysis based on molecular data, sharing an exclusive common ancestor with *Thysanocephalum* Linton, 1889 and occupying a derived position inside the sister group of Rhinebothriidea. These observations are based on preliminary results.

Palavras-chave: Phyllobothriidae, 18S rDNA, 28S rDNA, Dynamic Homology, Rhinebothriidea.

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
1.Introdução	01
2.Materiais e métodos	
2.1. Coletas e processamento de material biológico	06
2.2. Preparação de testemunhos para microscopia óptica e identificação taxonômica	07
2.3. Obtenção de dados moleculares	
2.3.1. Triagem de parasitas e obtenção de testemunhos	07
2.3.2. Extração de DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento	07
2.3.3. Análise filogenética	09
2.3.4. Edição das topologias obtidas	14
3. Resultados e discussão	
3.1. Confrontando a topologia obtida com as hipóteses filogenéticas de Healy et al. (2009): corroboração de Rhinebothriidea e outras considerações	15
3.2. Posição filogenética e status taxonômico de <i>Nandocestus</i> Reyda, 2008	18
3.3. <i>Rhinebothoides</i> como uma linhagem derivada de Rhinebothriidea, polifilia de <i>Rhinebothrium</i> Linton, 1889 e os clados dulcícolas	19

4.Considerações finais	22
5.Referências	24
Anexo 1: Coletas	32
Anexo 2: Banco de dados externo	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Espécimes sequenciados	08
Tabela 2 – Iniciadores (“primers”)	09
Tabela 3 – Protocolo padrão de termociclador	10
Tabela 4 – Sequências contíguas	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - “Script” de busca heurística para POY	13
Figura 2 – Árvore evidência total (18S e 28s rDNA)	16
Figura 3 – Principais clados encontrados	17
Figura 4 – Clados dulcícolas	20

1.INTRODUÇÃO

Phyllobothriidae Braun, 1900 é uma família polifilética (Healy, 2009) na qual se inserem gêneros de Eucestoda parasitas das raias de água doce sul-americanas (Chondrichthyes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae). Destes, *Rhinebothrium* Linton, 1889 e *Anindobothrium* Marques, Brooks & Lasso, 2003 possuem congêneres hospedados em elasmobrânquios marinhos e tem, portanto, o potencial de possuírem informação filogenética que permita elucidar a história de derivação destes hospedeiros. Os demais gêneros (*Rhinebothroides* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 e *Nandocestus* Reyda, 2008) são endêmicos das bacias sul-americanas e podem fornecer dados que ajudem a elucidar as associações históricas entre potamotrigonídeos e seus helmintos após a divergência do ancestral marinho.

Associações históricas podem ser abordadas em três níveis hierárquicos distintos, a saber: entre genes e organismos, organismos (parasitas) e organismos (hospedeiros), e organismos e áreas (Baum, 1992; Doyle, 1992; Page, 1993; Page & Charleston, 1998). Embora cada nível envolva processos biológicos distintos, os padrões filogenéticos esperados são idênticos (Page & Charleston, 1998), permitindo o desenvolvimento e a aplicação de um único método de inferência em estudos de associação histórica (Charleston & Perkins, 2006). Tais estudos inserem-se dentro do contexto da sistemática filogenética, apresentada Hennig (1966) como um método de classificação que considera agrupamentos monofiléticos baseados em hipóteses filogenéticas suportadas por sinapomorfias. Desde sua concepção e subsequente desenvolvimento metodológico (Farris, 1972, 1979, 1982a, 1982b; Nelson & Platnick, 1981; Wiley, 1981; entre outros), todas as subdisciplinas da Biologia Comparada sofreram reformulações teóricas e os estudos de associações entre parasitas e hospedeiros integraram estes novos métodos em sua prática (Page & Charleston, 1998).

Atualmente, mesmo que as particularidades dos métodos de inferência em associação histórica estejam em pleno debate na literatura (e.g., Brooks & McLennan, 1993; Page, 2003; Arias et al., 2008; Fattorini, 2008; Hoberg & Brooks, 2008; Kodandaramaiah, 2009) é consenso de que a definição e circunscrição precisa das linhagens que atuam nestas associações sejam bem estabelecidas antes da escolha do método (Ronquist, 2003). Caira & Jensen (2001) postularam a necessidade de que pelo menos cinco critérios devam ser atendidos para que as associações históricas entre parasitas e hospedeiros possam ser compreendidas: (i) hospedeiros e parasitas devem formar grupos monofiléticos; (ii) hospedeiros e parasitas devem ter sido corretamente identificados; (iii) filogenias razoavelmente acuradas de hospedeiros e parasitas devem estar disponíveis; (iv) os hospedeiros devem ter sido razoavelmente amostrados e (v) os parasitas devem exibir um considerável grau de especificidade aos seus hospedeiros. Apesar de críticas que possam ser endereçadas a cada um destes critérios em particular, a necessidade de filogenias acuradas é caracterizada uma vez que virtualmente todas as questões sobre a evolução de linhagens biológicas requerem hipóteses de relações de parentesco (Futuyma, 1992).

Uma vez que associações entre, por exemplo, hospedeiros e seus parasitas possam ter uma longa história evolutiva, refletida em similaridades entre suas filogenias (Hafner & Nadler, 1988; Hafner et al., 1994), sua investigação tem potencial para expandir o conhecimento sobre os processos responsáveis pela diversificação dos grupos (Brooks et al., 1981; Klassen, 1992; Ronquist, 2003) e a informação genética dos associados pode ajudar a completar os dados genéticos dos seus hospedeiros (para uma revisão veja Nieberding & Olivieri, 2007). Um exemplo exemplo é o estudo clássico de Brooks et al. (1981) sobre a associação histórica entre Potamotrygonidea e sua fauna parasitária.

Potamotrygonidae agrupa cerca de 20 espécies reconhecidas que estão

divididas em três gêneros: *Paratrygon* Duméril, 1865; *Potamotrygon* Garman, 1913; e *Plesiotrygon* Rosa, Castello e Thorson, 1987 (Marques, 2000; Carvalho et al., 2003). Estes gêneros constituem um grupamento monofilético (o que não implica que as linhagens de parasitas que neles se hospedam o sejam) que provavelmente colonizou a América do Sul em um único evento de invasão (Carvalho et al., 2004), atualmente se distribuindo pelas bacias dos rios Atrato e Magdalena (Colômbia), Orinoco (Venezuela), Lago de Maracaibo (Venezuela), Parnaíba (MA, PI), Uruguai, Paraná, Paraguai e La Plata, além da bacia Amazônica (Equador, Colômbia, Peru, Bolívia e Brasil) e pelos rios das Guianas e do Suriname (Thorson, 1970; Thorson et al., 1978, 1983; Rosa, 1985; Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; Carvalho et al., 2003; Rosa et al., 2008). Sendo os únicos elasmobrânquios estenohalinos endêmicos dos sistemas fluviais da região Neotropical, o debate sobre sua origem tomou posição de destaque dentro da biogeografia histórica desde a publicação do trabalho pioneiro de Brooks et al. (1981). As discussões giram em torno, principalmente, do grupo-irmão dos potamotrigonídeos, da natureza dos dados empregados para inferir hipóteses de diversificação para esta família e da idade do evento de vicariância que permitiu ao seu ancestral adentrar o continente, embora haja consenso de que uma introgressão marinha foi o mecanismo responsável por esta ocupação (Carvalho et al., 2004). Segundo alegou Reyda (2007), a limitação imposta pela má resolução das filogenias de alguns grupos importantes de parasitas pode ser um dos motivos para não se ter uma proposta definitiva para a história de derivação das raias de água doce neotropicais, apesar de muitas já terem sido apresentadas (Marlier, 1967; Roberts, 1972; Brooks et al., 1981; Lovejoy, 1997; Lovejoy et al., 1998; Marques, 2000; Carvalho, 2004).

O uso de dados parasitológicos para inferir a história de derivação de Potamotrygonidade depende do desenvolvimento da sistemática de seus helmintos. Dentre eles, Tetraphyllidea destaca-se por ser o grupo de cestódeos

mais prevalente e diversificado deste sistema parasita/hospedeiro. Esta ordem, presumidamente polifilética (Hoberg et al., 1997; Caira & Jensen, 2001; Olson et al., 1999; Waeschenbach et al., 2007; Healy et al., 2009), é altamente diversificada, tanto morfológica quanto em número de espécies, e responde por aproximadamente 60% das 800 espécies de Cestoda registradas para elasmobrânquios (Roberts & Janovy Jr., 1996; Caira et al., 1999). Reconhecem-se cerca de 400 espécies, 64 gêneros e oito famílias de tetrafilídeos (Euzet, 1994; Caira et al., 2006). Phyllobothriidae são tetrafilídeos cuja composição e relação de parentesco é muito pouco conhecida. Nesta família, pelo menos quatro gêneros são inseridos (i.e., *Rhinebothrium*, *Rhinebothroides*, *Anindobothrium* e *Nandocestus*), para os quais encontramos representantes em potamotrigonídeos. Atualmente não conhecemos a posição filogenética de *Anindobothrium* e *Nandocestus*, nem mesmo a relação filogenética entre os membros dulcícolas de *Rhinebothrium* e seus congêneres marinhos. Também é incerta a existência de suporte molecular para *Rhinebothroides*, uma vez que estudos preliminares sugeriram que o gênero está inserido em *Rhinebothrium*, o qual provavelmente não constitui um grupo natural.

A construção de hipóteses evolutivas que elucidem os problemas sistemáticos apresentados acima pode se basear em caracteres de origens diversas, como evidências morfológicas (para uma discussão acerca das bases lógicas para caracteres morfológicos, veja Sereno, 2007) e/ou moleculares, sendo que o único pré-requisito é que a fonte de informação seja hereditária. Para este fim, dados moleculares não podem ser consideradas nem mais nem menos informativos do que caracteres morfológicos (Futuyma, 1992), ou qualquer outra fonte de dados(e.g., comportamental). No entanto, nos últimos anos a prevalência de dados moleculares em sistemática tem se tornado evidente.

Estimativas filogenéticas abordando dados de origem molecular e/ou

morfológica possuem igualmente prós e contras e, embora estudos que usem tanto dados moleculares quanto morfológicos provejam geralmente melhores descrições dos processos evolutivos, há problemas que só podem ser respondidos por dados de uma das duas origens (Moritz & Hillis, 1996). Por exemplo, a sistemática de grupos predominantemente representados por formas parasitárias é baseada principalmente em caracteres morfométricos e/ou em combinações destes (Du Preez & Maritz, 2006). Restrições quanto ao número de caracteres disponíveis dessa natureza são frequentemente observadas (Criscione et al., 2005), assim como estudos que empregam caracteres morfológicos ambíguos. Desta forma, dados moleculares surgem como uma alternativa para solucionar incongruências nas relações filogenéticas destes organismos bem como na delimitação de espécies.

Dentro do contexto exposto acima, este trabalho visa identificar a posição filogenética de quatro gêneros de tetrafilídeos (*Rhinebothrium*, *Rhinebothroides*, *Anindobothrium* e *Nandocestus*), pertencentes à família Phyllobothriidae, com base na análise cladística de segmentos completos e/ou parciais dos genes nucleares 18S e 28S (D1-D3) rDNA, incluindo dados originais (e.g., *Nandocestus*, aqui sequenciados pela primeira vez) assim como um banco de dados que contempla um grande número de linhagens de filobotrídeos marinhos para esses genes (Healy et al., 2009).

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Coletas e processamento de material biológico

O material disponibilizado para estes estudo é resultado de 22 atividades de campo realizadas pelo Laboratório de Helminologia Evolutiva (LHE – Departamento de Zoologia/ Instituto de Biociências/ Universidade de São Paulo) durante o período de 1996 a 2007 nos estados do Acre, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rio Grande do Norte e Tocantis. O acúmulo deste material biológico decorreu da execução de projetos financiados pela FAPESP (Procs. Nos. 03/01816-2 e 05/01299-3). Ao todo, 111 válvulas espirais de aproximadamente 30 espécies de potamotrigonídeos potencialmente distintas (incluindo 16 espécies reconhecidas e diversas morfo-espécies) foram analisadas para obtenção do material empregado neste estudo. Os hospedeiros foram obtidos utilizando diferentes métodos de captura (e.g., espinhéis, arpões e redes de arrasto). A representatividade biogeográfica destas amostras inclui cinco das nove bacias hidrográficas brasileiras definidas segundo a Agência Nacional de Águas (ANA) (**Anexo 1**) e a informação acerca de cada hospedeiro está disponível no site www.ib.usp.br/hpc/.

Durante as coletas, os hospedeiros separados para estudos moleculares foram anestesiados e tiveram suas válvulas espirais removidas por uma incisão longitudinal e fixadas em ETOH 92-100%. Todas as válvulas foram triadas em laboratório, sob estereomicroscópio. Parasitas de 16 destas válvulas foram selecionados para os estudos moleculares de acordo com o gênero, espécie do hospedeiro e localidade.

2.2. Preparação de testemunhos para microscopia óptica e identificação taxonômica

Testemunhos (“vouchers”) de Phyllobothriidae foram hidratados em séries alcoólicas regressivas, corados com corante regressivo Hematoxilina de Mayer, desidratados em séries alcoólicas progressivas, diafanizados em Salicilato de Metila e montados em lâmina e lamínula com Bálsamo do Canadá. Após a montagem, os exemplares foram identificados sob o microscópio óptico e identificados segundo dados morfométricos e merísticos até o nível taxonômico mais inclusivo possível.

2.3. Obtenção de dados moleculares

2.3.1. Triagem de parasitas e obtenção de testemunhos

A seleção dos espécimes se deu, em grande parte, de acordo com a disponibilidade de material estocado de forma adequada para a posterior extração de dados moleculares. O sequenciamento de 18S e 28S rDNA procurou contemplar pelo menos 2 espécimes de cada espécie para cada localidade e hospedeiro. Todos os espécimes originais analisados no presente estudo estão relacionados na **Tabela 1**, assim como sua espécie, hospedeiro, local de origem e data de coleta. Cada espécime foi fotografado e posteriormente dividido em três partes, para que o escólex e os segmentos terminais fossem preparados como testemunhos (“*vouchers*”), os quais serão posteriormente depositados na coleção helmintológica do Museu de Zoologia da USP (MZUSP- São Paulo).

2.3.2. Extração de DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

Os fragmentos dos animais destinados à extração de DNA genômico fo-

Tabela 1. Espécimes sequenciadas para análise filogenética deste estudo. A base de dados completa de cada hospedeiro coletado pode ser encontrada no site do LHE (URL: <http://www.ib.usp.br/hpc/>).

Código de coleta	Código molecular	Espécie	Hospedeiro	Local e data da coleta
PA07-63	R004	<i>Rhinebothroides scorzai</i>	<i>Potamotrygon</i> sp_mar1	Marajó – PA
PA07-63	R005	<i>R. scorzai</i>	<i>Potamotrygon</i> sp_mar1	Marajó – PA
MT05-33	R046	<i>R. glandularis</i>	<i>Potamotrygon</i> sp_tpj1	Jamanxin – PA
TA06-11	R052	<i>R. freitasi</i>	<i>Potamotrygon</i> cf.2_motoro	Rio Solimões – AM
MT05-33	R054	<i>R. freitasi</i>	<i>Potamotrygon</i> sp_tpj1	Jamanxin – PA
RN04-90.5	R095	<i>Rhinebothroides</i> sp.	<i>Potamotrygon</i> sp. (P. cururu)	Rio Negro – AM
MS04-40	R119	<i>R. cf. freitasi</i>	<i>Potamotrygon falkneri</i>	Rio Salobra – MS
AC06-11.2	R123	<i>Rhinebothroides</i> sp.	<i>Potamotrygon brachyura</i>	Rio Mutum – MT
TA06-16.10	DM001	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Solimões/ Yavari/ Itacuaí
TA06-16.8	DM002	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Solimões/ Yavari/ Itacuaí
PA07-75.2.5	DM004	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Potamotrygon motoro</i>	Igarapé do Urubu – PA
RN04-61.5	DM005	<i>Phyllobothriidae</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Negro/ Paraná Zamula – AM/ RO, Brasil, 02/03/2004
TA06-16.17	DM010	<i>Nandocestus guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
TA06-16.21.4.1	DM011	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
TA06-16.21.4.2	DM012	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
TA06-16.21.4.3	DM013	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
MT05-09.1	DM018	<i>Phyllobothriidae</i>	<i>Potamotrygon</i> sp_tpj2	Teles Pires – MG, Brasil, 05/12/2005
TA06-16.21.4.6	DM025	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
TA06-16.21.4.7	DM026	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
TA06-16.21.4.8	DM027	<i>N. guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Yavari – AM, Brasil, 05/09/2006
AM07-30.6	DM028	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Urariquera – RO, Brasil, 18/02/07
AM07-42.8	DM032	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Paratrygon aiereiba</i>	Rio Urariquera – RO, Brasil, 21/02/07
AM07-51.1	DM034	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Rio Urariquera - RO, Brasil, 24/02/07
PA07-58.2.2.1	DM045	<i>Rhinebothroides</i> sp.	<i>Potamotrygon motoro</i>	Igarapé do Urubu – PA, Brasil, 28/08/2007
MT07-12.7	DM063	<i>Rhinebothrium</i> sp.	<i>Potamotrygon motoro</i>	Padre Inácio – MG, Brasil, 29/06/2007

ram colocados em placas de Petri, deixados para secar em temperatura ambiente por aproximadamente de 30", lavados em TE duas vezes por 30" – para reidratação e total remoção de ETOH – e posteriormente submetidos ao protocolo de extração. As extrações foram realizadas utilizando o kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad), seguindo o protocolo do fabricante, exceto pela redução do volume para 30µl ao invés de 100µl. As regiões de amplificação seguiram de forma geral os protocolos de Healy et al. (2009). O processo de amplificação foi realizado em um termociclador Touchgene Gradient (Techne, Inc.). Os iniciadores empregados e protocolos do termociclador estão nas

Tabelas 2 e 3, respectivamente. A **Tabela 4** lista os “kits” amplificação de DNA empregados bem como as sequências contíguas obtidas com cada um. As reações de PCR foram preparadas com 2 a 10µL de DNA genômico e 10pM de de cada primer. Após a checagem em gel de agarose 2%, as amplificações foram purificadas utilizando o “kit” AMPure™ (Agencourt) e quantificadas utilizando “low DNA mass ladder” (Invitrogen, Inc.). Após a quantificação, as amostras foram amplificadas com o fluóforo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), precipitadas segundo instruções do fabricante e submetidas à leitura em um sequenciador ABI 3100 Genetic Analyzer no Centro de Sequenciamento do Departamento de Química da USP – IQ/USP, São Paulo.

Tabela 2. Iniciadores (“primers”) empregados para a amplificação e sequenciamento de fragmentos parciais dos genes 28S e 18S rDNA.

Iniciadores (“primers”)	Sequencia (5'-3')
28S lsrDNA (LSU)	
<i>Amplificação & sequenciamento</i>	
C1	ACCCGCTGAATTTAAGCAT
D2	TGGTCCTTTCAAGAC
<i>Sequenciamento interno</i>	
LSU-330F	CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT
18S ssrDNA (SSU)	
<i>Amplificação & sequenciamento</i>	
300F	AGGGTTCGATTCCGGAG
WormB	CTTGTTACGACTTTTACTTCC
<i>Sequenciamento interno</i>	
930F	GCATGGAATAATGGAATAGG
1200R	GGGCATCACAGACCTG

2.3.3. Análise filogenética

Dada a atual inexistência de modelos de evolução apropriados para retratarem processos biológicos de maneira realista em métodos estatísticos de

Tabela 3. Protocolo padrão de PCR empregado para todos os procedimentos de amplificação de fragmentos parciais dos genes 28S e 18S rDNA.

Fases	Tempo	T (°C)	N° ciclos
Denaturação inicial	4'	95	1
Denaturação	30"	95	
Anelamento	40"	60	35
Axtensão	1'40"	72	
Extensão final	7'	72	1

estimação de árvores, o critério da parcimônia foi adotado. Uma vez que representam eventos biológicos específicos (i.e., mutações), “gaps” foram considerados como caracteres informativos sobre processos históricos e adequadas para análises filogenéticas (Giribet & Wheeler, 1999). Uma vez que diversos estudos mostram que a acurácia filogenética correlaciona-se positivamente com a acurácia do alinhamento (Wheeler, 1995), optou-se por um algoritmo de otimização direta (Wheeler, 1996) com o intuito de aproveitar-se de maneira plena toda a gama de marcadores contidos nas sequencias (Wong et al., 2008).

Seqüências contíguas foram montadas e editadas no programa “Consed/PhredPhrap” (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998; Gordon et al., 2001). Ambiguidades encontradas na leitura de cada cromatograma foram corrigidas manualmente dentro do programa, sendo que todos cromatogramas considerados não confiáveis foram descartados. Os consensos assim obtidos foram alinhados em “Muscle” (versão 4.0, Edgar, 2004a, 2004b) para posterior verificação de homologia e particionamento dos dados em “BioEdit” (Hall, 1999). Quaisquer regiões de alinhamento ambíguo observadas através deste programa foram mantidas nos arquivos empregados para obtenção das árvores.

Finalmente, as seqüências de 28S (região D1-D3) e 18S rDNA (comple-

Tabela 4. “Kits” de amplificação de DNA e sequencias contiguas obtidas para cada terminal (●), indentificado por seu código e táxon.

Código molecular	Táxon	“Kits” de amplificação (PCR)	Sequencias contiguas						
			CI	LSU-330F	D2	300F	930F	I200R	WormB
R004	<i>Rhinebothroides scorzai</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R005	<i>R. scorzai</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R046	<i>R. glandularis</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R052	<i>R. freitasi</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R054	<i>R. freitasi</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)				●	●	●	●
R095	<i>Rhinebothroides</i> sp.	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R119	<i>R. cf. freitasi</i>	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
R123	<i>Rhinebothroides</i> sp.	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
DM001	<i>Rhinebothrium</i> sp.	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
DM002	<i>Rhinebothrium</i> sp.	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●	●	●	●
DM004	<i>Rhinebothrium</i> sp.	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	●	●	●	●			●
DM005	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM010	<i>Nandocestus guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM011	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●	●	●	●	●
DM012	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●	●			●
DM013	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)		●		●	●	●	●
DM018	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)				●	●	●	●
DM025	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM026	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM027	<i>N. guariticus</i>	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●	●	●	●	●
DM028	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM032	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM034	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM045	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●	●				
DM063	<i>Rhinebothrium</i> sp.	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare)	●	●					

tas e parciais) foram submetidas ao algoritmo de otimização direta (Wheeler, 1996), dentro do contexto de homologia dinâmica (Ramirez, 2007) implementado no programa POY versão 4.1.2 (Varón et al., 2010). O POY analisa sequencias não alinhadas com algoritmos de busca para topologias ótimas e alinhamento implícito, de modo que o alinhamento é gerado concomitantemente à produção das árvores.

As análises consideraram apenas um parâmetro de alinhamento (i.e., regime de custo para “gaps”, transversões e transcrições), otimizando o tempo computacional em detrimento da possibilidade de se detectar clados sensíveis a tais custos de alinhamento (análise de sensibilidade sensu Wheeler, 1995 e Giribet, 2001). O parâmetro empregado atribuiu peso 2 para “gaps” e peso 1 para substituições, independentemente do tipo (i.e., transversões ou transcrições). Os custos de abertura e extensão de “gaps” foram diferenciados ao conferir àquele custo 4 pelo comando “gap_openning:4”, o que pode levar a uma análise potencialmente mais coerente com a matriz de dados (e.g., Aagesen et al., 2005; Ramírez, 2007), embora “gaps” longos possam ser favorecidos como artifício da imposição destes valores. Sob este regime de custos, 10 buscas foram efetuadas considerando 40 adições aleatórias (comando “build(40)”), totalizando 400 adições aleatórias, cada uma mantendo uma única topologia sujeita à refinamento pelo algoritmo de TBR (comando “swap()”) conforme especificado nos “scripts” expostos na **Figura 1**.

O terminal utilizado para o enraizamento das topologias, *Litobothrium janovyi* Olson & Caira, 2001, foi selecionado de acordo com Healy et al. (2009) uma vez que Litobothriidea tem consistentemente ocupado a posição de grupo-irmão de céstodas acetabulados em diversos estudos (e.g., Olson et al., 2001; Caira et al., 2005; Waeschenbach et al., 2007). Todos os dados moleculares obtidos neste trabalho serão futuramente publicados no GenBank (Bueno et al., em preparação; Machado et al., em preparação). Dados originais foram inseridos para análise juntamente a um banco de dados mais amplo

empregado por Healy et al. (2009) (**Anexo 2**), que empregaram Verossimelhança, Análise Bayseana e “Máxima” Parcimônia para propor uma nova ordem de Cestoda, Rhinebothriidea. Por empregar otimização direta dos dados moleculares, este estudo provê uma nova abordagem sobre este banco de dados.

```
(*Este "script" para busca heurística foi repetido 10 vezes*)
read("all_ssu_aln2_trimmed.fas","all_lsu_aln2_trimmed.fas")
transform ((all, tcm:"m211"), gap_opening:4)
select(terminals,files:("selected_terminals.txt"))
set(root:"h06_Litobothrium_janovyi")
(*Litobothrium janovyi foi selecionado como grupo-externo*)
build(40)
(*O "script" faz 40 adições aleatórias*)
swap()
(*As árvores obtidas são submetidas a TBR*)
select()
report("alignment.ia",ia,"consensus",graphconsensus,"trees.tre",trees:(nomargin))
report ("trees.txt",asciitrees,"scores.sts",treestats)
exit()
```

Fig. 1. “Script” de busca heurística de evidência total (18S e 28S) para POY. São implementadas 40 adições aleatórias e as topologias são refinadas por “TBR”. Este processo foi sujeito a 10 repetições.

O cladograma escolhido foi o consenso das topologias mais parcimoniosas. Nenhuma medida de suporte nodal ter sido calculada. O cálculo dos valores de Bremer (Bremer, 1988, 1994) seria a intervenção mais indicada pois não perturba dos dados, está livre de ambiguidades interpretativas e fornece valores coerentes com a natureza não-estocática e não-estatística dos métodos de parcimônia (Siddal, 2002). Pelos benefícios que este suporte pode trazer para a interpretação de uma dada hipótese filogenética, ele será empregado em análises futuras (Machado et al., em preparação). É digno de nota, entretanto, que não existe qualquer método que quantifique os graus de corroboração de um cladograma dentro dos critérios Popperianos (Vogt, 2008).

2.3.4. Edição das topologias obtidas

A visualização da topologia obtida, sua edição e a otimização de caracteres foram realizadas com o auxílio do programa “TreeViewX” versão 0.5.1-5 (Page, 1996).

3. RESULTADO e DISCUSSÃO

3.1. Confrontando a topologia obtida com as hipóteses filogenéticas de Healy et al. (2009): corroboração de Rhinebothriidea e outras considerações

O particionamento dos alinhamentos de 18S e 28S rDNA gerou, respectivamente, 13 e 10 caracteres dentro da contexto de otimização direta efetuada implementada em POY (i.e., cada partição editada em “BioEdit” corresponde a um caracter). A busca heurística resultante desta análise encontrou uma única árvore mais parcimoniosa de comprimento igual a 11199 (**Figura 2**). A análise suporta Rhinebothriidea conforme proposta por Healy et al. (2009), corroborando hipóteses recorrentes acerca da consistência deste clado. Ademais, outros clados obtidos repetidamente nas diferentes abordagens destes autores são aqui suportados (*Lecanicephalidea*, *Duplicibothrium*, *Caulobothrium* e *Protocephalus* na **Figura 3**), sendo que dois deles mostraram-se relacionados de uma forma particularmente interessante.

Todos os espécimes de *Caulobothrium* formam o grupo-irmão de (*Duplicibothrium* sp. + *Duplicibothrium* cf. *minutum*). Estes clados também estão presentes em todas as árvores de evidência total de Healy et al. (2009) e em Olson et al. (1999), porém ambos os autores apontam *Ceratobothrium xanthocephalum* como grupo-irmão daquele gênero. Olson et al. (1999) chama a atenção para a estranheza de seus resultados dadas as diferenças morfológicas entre estes dois gêneros. Por exemplo, *C. xanthocephalum* não compartilha com *Caulobothrium* e *Duplicibothrium* os testículos distribuídos no campo ovariano ou o desenvolvimento segmentar protândrico, enquanto os dois últimos guardam similaridades morfológicas no bótrio e nas proglótides (e.g., botrídios subdivididos em lóculos por septos transversais, ausência de septos marginais, ausência de suctores apicais e estróbilos apolíticos). Todavia,

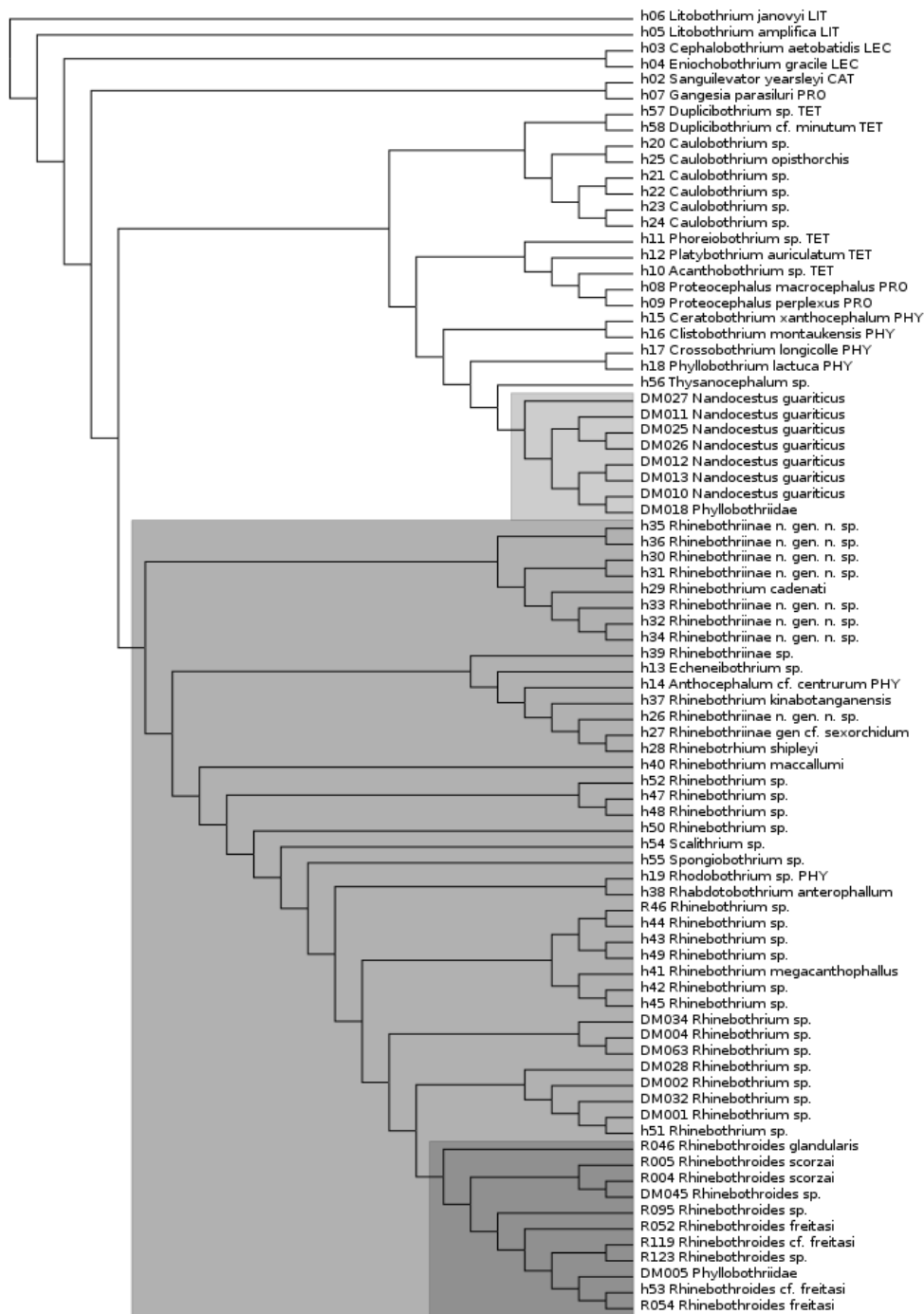


Fig. 2. Árvore de evidência total (18S e 28S rDNA). Comprimento: 11199; número de vezes que foi encontrada: uma. Tons crescentes de cinza indicam os clados *Nandocestus*, *Rhinebothriidea* e *Rhinebothroides*, nesta mesma ordem.

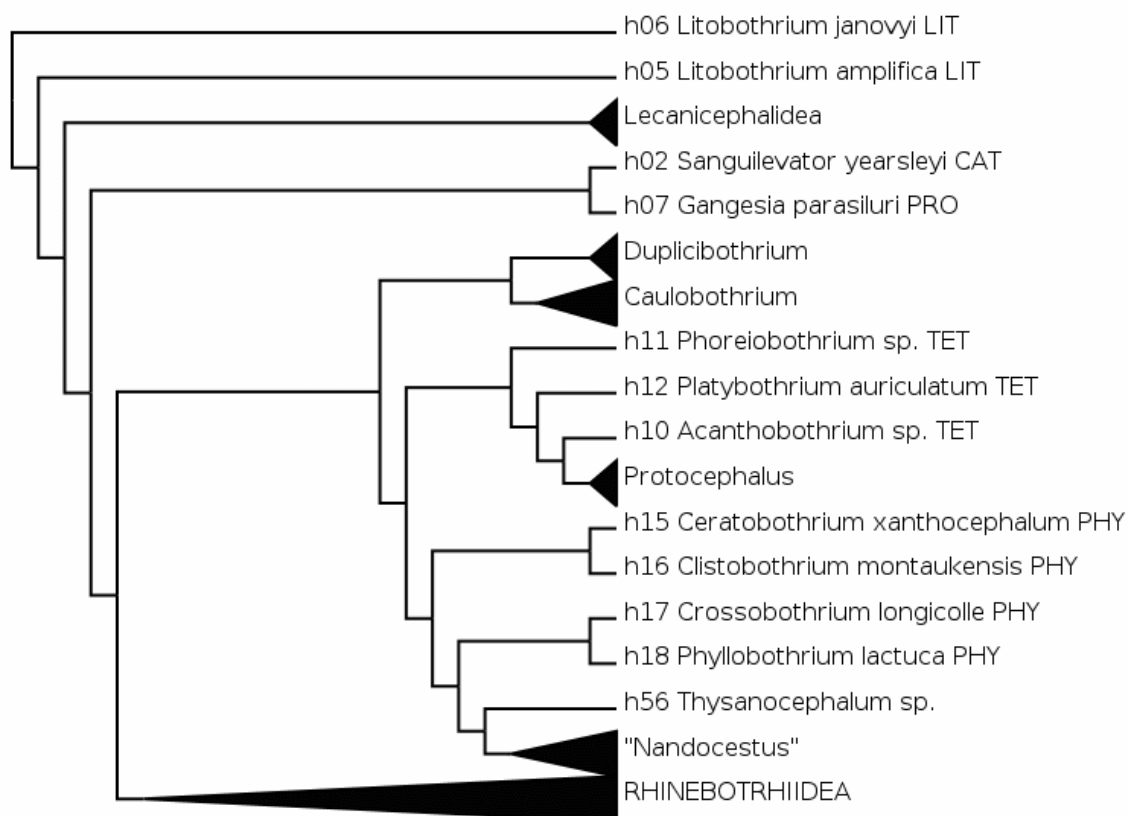


Fig. 3. Árvore que representa o consenso da análise de parcimônia, resumizando os principais clados. Note que “*Nandocestus*” é parafilético. As siglas referem à coluna “Subfamily” da Tabela 1 de Healy et al. (2009) (ver Anexo 2).

Caulobothrium e *Ceratobothrium* apresentam outras características morfológicas compartilhadas que os diferem de *Dupliciobothrium*, como poros genitais laterais (para uma extensa chave de identificação de céstodas que inclui características destes gêneros, ver Khalil et al., 1994). Na atual conjectura, entretanto, qualquer hipótese sobre o grupo-irmão de *Caulobothrium* carece de corroboração.

A topologia de consenso também concorda com Healy et al. (2009) quanto à condição não-natural de Phyllobothriinae. Olson & Caira (1999) já haviam apresentado evidências preliminares de que o “status” taxonômico

deste táxon, assim como dos filobotriídeos em geral, exigia averiguação. Quanto à posição de Onchobothriidea (tetrafilídeos dotados de ganchos em seus bótrios, como *Acanthobothrium*), é intrigante a indicação de que seus membros compartilham um ancestral exclusivo com o *Proteocephalus macrocephalus* e *P. perplexus*, sendo que o outro exemplar da ordem Proteocephalidea analisado insere-se no clado (*Gangesia parasiluri* + *Sanguilavator yearsleyi*), indicando que a ordem em questão não é monofilética. O clado (*G. parasiluri* + (*P. macrocephalus* + *P. perplexus*)) foi recuperado em ambas as análises de evidência total de Healy et al. (2009) assim como em todos os cladogramas construídos apenas a partir de dados do 18S rDNA. Por outro lado, as árvores apenas de 28S rDNA destes autores sempre suportaram (*Acanthobothrium* sp. + (*P. macrocephalus* + *P. perplexus*)), concordando com a esta análise a respeito da polifilia de “Proteocephalidea”.

3.2. Posição filogenética e “status” taxonômico de *Nandocestus* Reyda, 2008

O táxon monoespecífico *Nandocestus*, recentemente descrito, é aqui inserido pela primeira vez em uma análise filogenética. O gênero emerge da topologia apresentada como um grupo parafilético que inclui um exemplar de filobotriídeo (código molecular DM018) cujo táxon, certamente distinto e dulcícola, ainda não foi formalmente identificado. O táxon marinho *Thysanocephalum* Linton, 1889 é grupo-irmão do clado formado por DM018 e todos os terminais de *N. guariticus*, compartilhando com estes últimos pelo menos as seguintes características morfológicas: abertura vaginal anterior ao saco do cirrus, ovário posterior, vitelarium folicular.

N. guariticus apresenta distribuição bastante restrita, tanto quanto a bacias hidrográficas quanto a hospedeiros, sendo que todos os exemplares empregados na presente análise provieram de uma única válvula de

Paratrygon aiereba coletada no Rio Yavari (código de coleta: TO06, **Tabela 1 e Anexo 1**), de modo que tecer comentários acerca das implicações biogeográficas do posicionamento filogenético do gênero seria prematuro. A parafilia de *N. guariticus* é um resultado bastante controverso, ainda assim o posicionamento derivado de *N. guariticus* dentro do grupo-irmão de Rhinebothriidea é consistente dadas as especializações morfológicas do gênero (ver Reyda, 2008).

3.3. *Rhinebothroides* como uma linhagem derivada de Rhinebothriidea, a polifilia do gênero “*Rhinebothrium*” e os clados dulcícolas de parasitas

O espécime DM005, identificado como um filoboriídeo na árvore, é imaturo, o que dificulta sua identificação. Entretanto, dadas as evidências para a monofilia de *Rhinebothroides* (Bueno et al., em preparação), espera-se que este terminal seja um exemplar imaturo do gênero. Neste cenário, o referido gênero destaca-se como o clado mais derivado dentro de Rhinebothriidea, sendo *R. glandularis* basal em relação a *R. scorzai* e *R. freitasi*. *Rhinebothroides* tem uma relação de parentesco próxima à “*Rhinebothrium*”, o qual vários autores advogam não se tratar de grupo natural e apresentam evidências que condizem com os resultados aqui apresentados (e.g., Healy et al., 2009). O conjunto da fauna parasitária de potamotrigonídeos é polifilético, apresentando pelo menos dois componentes distintos (**Figura 4**): (“*Nandocestus*”) e (“*Rhinebothrium*” + *Rhinebothroides*).

Conforme foi observado por Fyler (2009), caso a coespeciação seja o fator preponderante nos eventos cladogenéticos de um grupo de parasitas, sua filogenia deverá apresentar relações íntimas com a dos hospedeiros. Caso con-

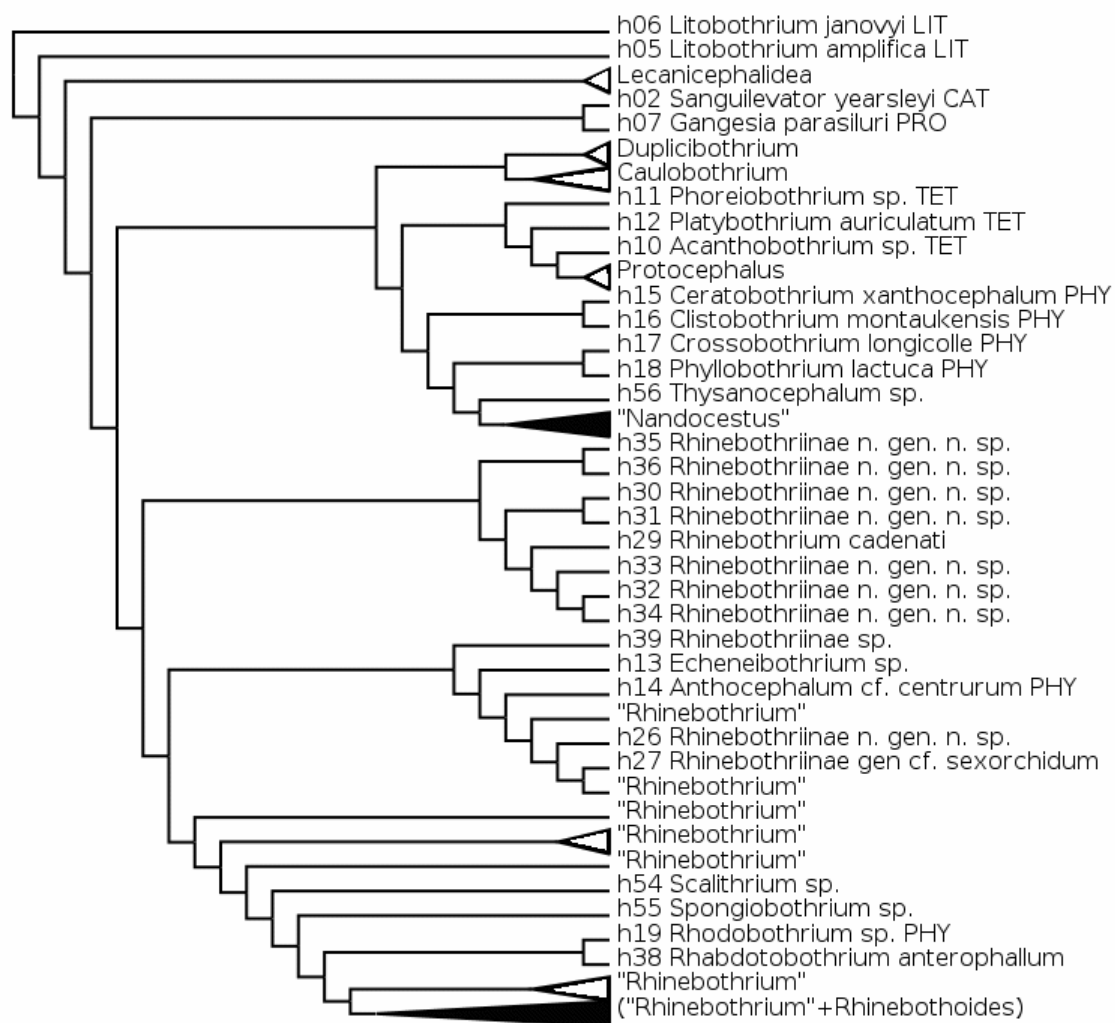


Fig. 4. Cladograma obtido da análise de evidência total. Triângulos escuros representam as linhagens de parasitas que se hospedam em raias de água doce.

trário, se eventos biogeográficos guiarem verossimilhana diversificação dos parasitas, a autora alegou que estes tenderiam a formar clados de acordo com a localidade, independentemente do relacionamento existente entre seus hospedeiros. A distribuição dos espécimes dulcícolas de *Rhinebothrium* e *Rhinebothroides* nesta análise não é coerente com a distribuição geográfica ou por hospedeiro, sendo que nenhum padrão biogeográfico ou coevolutivo pôde

ser observado neste sentido. Bueno et al. (em preparação) notam que, a fim de se resolverem os relacionamentos inter-específicos dentro *Rhinebothroides*, é necessário lançar mão de sequências de genes com variação maior do que IsrDNA e ssrDNA, bem como empregar uma matriz de dados mais abrangente que representasse com mais afinco toda a gama de sítios e hospedeiros aos quais estes animais se associam.

Ainda de acordo com Fyler (2009), em um sistema no qual congêneres infestam o mesmo hospedeiro e formam entre si em grupo monofilético, sua diversidade poderia ser explicada por um único evento de invasão e colonização ao hospedeiro seguido de especiação junto ao mesmo. Caso tais congêneres não compartilhem um ancestral comum, porém, a mesma diversidade seria mais coerentemente explicada por múltiplos eventos independentes de invasão e colonização. Assim, cada clado dulcícola de parasitas aponta para um caso de evento de invasão e colonização único, embora a relação entre estes eventos necessite de investigação.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que apenas uma árvore mais parcimoniosa foi obtida pela busca heurística, que não se apresentou para esta topologia qualquer cálculo de suporte nodal e que não se explorou de qualquer maneira o universo de custos possíveis dentro do contexto do POY, este estudo pode ser considerado preliminar e carente de verificação. Entretanto, a topologia obtida por otimização direta recuperou um cladograma em geral muito semelhante àqueles obtidos por Healy et al. (2009) por outros critérios de análise (i.e., Verossimilhança, Análise Bayesiana e “Máxima” Parcimônia). Isto evidencia que o banco de dados empregado é eficiente em representar certos aspectos da história evolutiva ao nível que pretendia ser abordado por Healy et al. quando propuseram a nova ordem Rhinebothriidea. Outro resultado pertinente é a verificação de que a otimização direta é capaz de inferir determinados processos históricos a partir de padrões observados da mesma forma que outras abordagens filogenéticas. Porém, é digno de nota que estas diferentes abordagens não podem ser estritamente comparadas entre si e que nossos resultados não são úteis para justificar o emprego de qualquer método de inferência filogenética.

O espécime analisado de *Thysanocephalum* sp., pertencente a um gênero cosmopolita, foi coletado de um espécime *Galeocerdo cuvier* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) encontrado nos EUA. É possível que os hospedeiros de *Nandocestus* e de seu grupo-irmão estejam proximamente relacionados, e que a investigação desta relação possibilite responder alguns aspectos importantes acerca da diversificação das raias de água doce neotropicais a partir do ancestral marinho. Quaisquer tentativas que venham a ser feitas no sentido de se revelar o grupo-irmão de *Nandocestus* são, pois, validadas.

Neste sentido, também é válida a exploração do grupo-irmão do clado

formado por *Rhinebothroides* e espécies dulcícolas de *Rhinebothrium*. A validade daquele gênero é constatada, sendo ele um elemento inserido no contexto do complexo *Rhinebothrium*, o qual é nitidamente polifilético e exige uma revisão taxonômica. Não é nosso intuito resolver os relacionamentos entre as espécies destes dois últimos grupos e, notadamente, os fragmentos genômicos apenas de 18S e 28S rDNA mostraram não comportar informações o bastante para o estudo filogenético das diversas linhagens de *Rhinebothroides*. Estes problemas serão explorados com mais propriedade em publicações futuras com a colaboração do autor e de dados sequenciados para este trabalho (Bueno et al., em preparação).

5. REFERÊNCIAS

- Aagesen, L.; G. Petersen & O. Seberg. 2005. Sequence length variation, indel costs, and congruence in sensitivity analysis. *Cladistics* 21: 15-30.
- Arias, J.S. et al. 2008. What is PACT really? *Cladistics* 24: 813-824.
- Baum, B.R. 1992. Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining gene trees. *Taxon* 41: 3-10.
- Bremer, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Brooks, D.R. 1981. Hennig's parasitological method: a proposed solution. *Systematic Zoology* 30: 229-249.
- Brooks, D.R. 1990. Parsimony analysis in historical biogeography and coevolution: methodological and theoretical update. *Systematic Zoology* 39: 14-20.
- Brooks, D.R. & D. McLennan. 1993. Macroevolutionary patterns of morphological diversification among parasitic flatworms (Platyhelminthes: Cercomeria). *Evolution* 47: 495-509.
- Brooks, D.R.; T.B. Thorson & M.A. Mayes. 1981. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae) and their helminth parasites: testing hipotesis of evolution and coevolution, p.145-175. In: V.A. Funk & D.R. Brooks (Eds.). *Advances in cladistics*. New York, New York Botanical Garden.
- Caira, J.N. & K. Jensen. 2001. An investigation of the co-evolutionary relationships between onchobothriid tapeworms and their elasmobranch hosts. *International Journal for Parasitology* 31(9):960-975.
- Caira, J.N.; K. Jensen & C.J. Healy. 1999. On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm

genera. *Systematic Parasitology* 42:77-151.

Caira, J.N. &

Caira, J.N.; T. Scholz & B.B. Georgiev. 2006. Cestode systematics and phylogeny move forward. *Systematic Parasitology* 65(2):171-174.

Carvalho, M.R. De; J.G. Maisey & L. Grande. 2004. Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 284:1-136.

Carvalho, M.R. de; N. Lovejoy & R.S. Rosa. 2003. Potamotrygonidae (river stingrays). In: R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. (Eds.). *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 22-28.

Charleston M.A. & S.L. Perkins. 2006. Transversing the tangle: algorithms and duplications for copylogenetic studies. *Journal of Biomedical Informatics* 39: 62-71.

Criscione, C.D.; R. Poulin & M.S. Blouin. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14: 2247-2257.

Doyle J.J. 1992. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botanic* 17:144-163.

Du Preez, L.H. & M.F. Maritz. 2006. Demonstrating morphometric protocols using polystome marginal hooklet measures. *Systematic Parasitology* 63:1-15.

Edgar, R.C. 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.

Edgar, R.C. 2004b. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy

- and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797.
- Euzet, L. 1994. Order Tetracystida Carus, 1863. p.149-194. In: L.F. Khalil; A. Jones & R.A. Bray (Eds.). *Keys to the cestodes parasites of vertebrates*. Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Ewing, B. & P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. error probabilities. *Genome Research* 8:186-194.
- Ewing, B.; L. Hillier; M.C. Wendl & P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.
- Farris, J.S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *American Naturalist* 106: 645-&.
- Farris, J.S. 1979. Predictive value of phylogenetic classification. *American Zoologist* 19:892.
- Farris, J.S. 1982a. Outgroups and parsimony. *Systematic Zoology* 31: 328-334.
- Farris, J.S. 1982b. Simplicity and informativeness in systematics and phylogeny. *Systematic Zoology* 31: 413-444.
- Fattorini, S. 2008. Hovenkamp's ostracized vicariance analysis: testing new methods of historical biogeography. *Cladistics* 24: 611-622.
- Futuyma, D.J. 1992. *Biologia Evolutiva*, 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Cnpq. 631pp.
- Fyler, C.A. 2009. Systematics, biogeography and character evolution in the tapeworm genus *Acanthobothrium* van Beneden, 1850. Tese não publicada, Connecticut, University of Connecticut, 168p.
- Giribet, G. 2001. Exploring the behavior of POY, a program for direct optimization of molecular data. *Cladistics*, 17: S60-S70.
- Giriber, G. & W.C. Wheeler. 1999. On gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(1):132-143.

- Gordon, D.; C. Abajian, & P. Green. 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*, 8:195-202.
- Gordon, D.; C. Desmarais & P. Green. 1998. Automated finishing with autofinish. *Genome Research* 11(4):614-625.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41:95-98.
- Hafner, M.S & S.A. Nadler. 1988. Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* 332:258-259.
- Hafner, M.S. et al. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science* 265: 1087-1090.
- Healy, C.J; J.N. Caira; K. Jensen; B.L. Webster & T. Littlewood. 2009. Proposal for the new tapeworm order Rhinebothriidea. *International Journal for Parasitology*.
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic systematics*. Urbana: University of Illinois Press. 263pp.
- Hoberg, E.P. & D.R. Brooks. 2008. A macroevolutionary mosaic: host-switching, geographical colonization and diversification in complex host-parasite systems. *Journal of Biogeography* 35:1533-1550.
- Hoberg E.P.; J. Mauriaux; J.-L. Justine; D.R. Brooks & P.J. Weekes. 1997. Phylogeny of the orders of Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: Historical perspectives and a new working hypothesis. *Journal of Parasitology* 83:1128-1147.
- Khalil, L.F.; A. Jones & R.A. Bray (Eds.). 1994. *Keys to the cestodes parasites of vertebrates*. Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Klassen, G. L. 1992. Coevolution: a history of the macroevolutionary approach to studying host-parasites associations. *Journal of Parasitology* 78:573-587.

- Kodandaramaiah, U. 2009. Vagility: The neglected component in historical biogeography. *Evolution Biology* 36:327-335.
- Lovejoy, N.R. 1996. Systematic of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on phylogeny and historical biogeography of Neotropical freshwater stingrays (Potamotrigonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 117: 207-257.
- Lovejoy, N.R. 1997. Stingrays, parasites, and neotropical biogeography: a closer look at Brooks *et al.*'s hypothesis concerning the origins of neotropical freshwater rays (Potamotrygonidae). *Systematic Biology* 46: 218-230.
- Lovejoy, N.R.; E. Bermingham & A.P. Martin. 1998. South American rays came in with the sea. *Nature* 396:421-422.
- Marlier, G. 1967. Hydrobiology in the Amazon Region. Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica – *Limnologia* 3:1-7.
- Marques, F. P. L. 2000. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. Tese não publicada, Ontário, University of Toronto, 325p.
- Moritz, C. & D.M. Hillis. 1996. Molecular systematics: context and controversies. In: D.M. Hillis; C. Moritz & B.K. Mable (Eds.). *Molecular Systematics*, 2 ed. Sunderland: Sinauer, p. 1-41.
- Nelson, G. & N.I. Platnick. 1981. *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. New York, Columbia University Press.
- Nieberding, C. and Olivieri, I. 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *Trends in Ecology and Evolution* 22: 156-165.
- Nishida, K. 1990. Phylogeny of the suborder Myliobatoidei. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 37: 1-108.
- Olson, P.D. & J.N. Caira. 1999. Evolution of the major lineages of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoidea) inferred from 18S ribosomal DNA and Elongation Factor-1 α . *Journal of Parasitology* 85(6):1134-1159.

- Olson, P.D.; T.R. Ruhnke; J. Sanney & T. Hudson. 1999. Evidence for host-specific clades of tetraphyllidean tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda) revealed by analysis of 18S ssrDNA. *International Journal for Parasitology* 29: 1465-1476.
- Page, R.D.M. (Ed.). 1993. Genes, organisms and areas: the problem of multiple lineages. *Systematic Biology* 42: 77-84.
- Page, R.D.M. 1994a. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms and areas. *Systematic Biology* 43: 58-77.
- Page, R.D.M. 1994b. Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics* 10: 155-73.
- Page, R.D.M. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12(4):357-358.
- Page, R.D.M. (Ed.). 2003. Tangled trees: phylogeny, co-speciation and co-evolution. Chicago, The University of Chicago Press, I+342 p.
- Page, R. D. M. & M.A. Charleston. 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends in Ecology and Evolution* 13:356–359.
- Palumbi, S.R. 1996. The polymerase chain reaction, p. 205-247. In: D.M. Hillis; C. Moritz & B.K. Mable (Eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland, Sinauer, II+543p.
- Ramírez, M.J. 2007. Homology as a parsimony problem: a dynamic homology approach for morphological data. *Cladistics* 23(6):588-612.
- Reyda, F.B. 2007. Patterns of diversity and host specificity in the cestodes of Neotropical freshwater stingrays. Tese não publicada, Connecticut, University of Connecticut, 215p.
- Reyda, F.B. 2008. Intestinal helminths of freshwater stingrays in Southeastern

- Peru, and a new genus and two new species of cestode. *Journal of Parasitology* 94:684-699.
- Roberts, L.S. & J. Janovy Jr. 1996. *Foundations of parasitology*. Dubuque, Wm. C. Brown, V+659p.
- Roberts, T.R. 1972. Ecology of the fishes in the Amazon and Congo basins. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 143: 117-147.
- Ronquist, F. 2003. Parsimony analysis of coevolving species associations, p.22-51. In: R.D. Page (Ed.). *Tangled trees: phylogeny, cospeciation and coevolution*. Chicago, University of Chicago Press, I+337p.
- Rosa, R.S. 1985. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Dissertação*. The College of William and Mary, Williamsburg, Virginia. 542 pp.
- Rosa, R.S.; M.R. de Carvalho & C.D.A. Wanderlay. 2008. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology* 6: 1-8.
- Sereno, P.C. 2007. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23: 565-587.
- Siddal, M.E. 2002. Measures of support, p.80-99. In: R. DeSalle et al. (eds.). *Techniques in molecular systematics and evolution*. Suíça, Birkhauser Verlag.
- Thorson, T.B. 1970. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp.: failure to concentrate urea when exposed to saline medium. *Life Science* 9:893-900.
- Thorson, T.B.; D.R. Brooks & M.A. Mayes. 1983. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Society Research Reports* 15: 598-605.

- Thorson, T.B.; R.M. Wootton & T.D. Georgi. 1978. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biological Bulletin* 154:508-516.
- Varón, A.; L.S. Vinh & W.C. Wheeler. 2010 (no prelo). POY version 4: phylogenetic analysis using dynamic homologies. *Cladistics* 26.
- Vogt, L. 2008. The unfalsifiability of cladograms and its consequences. *Cladistics* 24:62-73.
- Waeschenbach, A.; B.L. Webster; R.A. Bray & D.T.J. Littlewood. 2007. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45(1):311-325.
- Wheeler, W. 1995. Sequence alignment parameter sensitivity and molecular data. *Systematic Biology* 44:321-331.
- Wheeler, W. 1996. Optimization Alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1-9.
- Wiley, E.O. 1981. *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics*. New York, John Wiley and Sons.
- Wong, K.M.; M.P. Suchard & J.P. Huelsenbeck. Alignment uncertainty and genomic analysis. *Science* 319(5862):127-135.

ANEXOS

ANEXO 1: Coletas

A representatividade biogeográfica da coleção disponibilizada para execução deste trabalho pode está na **Tabela 1.1** e na **Figura 1.1**. A amostragem representa 5 das 9 Bacias Hidrográficas Brasileiras e 12 Sub-Bacias conforme divisão da Agência Nacional de Águas – ANA (URL: www.hidroweb.ana.gov.br).

Tabela 1.1. Coletas realizadas pelo Laboratório de Helminologia Evolutiva (LHE) disponibilizadas para este trabalho (veja mapa na **Figura 1.1**, próxima página).

Código da coleta	Rio/Igarapé/Lago	Sub – Bacia Hidrográfica	Bacia Hidrográfica
AC06	Rio Mutum - MT	Rio Paraguai, São Lourenço	Rio Paraná
AC06	Rio Jamari - RO	Rio Amazonas, Madeira, Guaporé	Rio Amazonas
AC06	Lago Novo – Rio Purus - AM	Rio Solimões, Purus, Coari	Rio Amazonas
AC06	Lago Arara – Rio Tarauacá - AC	Rio Solimões, Juruá, Japurá	Rio Amazonas
MS04	Rio Salobra - MS	Rio Paraguai, São Lourenço	Rio Paraná
MT05	Rio Teles Pires – MT	Rio Amazonas, Tapajós, Juruena	Rio Amazonas
PA07	Rio Jamanxin - PA	Rio Amazonas, Tapajós, Juruena	Rio Amazonas
MT07	Igarapé Padre Ignácio - MT	Rio Paraguai, São Lourenço	Rio Paraná
RN04 e RN05	Rio Negro - AM	Rio Solimões, Negro, Branco	Rio Amazonas
TA06	Rio Yavari - AM	Rio Solimões, Negro, Branco	Rio Amazonas
PA07	Rio Tapajós - PA	Rio Amazonas, Tapajós, Juruena	Rio Amazonas
TO05	Rio Tocantins e Manuel Alves - TO	Rio Tocantins, Manuel Alves	Rio Tocantins
TO05	Rio Araguaia - TO	Rio Araguaia, Coco, Pau d' Arco	Rio Tocantins
UR05	Rio Uruguai - RS	Rio Uruguai, Ijuí, outros	Rio Uruguai
PA07	Baía de Marajó - PA	Rio Meruu, Acamá, Guamá etc.	Atlântico, trecho Norte/Nordeste
PA07	Igarapé do Urubu - PA	Rio Meruu, Acamá, Guamá etc.	Atlântico, trecho Norte/Nordeste
FMNR	Rios Parnaíba e Poty - PI	Rio Parnaíba	Atlântico, trecho Norte/Nordeste
AM07	Rio Abacaxis - AM	Rio Amazonas, Trombetas etc.	Rio Amazonas
AM07	Rios Branco e Urariquera - RR	Rio Solimões, Negro, Branco	Rio Amazonas
PA07	Rio Xingú - PA	Rio Amazonas, Xingu, Iriri, Paru	Rio Amazonas

ANEXOS

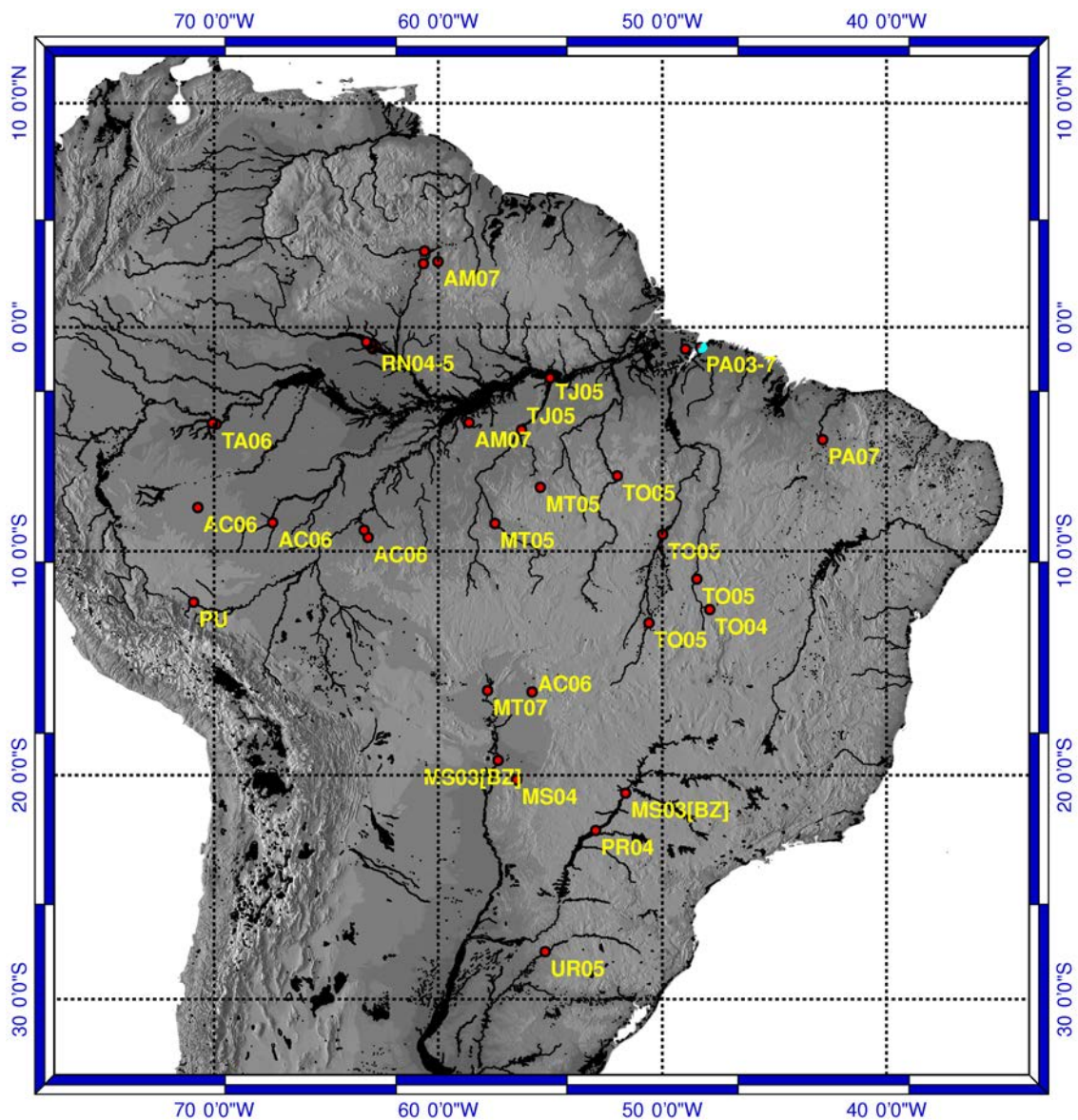


Fig. 1.1. Mapa de distribuição das coletas do Laboratório de Helminthologia Evolutiva (LHE) realizadas no período de 2002 a 2007.

ANEXOS

Anexo 2: Base de dados externa

Tabela 2.1: Espécimes empregados na filogenia de Healy et al. (2009) incluídos neste estudo (modificado da Tabela 1 da autora, pg. 501-503).

Código	Subfamília	Táxon	GenBank		Voucher LRP	Hospedeiro	Localidade
			SSU	LSU			
h01	Ordem Cathocephalidea	<i>Cathocephalus thatcheri</i> Dailey & Overstreet, 1973 ¹	AY961398	AY961397	-	-	-
h02		<i>Sanguilevator yearsleyi</i> Caira, Mega & Ruhnke, 2007 ²	FJ177057	FJ177097	LRP 4218 (TE-114)	<i>Lamiopsis temminckii</i> (BO-488)	Sul do Mar da China, fora de Mukah (2° 53'52.1611"N, 112° 5'44.12"L), Sarawak, Malásia
h03	Ordem Lecanicephalidea	<i>Cephalobothrium aetobatidis</i> Shipley & Hornell, 1906 ³	AF124466	AF286927 ²	-	<i>Aetobatus narinari</i>	Tailândia
h04		<i>Eriobothrium gracilis</i> Shipley & Hornell, 1906 ³	AF124465	AF286928	-	<i>Rhinoptera</i> sp.	Austrália
h05	Order Litobothriidea	<i>Litobothrium amplifica</i> (Kurochkin & Slankis, 1973) Euzet, 1994	AF124467	AF286931	-	<i>Alopias pelagicus</i>	México
h06		<i>Litobothrium janovyi</i> Olson & Caira, 2001	AF124468	AF286930	-	<i>Alopias superciliosus</i>	México
h07	Order Proteocephalidea	<i>Gangesia parasituri</i> Yamaguti, 1934	AJ287515	AF286935	-	<i>Silurus asotus</i>	Japão
h08		<i>Proteocephalus macrocephalus</i> (Creplin, 1825) Nuffer, 1905	EF095247	EF095261	-	<i>Anguilla anguilla</i>	Rio Thames, Windsor, Reino Unido
h09		<i>Proteocephalus perplexus</i> LaRue, 1911	AF124472	AF286940	-	<i>Amia calva</i>	Canadá
h10	Ordem Tetracyphillidea; Família Phyllobothriidae Braun, 1900	<i>Acanthobothrium</i> sp. 1	AF286993	AF286953	-	<i>Dasyatis longus</i>	México
h11		<i>Phoreibothrium</i> sp.	AF286994	AF286954	-	<i>Sphyrna mokarran</i>	Golfo do México, México
h12		<i>Platybothrium auriculatum</i> Yamaguti, 1952	AF124470	AF286955	-	<i>Prionace glauca</i>	EUA
h13	Ordem Tetracyphillidea; Família Phyllobothriidae Braun, 1900; Echeneibothriinae	<i>Echeneibothrium</i> sp. ³	FJ177058	FJ177098	LRP 4217 (TE-94)	<i>Raja velezi</i> (BJ-243)	Golfo da Califórnia, fora de Santa Rosalia (27° 20'44.15"N, 112° 16'8.96"O), Baja California Sur, México
h14	Phyllobothriinae	<i>Anthocephalum</i> cf. <i>centrurum</i> ³	FJ177059	FJ177099	LRP 4219 (TE-141)	<i>Dasyatis centroura</i> (SE-222)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Mbour (14° 24'21.75"N, 16° 58'5.85"O), Senegal
h15		<i>Ceratobothrium xanthocephalum</i> Monticelli, 1892	AF126085	AF382089	-	<i>Isurus oxyrinchus</i>	EUA
h16		<i>Clistobothrium montaukensis</i> Ruhnke, 1993	AF286996	AF286957	-	<i>Isurus oxyrinchus</i>	EUA
h17		<i>Crossobothrium longicalle</i> (Molin, 1958) Euzet, 1959 ²	AF286997	AF286958	-	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Reino Unido
h18		<i>Phyllobothrium lactucavan</i> Beneden, 1849	AF286999	AF286960	-	<i>Mustelus asterias</i>	Reino Unido
h19		<i>Rhodobothrium paucitesticulare</i> Mayes & Brooks, 1981 ⁴	FJ177060	FJ177100	LRP 4216 (TE-61)	<i>Rhinoptera bonasus</i> (BNC-22)	Core Sound, oeste do Oceano Atlântico, fora de Davis (34° 47'8.60"N, 76° 26'24.71"O), Carolina do Norte, EUA
h20	Rhinebothriinae	<i>Caulobothrium</i> n. sp. 1 ³	FJ177061	FJ177101	LRP 3912 (CH-23)	<i>Myliobatis californicus</i> (BJ-626)	Golfo da Califórnia, fora da Baía de Los Angeles (28° 59'8.71"N, 113° 32'53.43"O), Baja California, México
h21		<i>Caulobothrium</i> n. sp. 2 ³	FJ177062	FJ177102	LRP 3916 (CH-28)	<i>Pteromylaeus bovinus</i> (SE-257)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Dioguê (12° 34'29.57"N, 16° 45'2.41"O), Senegal
h22		<i>Caulobothrium</i> n. sp. 3 ³	FJ177063	FJ177103	LRP 3915 (CH-27)	<i>Pteromylaeus bovinus</i> (SE-143)	Leste do Oceano Atlântico, fora da Saint-Louis (16° 1'28.04"N, 16° 30'33.45"O), Senegal
h23		<i>Caulobothrium</i> n. sp. 4 ³	FJ177064	FJ177104	LRP 3913 (CH-24)	<i>Pastinachus</i> cf. <i>sephen</i> (BO-164)	Sul do Mar da China, fora de Sematan (1° 48'15.45"N, 109° 46'47.17"L), Sarawak, Malásia
h24		<i>Caulobothrium</i> n. sp. 5 ³	FJ177065	FJ177105	LRP 3914 (CH-25)	<i>Pastinachus sephen</i> (NT-25)	Golfo da Carpentaria, Mar de Arafura, leste das ilhas Wessel (11° 17'43.63"S, 136° 59'48.26"L), Território do Norte, Austrália
h25		<i>Caulobothrium opisthorchis</i> Riser, 1955 ⁵	FJ177066	FJ177106	LRP 3910 (CH-21)	<i>Myliobatis californicus</i> (BJ-626)	Golfo da Califórnia, fora da Baía de Los Angeles (28° 59'8.71"N, 113° 32'53.43"L), Baja California, México
h26		N. gen. 1 n. sp. ³	FJ177067	FJ177107	LRP 3902 (CH-11)	<i>Himantura</i> cf. <i>gerrardi</i> (BO-466)	Sul do Mar da China, fora de Mukah (2° 53'52.16"N, 112° 5'44.12"L), Sarawak, Malásia
h27		N. gen. 2 cf. <i>sexorchidum</i> ³	FJ177068	FJ177108	LRP 3922 (CH-35)	<i>Taeniura lymma</i> (BO-86)	Mar de Celebes, fora de Semporna (4° 35'56.83"N, 118° 39'44.42"L), Sabah, Malásia

(continua na próxima página)

ANEXOS

Tabela 2.1: Continuação.

Código	Subfamília	Táxon	GenBank		Voucher LRP	Hospedeiro	Localidade
			SSU	LSU			
h28	Rhinebothriinae	N. gen. 2 cf. <i>shipleyi</i> [†]	FJ177069	FJ177109	LRP 3894 (CH-3)	<i>Dasyatis kuhlii</i> (BO-336)	Sul do Mar da China China, norte de Kuching (2°30'7.34"N, 110°40'16.82"E), Sarawak, Malásia
h29		N. gen. 2 cf. <i>cademat</i> [†]	FJ177070	FJ177110	LRP 3924 (CH-37)	<i>Zanobatus schoenleimii</i> (SE-201)	Leste do Oceano Atlântico, Eastern Atlantic Ocean, fora de Soumbédioune (14°40'42.00"N, 17°27'42.00"E), Senegal
h30		N. gen. 3 n. sp. 1 ^a	FJ177071	FJ177111	LRP 3898 (CH-7)	<i>Dasyatis cf. margaritella</i> (SE-125)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Mbour (14°24'21.75"N, 16°58'5.85"E), Senegal
h31		N. gen. 3 n. sp. 2 ^a	FJ177072	FJ177112	LRP 3899 (CH-8)	<i>Dasyatis cf. margaritella</i> (SE-125)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Mbour (14°24'21.75"N, 16°58'5.85"E), Senegal
h32		N. gen. 3 n. sp. 3 ^a	FJ177073	FJ177113	LRP 3905 (CH-14)	<i>Himantura toshi</i> (NT-26)	Golfo de Carpentaria, Mar de Arafura, leste das ilhas Wessel (11°17'43.63"S, 136°59'48.26"E), Território do Norte, Austrália
h33		N. gen. 3 n. sp. 4 ^a	FJ177074	FJ177114	LRP 3906 (CH-15)	<i>Himantura toshi</i> (NT-26)	Golfo de Carpentaria, Mar de Arafura, leste das ilhas Wessel (11°17'43.63"S, 136°59'48.26"E), Território do Norte, Austrália
h34		N. gen. 3 n. sp. 5 ^a	FJ177075	FJ177115	LRP 3909 (CH-20)	<i>Himantura undulata</i> (NT-117)	Golfo de Carpentaria, Mar de Arafura, leste das ilhas Wessel (11°17'43.63"S, 136°59'48.26"E), Território do Norte, Austrália
h35		N. gen. 3 n. sp. 6 ^a	FJ177076	FJ177116	LRP 3926 (CH-45)	<i>Himantura walga</i> (BO-237)	Sul do Mar da China, fora de Mukah (2°53'52.16"N, 112°54'4.12"E), Sarawak, Malásia
h36		N. gen. 3 n. sp. 7 ^a	FJ177077	FJ177117	LRP 3917 (CH-30)	<i>Rhinobatos typus</i> (AU-56)	Mar do Timor, Fog Bay, fora de Dundee Beach (12°45'32.56"S, 130°21'6.90"E), Território do Norte, Austrália
h37		N. gen. 4 <i>kinabatanganensis</i> (Healy, 2006) ^a	FJ177078	FJ177118	LRP 3900 (CH-9)	<i>Himantura chaophraya</i> (BO-108)	Rio Kinabatangan, fora de Kampung Abai (5°41'10.81"N, 118°23'8.35"E), Sabah, Malásia EUA
h38		<i>Rhabdotobothrium anterophallum</i> Campbell, 1975	AF287000	AF286961	-	<i>Mobula hypostoma</i>	Mar Timor, próximo a Buffalo Creek (12°20'11.49"S, 130°54'39.01"E), Lee Point, Território do Norte, Austrália
h39		Rhinebothriinae n. sp. ^a	FJ177079	FJ177119	LRP 4220 (CH-26)	<i>Pristis clavata</i> (AU-36)	Mar Timor, próximo a Buffalo Creek (12°20'11.49"S, 130°54'39.01"E), Lee Point, Território do Norte, Austrália
h40		<i>Rhinebothrium maccallumi</i> Linton, 1924 ^b	AF287000	AF286962	-	<i>Dasyatis americana</i>	México
h41		<i>Rhinebothrium megacanthophallus</i> Healy, 2006 ^a	FJ177080	FJ177120	LRP 3901 (CH-10)	<i>Himantura chaophraya</i> (BO-108)	Rio Kinabatangan, fora de Kampung Abai (5°41'10.81"N, 118°23'8.35"E), Sabah, Malásia EUA.
h42		<i>Rhinebothrium</i> sp. 1 ^a	FJ177081	FJ177121	LRP 3903 (CH-12)	<i>Himantura pastinacoides</i> (BO-76)	Mar Sulu, fora de Kampung Tetabuan (6°16.89"N, 117°42'19.67"E), Sabah, Malásia
h43		<i>Rhinebothrium</i> sp. 10 ^a	FJ177082	FJ177122	LRP 3920 (CH-33)	<i>Taeniura lymma</i> (BO-86)	Mar Celebes, fora de Semporna (4°35'56.83"N, 118°39'44.42"E), Sabah, Malásia
h44		<i>Rhinebothrium</i> sp. 11 ^a	FJ177083	FJ177123	LRP 3923 (CH-36)	<i>Taeniura lymma</i> (BO-131)	Mar Celebes, fora de Pulau Mabul (4°14'44.02"N, 118°37'53.32"E), Sabah, Malásia
h45		<i>Rhinebothrium</i> sp. 2 ^a	FJ177084	FJ177124	LRP 3907 (CH-16)	<i>Himantura uarnacoides</i> (BO-91)	Mar Sulu, fora de Beluran (5°53'52.04"N, 117°33'21.29"E), Sabah, Malásia
h46		<i>Rhinebothrium</i> sp. 3 ^a	FJ177085	FJ177125	LRP 3908 (CH-19)	<i>Himantura undulata</i> (NT-117)	Golfo de Carpentaria, Mar de Arafura, leste das ilhas Wessel Islands (11°17'43.63"S, 136°59'48.26"E), Território do Norte, Austrália
h47		<i>Rhinebothrium</i> sp. 4 ^a	FJ177086	FJ177126	LRP 3892 (CH-1)	<i>Dasyatis akajei</i> (JN-1)	Oeste do Oceano Pacífico, Suruga Bay, fora de Shimizu (35°10'N, 138°29'0"E), Shizuoka, Central Honshu, Japão
h48		<i>Rhinebothrium</i> sp. 5 ^a	FJ177087	FJ177127	LRP 3893 (CH-2)	<i>Dasyatis brevis</i> (BJ-51)	Golfo da Califórnia, fora de Puertecitos (30°20'58.15"N, 114°38'21.61"E), Baja California, México
h49		<i>Rhinebothrium</i> sp. 6 ^a	FJ177088	FJ177128	LRP 3896 (CH-5)	<i>Dasyatis longus</i> (BJ-423)	Golfo da Califórnia, fora de San José del Cabo (23°24'52.22"N, 109°41'33.19"E), Baja California Sur, México

ANEXOS

Tabela 2.1: Continuação.

Código	Subfamília	Táxon	GenBank		Voucher LRP	Hospedeiro	Localidade
			SSU	LSU			
h50	Rhinebothriinae	<i>Rhinebothrium</i> sp. 7 ^a	FJ177089	FJ177129	LRP 3897 (CH-6)	<i>Dasyatis</i> cf. <i>margaritella</i> (SE-123)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Mbour (14°24'21.75"N, 16°58'5.85"O), Senegal
h51		<i>Rhinebothrium</i> sp. 8 ^a	FJ177090	FJ177130	LRP 3930 (CH-55)	<i>Paratrygon</i> cf. <i>aieriba</i> (PU-10m)	Blanquillo (12°23'26.75"S, 70°42'32.06"O), Madre de Dios, Peru
h52		<i>Rhinebothrium</i> sp. 9 ^a	FJ177091	FJ177131	LRP 3921 (CH-34)	<i>Taeniura lymma</i> (BO-86)	Mar Celebes, fora de Semporna (4°35'56.83"N, 118°39'44.42"L), Sabah, Malásia
h53		<i>Rhinebothroides</i> cf. <i>freitas</i> ¹	FJ177092	FJ177132	LRP 3929 (CH-54)	<i>Potamotrygon</i> cf. <i>castexi</i> (PU-25 b)	Boca Manu (12°16'16.27"S, 70°55'6.84"O), Madre de Dios, Peru
h54		<i>Scalithrium</i> n. sp. ²	FJ177093	FJ177133	LRP 3895 (CH-4)	<i>Dasyatis longus</i> (BJ-423)	Golfo da Califórnia, fora de San José del Cabo (23°24'5.22"N, 109°41'33.19"O), Baja California Sur, México
h55		<i>Spongiobothrium</i> sp. ²	FJ177094	FJ177134	LRP 3919 (CH-32)	<i>Rhynchobatus</i> cf. <i>australiae</i> (NT-66)	Golfo de Carpentaria, Mar Arafura, leste das Ilhas Wessel (11°17'43.63"S, 136°59'48.26"L), Território do Norte, Austrália
h56	Thysanocephalinae	<i>Thysanocephalum</i> sp.	AF287001	AF286963	-	<i>Galeocerdo cuvier</i>	EUA
h57	Ordem Tetracyllidea; Família Serendipidae Brooks and Barriga, 1995	<i>Duplicibothrium</i> n. sp. ²	FJ177095	FJ177135	LRP 3918 (CH-31)	<i>Rhinoptera</i> sp. (SE-84)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Saint-Louis (16°128.04"N, 16°30'33.45"O), Senegal
h58	Ordem Tetracyllidea; Família Serendipidae Brooks and Barriga, 1995	<i>Duplicibothrium</i> cf. <i>minutum</i> ²	FJ177096	FJ177136	LRP 3928 (CH-49)	<i>Rhinoptera bonasus</i> (SE-254)	Leste do Oceano Atlântico, fora de Diogué (12°34'29.57"N, 16°45'2.41"O), Senegal

¹ As sequências de *Cathetocephalus thatcheri* foram erroneamente atribuídas a *Sanguilevator yearsleyi* no GenBank.

² Correção do código do GenBank (no original: AF296927)