

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Zoologia**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (nível: mestrado)**

Taxonomia integrativa e inferências filogenéticas sobre a família  
Desmodoridae  
(Nematoda, Desmodorida)

Mariana da Fonseca Cavalcanti

ORIENTADOR: Dr. Rodrigo Augusto Torres  
Co-ORIENTADORA: Dra. Verônica G. da Fonsêca-Genevois

Recife, 2010

Mariana da Fonseca Cavalcanti

Taxonomia integrativa e inferências filogenéticas sobre a família  
Desmodoridae  
(Nematoda, Desmodorida)

ORIENTADOR: Dr. Rodrigo Augusto Torres

Co-ORIENTADORA: Dra. Verônica G. da Fonsêca-Genevois

Recife, 2010

**Cavalcanti, Mariana da Fonseca**

**Taxonomia integrativa e interferências filogenéticas sobre a família Desmodoridae (Nematoda, Desmodorida) / Mariana da Fonseca Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2010.**

**76 folhas : fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Biologia Animal, 2010.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Taxonomia animal 2. Zoologia – Classificação 3. Nematoda I. Título.**

**578.012**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/ CCB – 2010- 074**

Banca Examinadora

Professores examinadores titulares:

---

Dr. André Morgado Esteves

---

Dr. Rogério Tubino Vianna

---

Dr. Francisco Victor de Castro

Professores examinadores suplentes:

---

Dr. Ulisses dos Santos Pinheiro

---

Dr. Elaine Della Giustina Soares

Mariana da Fonseca Cavalcanti

Taxonomia integrativa e inferências filogenéticas sobre a família  
Desmodoridae  
(Nematoda, Desmodorida)

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Biologia  
Animal da Universidade Federal de  
Pernambuco, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Animal

ORIENTADOR: Dr. Rodrigo Augusto Torres  
Co-ORIENTADORA: Dra. Verônica G. da Fonsêca-Genevois

Recife, 2010

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais  
inteligente, mas o que melhor se adapta às  
mudanças”. Charles Darwin

Dedico esta dissertação à minha co-orientadora, prima, amiga e mentora,  
Verônica Gomes da Fonsêca-Genevois, que sempre acreditou em mim.

## Agradecimentos

Agradeço a esta entidade superior chamada Deus, que me deu energia quando achei que não teria mais.

Agradeço aos meus pais, Maurício e Ana Maria, por terem me propiciado as coisas necessárias para eu chegar aonde cheguei. E por me amarem tanto.

Agradeço a Rafael, meu namorado, melhor amigo, companheiro, por ter estado ao meu lado durante todo o processo do mestrado. Obrigada pela força, por acreditar em mim e por me escutar tanto. Amo-te muito.

Agradeço ao Professor Dr. Rodrigo Augusto Torres pela orientação e ensinamento no mundo da filogenia. Obrigada pelos debates, auxílios e enriquecimento dessa dissertação.

Agradeço ao Professor Dr. André Morgado Esteves pela disponibilização do material da Bacia do Maranhão.

Agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceito participar desta avaliação. Obrigada pelas enormes contribuições.

Agradeço a Professora Dra. Wilfrida Decraemer por ter propiciado o sequenciamento das amostras e ter estado sempre disposta a responder minhas dúvidas por email quase que imediato. Obrigada pela atenção, consideração e ajuda.

Agradeço a Professora Nic Smol pelo carinho, atenção e pela recepção em Gent.

Agradeço a Tânia pela hospedagem em Gent, como também pela amizade.

Agradeço a Andy Vierstraete pela execução do sequenciamento das amostras.

Agradeço muito as minhas eternas amigas Denise, Lala, Fabian e Carol. As conversar com vocês, mesmo que por email, ajudaram muito nesse processo.

Agradeço às amigas Patrícia Neres, Viviane Lira e Luciana Tosta, por sempre estarem dispostas a me ajudar, ensinar e conversar sobre tudo.

Agradeço a Cristina Silva pelo trabalho conjunto na realização do artigo do primeiro capítulo.

Agradeço a grande equipe que compõe o laboratório de meiofauna que compartilha comigo as alegrias e dificuldades de se trabalhar com Nematoda.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação em Biologia Animal pelos ensinamentos e pelo carinho também.

Agradeço muito à melhor turma de mestrado do programa de pós-graduação em Biologia Animal. Vocês são pessoas especiais. Guardarei pra sempre todos no meu coração.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro em forma de bolsa.

Agradeço a PETROBRAS na pessoa de Ana Falcão pelo apoio financeiro na execução desse projeto.

## LISTA DE FIGURAS

Página

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Representantes da subfamília Stilbonematinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).....5

**Figura 2.** Representantes da subfamília Desmodorinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).....5

**Figura 3.** Representantes da subfamília Spiriniinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).....6

**Figura 4.** Representantes das subfamílias: A) Pseudonchinae; B) Molgolaiminae e C) Prodesmodorinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).....6

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Bacia de Campos, Rio de Janeiro, onde os círculos representam as estações onde os espécimes de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. foram encontrados (Fonseca-Genevois, *et al.* 2009).....18

**Figura 2.** *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. Macho: A, corpo total; B, dentes, bulbo, anel nervoso, glândulas secretoria-excretória; C, cauda; glândulas caudais, espinereto, suplementos, espículas, gubernáculo, velum e seta precloacal; D, arranjos das papilas no macho, anulações da cutícula e anfídeos; D', arranjos das papilas no juvenil. Escalas: A, B, C = 50 µm e D, D' = 25 µm.....21

**Figura 3.** *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. Fêmea: A, corpo total; B, bulbo, anel nervoso, glândula secretoria-excretória, anulações da cutícula e anfídeo; C, ovários

refletidos; D, vulva e anulações do meio do corpo. Escalas: A, B, C = 50  $\mu\text{m}$  e D = 25  $\mu\text{m}$ .....22

**Figura 4.** . *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. SP. Macho: A, corpo total; B, bulbo; D, anelações do corpo; E, dentes; G, cauda, glândulas caudais e espinereto; H, espícula e gubernaculum. Fêmea: C, corpo total; F, vulva e ovários refletidos. Escalas: A, D: 50  $\mu\text{m}$ ; B, E, F, G e H: 20  $\mu\text{m}$ ; C: 100  $\mu\text{m}$ .....24

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Topologia do Neighbor-joining baseado em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia contata*, *Calomicroalimus* sp. e *Daptonema matrona*). Os números são valores de bootstrap e jackknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%. Barra de escala= 0,1 substituições por sítio.....55

**Figura 2.** Árvore de consenso estrito da Máxima Parcimônia baseada em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia contata*, *Calomicroalimus* sp. e *Daptonema matrona*). Os números nos ramos são valores de bootstrap, jackknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50% e suporte de Bremen.....57

**Figura 3.** Topologia de Inferência Bayesiana baseada em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia contata*, *Calomicroalimus* sp. e *Daptonema matrona*). A topologia é resultante de 29.601 árvores (3.000.000 de gerações/desvio padrão de 0,009947.....59

**Figura 4.** Topologia da Máxima Parcimônia baseada em caracteres morfológicos dos 40 táxons de Desmodoridae e o grupo externo hipotético.....62

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Características morfométricas (em  $\mu\text{m}$ ) de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov.  
sp. n.v. = não visível, n.a. = não aplicável.....23

**Tabela 2.** Caracteres diagnósticos dos gêneros de Spiriniinae. Os gêneros foram agrupados por similaridade da cutícula.....26

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Espécies de Desmodoridae e seus respectivos número de acesso do banco de dados GenBank. As cinco primeiras sequências são os grupos externos.....50

**Tabela 2.** Séries de homólogos, seus respectivos estados de caráter e suas polaridades, sendo 0 plesiomorfia, 1, 2, 3 e 4 apomorfias, e ? ausência de informação.....52

**Tabela 3.** Matriz formada pelos táxons estudados e os caracteres morfológicos polarizados. Grupo externo hipotético.....61

## RESUMO

O conceito de uma taxonomia integrativa é uma ferramenta que utiliza marcadores moleculares de DNA, caracteres ecológicos e caracteres morfológicos, a fim de auxiliar na identificação da biodiversidade global. Os gêneros de Desmodoridae estão dispostos em seis subfamílias, por apresentarem características muito diferentes. Sendo assim, um estudo de taxonomia integrativa foi assim proposto para melhor entender a diversidade da família. Um novo gênero e uma nova espécie, *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp., foram descritas, apresentando como características principais anfídeos uniespiral com fovea anfideal circular e cavidade bucal com três dentes de tamanho iguais. Com base em evidências morfológicas e moleculares, foram testadas as relações filogenéticas entre táxons representativos das 6 subfamílias. A análise de distância genética (*neighbor-joining*) mostrou que Desmodoridae é uma unidade genética coesa, porém subdivida em dois agrupamentos mais similares entre si. Apesar da coesão genética de Desmodoridae, as análises moleculares de máxima parcimônia (MP) e de inferência Bayesiana (IB) indicaram que a família parece ser polifilético. *Molgolaimus demani* e *Prodesmodora* spp., são grupos irmãos e parecem não pertencer a família Desmodoridae. *Spirinia* e *Metachromadora* se comportaram como grupos monofiléticos, entretanto este último parece não pertencer a subfamília Spiriniinae. *Acanthopharynx* se mostrou monofilético e grupo irmão de *Desmodora communis*, porém ambos se mostraram distantes genético-evolutivamente de *D. pontica* e *D. ovigera*. *Xyzzors* sp. parece fazer parte de Desmodoridae. Pelas análises moleculares, Stilbonematinae se mostrou polifilética devido à posição de *Robbea hypermnestra*, *Eubostrichus topiarius* e *E. parasitiferus*; entretanto a análise filogenética (MP) por meio dos dados morfológicos apresentou Stilbonematinae como monofilético. A análise de MP por dados morfológicos mostrou que das seis subfamílias de Desmodoridae, apenas três podem ser ditas como monofiléticas, Stilbonematinae, Molgolaiminae e Prodesmodorinae. Ainda se faz necessário compreender a evolução dos caracteres morfológicos e estabelecer quais apresentam sinais filogenéticos, uma vez que os dados moleculares se mostraram mais eficazes para o estudo da diversidade e evolução de Desmodoridae do que os caracteres morfológicos aqui utilizados.

Palavras-chave: Desmodorinae, Spiriniinae, Molgolaiminae, Prodesmodorinae, Stilbonematinae, 18S rDNA, iluminação-recíproca.

## Abstract

Integrative taxonomy is a tool that uses DNA molecular markers, ecologic and morphologic characters, to assist the identification of the global biodiversity. Desmodoridae genera are placed into six subfamilies, for showing very different characters. Thus, an integrative taxonomy study was proposed to better knowledge of the diversity of this family. A new genus and a new species, *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp., have been described, presenting as its main features amphids unispiral with circular amphideal fovea and buccal cavity with three teeth of equal size. Based on morphological and molecular evidence, the evolutionary relationship between taxa of the 6 subfamilies, were tested. The genetic distance analysis (*neighbor-joining*) showed that Desmodoridae is a cohesive genetic unit, but subdivided into two groups more similar to each other. Despite the genetic cohesiveness of Desmodoridae, the analysis of maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) indicated that the family appears to be polyphyletic. *Molgolaimus demani* and *Prodesmodora* spp., are sister groups and appear not to belong to the family Desmodoridae. *Spirinia* and *Metachromadora* behaved as monophyletic groups, though the latter seems not to belong to the subfamily Spiriniinae. *Acanthopharynx* proved to be monophyletic and sister group to *Desmodora communis*, but both proved to be evolutionarily and genetically distant from *D. pontica* and *D. ovigera*. *Xyzzors* sp. seems to be part of Desmodoridae. Based on molecular analysis, Stilbonematinae showed to be polyphyletic because of the position of *Robbea hypermnestra*, *Eubostrichus topiarius* and *E. parasitiferus*; although the phylogenetic analysis (MP) based on morphological data showed Stilbonematinae as monophyletic. Based only on morphological characters selected, the family Desmodoridae proved to be monophyletic; however only three of six subfamilies are monophyletic, Molgolaiminae, Prodesmodorinae and Stilbonematinae. Although it is necessary to understand the evolution of morphological characters and establish which ones have phylogenetic signals, since the molecular data were more effective for studying the diversity and evolution of Desmodoridae than the morphological characters used here.

Key-words: Desmodorinae, Spiriniinae, Molgolaiminae, Prodesmodorinae, Stilbonematinae, 18S rDNA, reciprocal illumination.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS  
LISTA DE FIGURAS  
LISTA DE TABELAS  
RESUMO

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Introdução Geral.....</b>                      | <b>1</b> |
| 1.1 Taxonomia integrativa.....                       | 1        |
| 1.2 Aspectos biológicos gerais do Filo Nematoda..... | 1        |
| 1.3 Revisão das classificações do Filo Nematoda..... | 2        |
| 1.4 Desmodora Filipjev, 1922.....                    | 3        |
| <b>2. Justificativa.....</b>                         | <b>7</b> |
| <b>3. Apresentação.....</b>                          | <b>7</b> |
| <b>4. Referências Bibliográficas.....</b>            | <b>7</b> |

### Capítulo 1: Descrição de um novo gênero e uma nova espécie de Desmodoridae.

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                                                         | 15 |
| 2. Objetivo.....                                                                                                           | 15 |
| 3. Materiais e métodos.....                                                                                                | 15 |
| 3.1 Descrição da área.....                                                                                                 | 15 |
| 3.2 Procedimento de campo.....                                                                                             | 15 |
| 3.3 Procedimento de laboratório.....                                                                                       | 16 |
| 3.4 Identificação dos nematódeos.....                                                                                      | 16 |
| 4. Resultados.....                                                                                                         | 17 |
| 4.1 Material estudado.....                                                                                                 | 17 |
| 4.2 Etimologia.....                                                                                                        | 18 |
| 4.3 Classificação Taxonômica.....                                                                                          | 19 |
| 4.4 Diagnose da subfamília Spiriniinae (segundo Decraemer & Smol 2006).....                                                | 19 |
| 4.5 Lista de gêneros válidos em Spiriniinae (Lorenzen 1994; Verschelde, Muthumbi & Vincx 1995; Vincx & Goubault 1989)..... | 19 |
| 4.6 Diagnose de <i>Spirodesma</i> nov. gen.....                                                                            | 19 |
| 4.7 Descrição de <i>Spirodesma magdae</i> nov. gen. nov. sp.....                                                           | 20 |
| 4.8 Diagnose diferencial.....                                                                                              | 24 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.9 Emenda na diagnose da subfamília Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965..... | 25 |
| 5. Discussão.....                                                            | 25 |
| 6. Conclusão.....                                                            | 26 |
| 7. Referências bibliográficas.....                                           | 27 |

## ANEXO

### **Capítulo 2: Iluminação recíproca, taxonomia integrativa (DNA/morfologia) e relações genético-evolutivas em Desmodoridae (Nematoda: Desmodorida).**

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                                                                         | 43 |
| 2. Hipóteses.....                                                                                                                          | 45 |
| 3. Objetivos.....                                                                                                                          | 45 |
| 3.1 Geral.....                                                                                                                             | 45 |
| 3.2 Específicos.....                                                                                                                       | 46 |
| 4. Materiais e métodos.....                                                                                                                | 46 |
| 4.1 Material utilizado.....                                                                                                                | 46 |
| 4.2 Procedimentos de Laboratório.....                                                                                                      | 46 |
| 4.3 Extração do DNA, PCR e sequenciamento.....                                                                                             | 47 |
| 4.4 Análise dos dados moleculares.....                                                                                                     | 49 |
| 4.5 Análise de dados morfológicos.....                                                                                                     | 51 |
| 5. Resultados.....                                                                                                                         | 53 |
| 5.1 Sequenciamento e alinhamento.....                                                                                                      | 53 |
| 5.2 Determinação do modelo de evolução das sequências.....                                                                                 | 53 |
| 5.3 Similaridade genética ( <i>Neighbor-joining</i> ).....                                                                                 | 53 |
| 5.4 Filogenia molecular.....                                                                                                               | 56 |
| 5.4.1 Máxima parcimônia (MP).....                                                                                                          | 56 |
| 5.4.2 Análise de inferência Bayesiana (IB).....                                                                                            | 58 |
| 5.5 Filogenia morfológica.....                                                                                                             | 60 |
| 6. Discussão.....                                                                                                                          | 63 |
| 6.1 Monofilia de Desmodoridae.....                                                                                                         | 63 |
| 6.2 <i>Status</i> taxonômico e filogenético de <i>Molgolaimus demani</i> (Molgolaiminae) e <i>Prodesmodora</i> spp. (Prodesmodorinae)..... | 63 |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3 Monofilia de Stilbonematinae.....                                                                           | 64 |
| 6.4 <i>Status</i> taxonômico e filogenético de <i>Spirinia</i> e de <i>Metachromadora</i><br>(Spiriniinae)..... | 65 |
| 6.5 <i>Status</i> taxonômico e filogenético de <i>Desmodora</i> e <i>Acanthopharynx</i><br>(Desmodorinae).....  | 66 |
| 6.6 Posicionamento filogenético de <i>Xyzzors</i> sp.....                                                       | 67 |
| 6.7 Resolução da monoflia das subfamílias pela filogenia morfológica.....                                       | 67 |
| 7. Conclusões.....                                                                                              | 68 |
| 8. Referências bibliográficas.....                                                                              | 69 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Taxonomia integrativa

O conceito de uma taxonomia integrativa é uma ferramenta que se utiliza marcadores moleculares (DNA nuclear e/ou mtDNA), caracteres ecológicos e caracteres morfológicos, a fim de auxiliar na identificação da biodiversidade global (Seberg *et al.* 2003; Dayrat 2005; DeSalle *et al.* 2005; Rubinof 2006, Fonseca *et al.* 2008). Dayrat (2005) discute que uma abordagem integrativa é o melhor futuro possível para a taxonomia. Pois, devido a sua complexidade, a diversidade da vida precisa ser estudada por meio de perspectivas múltiplas e complementares.

Taxonomia integrativa tem sido eficientemente introduzida para alguns grupos de vertebrados (*e.g.* Wiens & Penkrot 2002; Malhotra & Thorpe 2004) e invertebrados (*e.g.* Parmakelis *et al.* 2003; Wahlberg *et al.* 2005), mas muito pouco para outros grupos como os nematódeos (De Ley *et al.* 1999; De Ley *et al.* 2005; Bhadury *et al.* 2008; Neres *et al.* 2010). Além, a grande maioria dos esforços para a integração dos métodos taxonômicos para classificação de espécies de nematódeos tem sido focada em grupos parasitas (Blaxter *et al.*, 1998; Nadler 2002) e algumas espécies terrestres (Blouin 2002; Abebe & Blaxter 2003; Chilton *et al.* 2001; Waite *et al.* 2003; Foucher *et al.* 2004; Fontanilla & Wade 2008; Holterman *et al.* 2008). Citar os outros com nematoda marinhos

### 1.2 Aspectos biológicos gerais do Filo Nematoda

Os nematódeos marinhos estão amplamente distribuídos, ocorrendo da costa até regiões abissais. Onde são encontrados, eles são frequentemente os mais numerosos entre os metazoários, chegando a 26.646 espécies registradas para o filo, com estimativas de cerca de um milhão de espécies (Hugot *et al.* 2001) ou até mesmo de 100 milhões (Lambhead, 1993).

Após um século de pesquisas taxonômicas, provavelmente é conhecida apenas 10% da riqueza de espécies de Nematoda e a estimativa varia entre 0,1 a 100 milhões (Meldal *et al.* 2007). Esta diversidade dos nematódeos ainda está subapreciada, pois para ser constatada, esta requer frequentemente o uso de microscópios óptico e eletrônico de alta resolução, assim como o conhecimento da larga escala de formas descritas em literaturas taxonômicas especializadas. Como resultado, estudos ecológicos sobre a diversidade dos nematódeos são usualmente restritos a identificação no nível de gênero (De Ley *et al.* 2005).

Os caracteres morfológicos mais comumente utilizados na classificação dos representantes do Filo Nematoda são a cutícula, as setas, a cabeça, o anfídeo, a cavidade

bucal, o esôfago e os órgãos reprodutores (Lorenzen 1994), respeitando algumas exceções. Para nematódeos marinhos existem excelentes chaves pictoriais para identificação de seus representantes (Platt & Warwick 1983, 1988; Warwick *et al.* 1998). Entretanto, apesar desse grupo ser estudado a mais de 350 anos, a falta de critérios objetivos para acessar a homologia entre caracteres morfológicos, tem dificultado a reconstrução da filogenia do filo Nematoda, pois a ontogênese e ultra-estrutura dos nematódeos são fracamente entendidas e a falta de registros fossilíferos torna as comparações bem deficitárias (Meldal *et al.* 2007).

### **1.3 Revisão das classificações do Filo Nematoda**

Em 1922, Micoletzky supões que diferenças na morfologia da cavidade bucal podiam ser utilizadas para determinar relações entre grandes grupos. Entretanto, a subdivisão do filo em cinco famílias pareceu ser instável. O sistema bipartite proposto por Chitwood (1933) propões a subdivisão do filo em “Aphasmidia” e “Phasmidia”. Em 1958, Chitwood decidiu mudar os nomes para “Adenophorea” e “Secernentea”, respectivamente, e por décadas quase todos os nematologistas aderiram a esta subdivisão. (Heip *et al.* 1982)

Lorenzen (1981) seguiu Chitwood e caracterizou a classificação de Adenophorea em mais detalhes, e assim forneceu o primeiro sistema filogenético baseado em princípios cladísticos (Heip *et al.* 1982). Porém, os caracteres morfológicos sozinhos pareciam insuficientes para resolver relacionamentos filogenéticos mais complicados (Decraemer & Smol 2006).

Posteriormente, Blaxter *et al.* (1998) produziram o primeiro cenário filogético em nematódeos usando 53 seqüências da subunidade ribossomal nuclear (SSU) e seus resultados indicaram que ‘Adenophorea’ poderia ser parafilética, pois incluíram o ancestral de ‘Secernentea’. Apesar de suas análises terem sido baseadas principalmente em espécies terrestres e parasitas economicamente importantes (Dorylaimida, Mermithida, Mononchida, Rhabditida, Trichinellida, e Triplonchida) foi possível propor uma revisão filogenética do filo, mesmo que na ausência de dados dos grupos encontrados em habitat marinhos (Araeolaimida, Chromadorida, Desmodorida, Desmoscolecida, Enoplida, and Monhysterida).

Outros estudos (Aleshin *et al.* 1998; Kampfer *et al.* 1998; Litvaitis *et al.* 2000) adicionaram mais espécies marinhas, porém muitos ramos ainda foram sub-representados (Enoplida, Chromadorida, Monhysterida, e Desmoscolecida). Em 2001, Coomans demonstrou que a combinação de dados de Blaxter *et al.* (1998) e Alenshin *et al.* (1998) apresentaram ‘Adenophorea’ como parafilética e que existem evidências suficientes para a divisão do filo Nematoda em duas classes (“Adenophorea” e “Secernentea”).

De Ley (2000) e Blaxter (2004) atualizaram a classificação do filo Nematoda usando dados moleculares disponíveis para espécies adicionais, e dados morfológicos para ajudar o posicionamento dos táxons para qual o SSU ainda não estivesse disponível. Ainda assim, o sistema foi baseado em sua maioria em táxons terrestres e parasitas. Recentemente, Meldal *et al.* (2007) apresentaram seus resultados e trouxeram uma nova resolução filogenética de Nematoda, ainda com algumas dúvidas. Muitos dos achados são ainda consistentes com os resultados de De Ley & Blaxter (2002, 2004). Com adição de alguns chromadorides marinhos, eles puderam confirmar a sugestão de Blaxter *et al.* (1998) e De Ley & Blaxter (2002) de que a classe ‘Secernentea’ precisa ser rebaixada um nível taxonômico, uma vez que esta deriva de um ancestral comum juntamente com Axonolaimidae, *Desmolaimus zeelandicus* e *Isolaimium* sp, e não diretamente do ancestral comum a todos os nematódeos. Em 2006, Holterman *et al.* apresentaram a subdivisão do filo Nematoda em 12 clados baseados em uma série de bifurcações muito bem suportadas na árvore. Mais recentemente, Megen *et al.* (2009) selecionaram aproximadamente 1200 sequências de SSU rDNA do filo Nematoda, e seus resultados foram semelhantes aos de Holterman *et al.* (2006).

Finalmente, o advento dos métodos de taxonomia cladística, com base em caracteres moleculares de DNA, tem revelado diferentes padrões de diversidade em nematódeos (Foucher *et al.* 2004; Griffith *et al.* 2005; De Ley *et al.* 2005; Meldal *et al.* 2007; Holterman *et al.* 2008; Ferri *et al.* 2008).

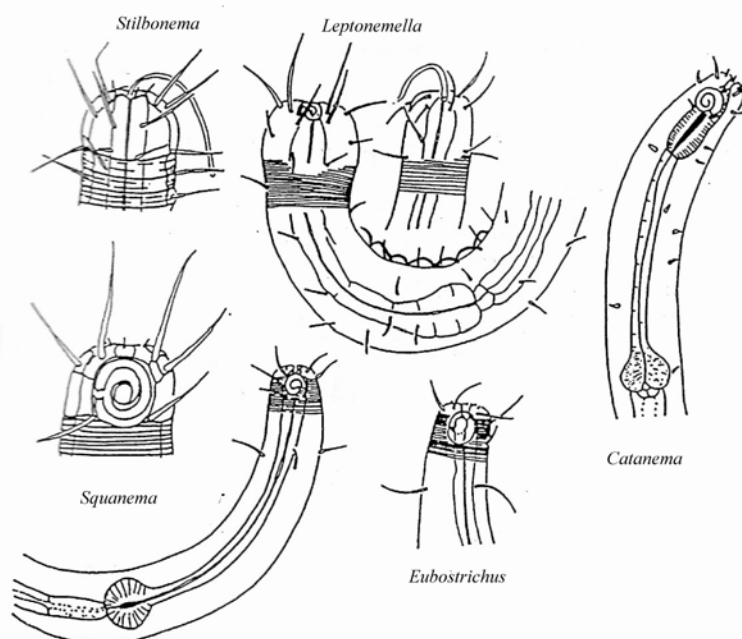
#### **1.4 Desmodoridae Filipjev, 1922**

Em 1934, Filipjev classificou as espécies desse grupo como parte das sufamílias Richtersiinae, Desmodorinae, Monoposthiinae, Epsilonematinae e Draconematinae da ordem Chromadorida (Heip *et al.* 1982). Então, em 1950, Chitwood & Chitwood agruparam essas espécies na superfamília Desmodoroidea, e diferenciaram três famílias pela forma do corpo e presença de setas ambulatórias e glandulares: Desmodoridae, Epsilonematidae Steiner, 1927 e Draconematidae Filipjev, 1918 (Heip *et al.* 1982) Foi quando em 1965, De Coninck elevou Desmodorida para acomodar as espécies que diferem de Chromadorida pela cápsula cefálica e cutícula sem pontilhações; e a presença ou ausência de tubos adesivos os colocou respectivamente em Draconematina ou Desmodorina. O último foi subdividido em sete famílias baseado em algumas características como: cutícula com ou sem anelações, presença ou ausência de cápsula cefálica, estrutura do órgão cefálico sensitivo, os ovários, o número e tamanho de anelações. Lorenzen (1981) rejeitou a ornamentação da cutícula como um critério de diferenciação de Desmodorida e manteve os membros desta ordem em Chromadorida

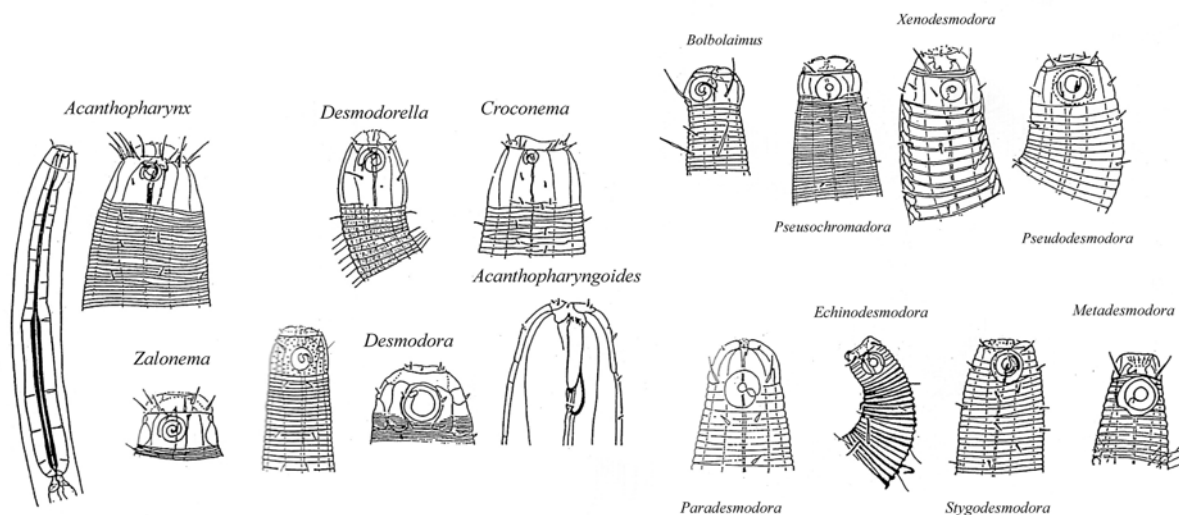
(Heip *et al.* 1982). Finalmente, em 2002, De Ley & Blaxter elevaram a família Desmodoridae a Ordem, com uma única subordem e duas superfamílias. A superfamília Desmodoroidea caracteriza-se pela presença de um testículo anterior, nos machos, e ovários refletidos, nas fêmeas, e comporta três famílias: Desmodoridae, Epsilonematidae e Draconematidae (Decraemer & Smol 2006).

Desmodoridae se caracteriza pela presença de um anfídeo em espiral, usualmente com uma ou duas voltas, faringe com um bulbo muscular posterior e cauda cônica (Decraemer & Smol 2006), entretanto, segundo Lorenzen (1994), não existe nenhuma sinapomorfia que sustenta a monofilia de Desmodoridae. A família se destaca por não apresentar as características típicas das famílias Epsilonematidae e Draconematidae, como tubos adesivos ou setas ambulatórias. Devido a isto, esta família dispõe de gêneros com caracteres muito diferentes, o suficiente para reagrupá-los em seis subfamílias: Stilbonematinae Cobb, 1920; Desmodorinae Filipjev, 1922; Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965; Prodesmodorinae Lorenzen, 1981; Molgolaiminae Jensen, 1978 e Pseudonchinae Gerlach & Riemann, 1973. Sendo as três últimas monogenéricas.

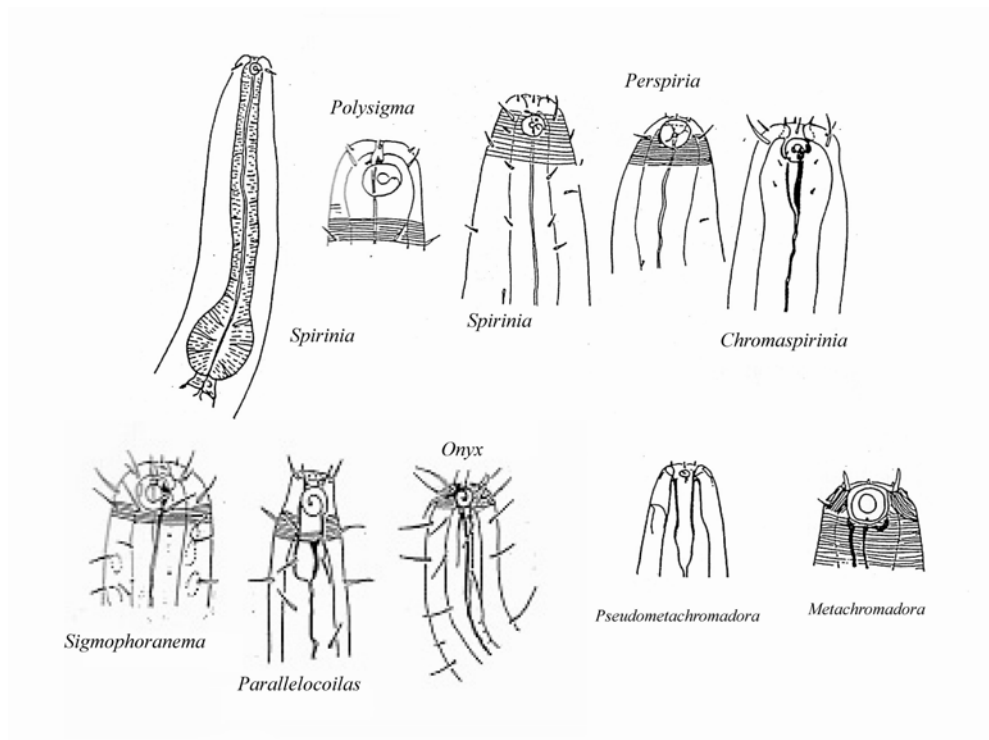
A partir das diagnoses das subfamílias de Desmodoridae, segundo Decraemer & Smol (2006), os membros de Stilbonematinae são associados obrigatoriamente a bactérias de crescimento epitelial (figura 1). Os nematódeos de Desmodorinae apresentam como característica principal a presença de cápsula cefálica (figura 2) e os representantes de Spiriniinae não apresentam cápsula cefálica e a cavidade bucal é pequena (figura 3). Os nematódeos de Prodesmodorinae têm reprodução exclusivamente partogenética e são exclusivamente limno-terrestres, enquanto que Molgolaiminae difere principalmente pela forma criptoespiral dos anfídeos. Os membros de Pseudonchinae apresentam uma cavidade bucal simétrica bilateralmente, grande, tubular, subdividida e com dentes ventrosublateral no nível da junção (figura 4).



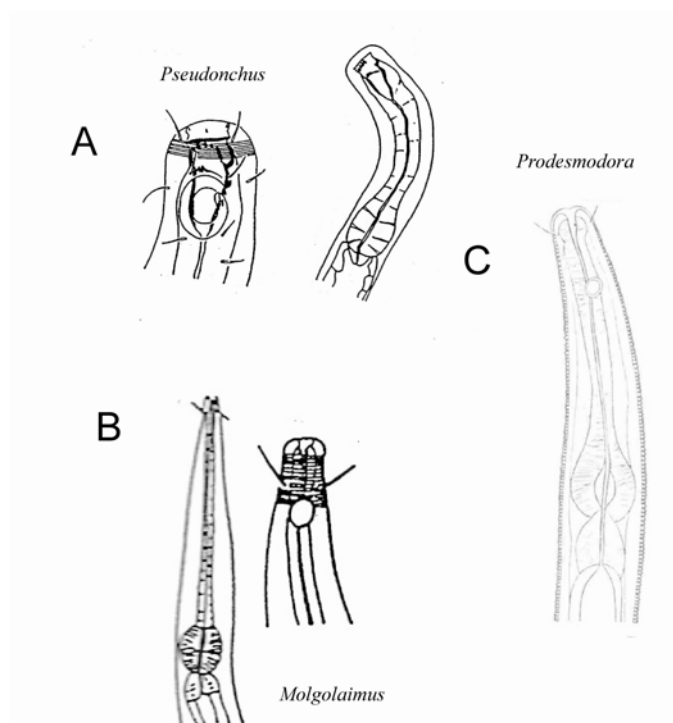
**Figura 1.** Representantes das subfamílias Stilbonematinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).



**Figura 2.** Representantes da subfamília Desmodorinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).



**Figura 3.** Representantes da subfamília Spiriniinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).



**Figura 4.** Representantes das subfamílias: A) Pseudonchinae; B) Molgolaiminae e C) Prodesmodorinae (Fonte: Apostila do curso internacional de Nematologia, Universidade de Ghent).

## 2. JUSTIFICATIVA

De maneira geral, os nematódeos marinhos constituem um grupo faunístico de significativa importância ecológica (circulação do oxigênio do sedimento, decomposição da matéria orgânica, fluxo de energia) (Heip *et al.* 1985). Porém, apresentam uma significativa carência de conhecimento da evolução dos caracteres morfológicos capazes de expressar a sua diversidade taxonômica de forma mais consistente. Nesse sentido, o uso de abordagens moleculares direcionadas a uma taxonomia cladística vem auxiliando sobremaneira o entendimento sobre tal diversidade (Foucher *et al.* 2004; De Ley *et al.* 2005; Meldal *et al.* 2007; Holterman *et al.* 2008; Megen *et al.* 2009).

O conjunto de evidências morfológicas, potencialmente sinapomórficas, que sistematizam a diversidade da família Desmodoridae em 6 subfamílias, tais evidências estão sujeitas, de forma completa ou parcial, a testes perante outros conjuntos de dados. No tocante ao presente estudo, foram usados métodos de similaridade genética e de sistemática molecular para testar o grau de sustentabilidade taxonômica que as evidências morfológicas disponíveis apresentam para os táxons a serem estudados.

## 3. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é compreendido por dois capítulos. O primeiro sobre a descrição de um novo gênero e uma nova espécie de Desmodoridae já publicado recentemente (Cavalcanti, *et al.* 2009). Já o segundo capítulo versou sobre um estudo de similaridade/sistemática filogenética que testa as relações evolutivas entre táxons representativos de 6 subfamílias componentes de Desmodoridae, com base em evidências morfológicas e moleculares.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleshin, V. V.; Milyutina, I. A.; Kedrova, O. S.; Vladychenskaya, N. S.; Nikolai B. & Petrov, N. B. 1998. Phylogeny of Nematoda and Cephalorhyncha derived from 18S rDNA. *Journal of Molecular Evolution*, 47, 597–605;
- Bhadury, P.; Austen, M. C.; Bilton, D. T.; Lambshead, P. J. D.; Rogers, A. D. & Smerdon, G. R. 2008. Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification. *Marine Biology*, 154, 509-518;

Blaxter, M. L.; De Ley, P.; Garey, J. R.; Liu, L. X.; Scheldeman, P.; Vierstraete, A.; Vanfleteren, J. R.; Mackey, L. Y.; Dorris, M.; Frisse, L. M.; Vida, J. T. & Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75;

Blaxter, M. L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359, 669-679;

Blouin, M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, 32, 527-531;

Chilton, N. B.; Huby-Chilton, F. & Gasser, R. B. 2003. First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17, 33-39;

Chitwood, B. G. 1933 A revised classification of the Nematoda, *Journal of Parasitology*, 20 (2), p. 131;

Chitwood, B. G. & M.B. Chitwood, 1950. An Introduction to Nematology (second ed.), Monumental Printing Company, Baltimore, MD. 372 pp;

Chitwood, B. G. 1958. The designation of official names for higher taxa of invertebrates. *Bullet of Zoological Nomenclature*, 15, 860-95;

Cavalcanti, M. F.; Silva, M. C. & Fonseca-Genevois, V. 2009. *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. (Nematoda: Desmodoridae) from the Brazilian deep sea (Campos Basin, Rio de Janeiro, Brazil). *Zootaxa*, 2096, 109-118;

Coomans, A. 2001. Present status and future of nematode systematics. *Nematology*, 4 (5), 573-582;

Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84, 407-415;

Decraemer, W. & Smol, N. 2006. Orders Chromadorida, Desmodorida and Desmoscolecida In *Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*, 17, 497-573;

De Coninck, L. A. 1965. Classe des Nematodes-Systematique des Nematodes et sous-classe des Adenophores. *Traite de Zoologie* (ed. Grasse), 4(2), 586–681;

De Ley, P.; Félix, M. A.; Frisse, L. M.; Nadler, S. A.; Sternberg, P. W. & Thomas, W. K. 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1, 519–612;

De Ley, P. 2000. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. *Nematology*, 2, 9-16;

De Ley, P. & Blaxter, M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. In: D. L. Lee (ed.) *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London, 1-30;

De Ley, P. & Blaxter, M. L. 2004. A new system for Nematoda. In: Cook, R., Hunt, D.J. (Eds.), *Proceedings of the Fourth International Congress of Nematology*, 8–13 June 2002, Tenerife, Spain. *Nematology Monographs and Perspectives* 2;

De Ley, P.; De Ley, I. T.; Morris, K.; Abebe, E.; Mundo-Ocampo, M.; Yoder, M.; Heras, J.; Waumann, D.; Rocha-Olivares, A.; Burr, A. H. J.; Baldwin, J. G. & Thomas, W. K. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1945–1958;

DeSalle, R.; Egan, M. G. & Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1905–1916;

Eyualet, A. & Blaxter, M. 2003. Comparison of Biological, Molecular, and Morphological Methods of Species Identification in a Set of Cultured *Panagrolaimus* Isolates. *Journal of Nematology*, 35 (1), 119-128;

Ferri, E.; Barbuto, M.; Bain, O.; Uni, S.; Guerrero, R.; Ferté, H.; Bandi, C.; Martin, C. & Casiraghi, M. 2008. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6, 1;

Filipjev, I. N. 1934. The classification of the freeliving Nematodes and their relation to the parasitic Nematodes. Smithsonian Miscellaneous Collection, Washington, 89 (6), 1-63.

Fonseca, G.; Derycke, S. & Moes, T. 2008. Integrative taxonomy in two free-living nematodes species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94 (4), 737 – 753;

Fontanilla, I. K. C. & Wade, C. M., 2008. The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying infective 3rd juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Tropica*, 105, 181-186;

Foucher, A. M.; Bongers, T.; Noble, L. & Wilson, M. 2004. Assessment of nematodes biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 2027-2032;

Griffith, R., Giblin-Davis, R. M.; Koshy, P. K. & Sosamma, V. K. 2005. Chapter 13. Nematode parasites of coconut and other palms. *In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edition. [M. Luc, R. Sikora, and J. Bridge, eds.]. CABI Publishing, 493-527;

Heip, C.; Vincx, M.; Smol, N. & Vranken, G. 1982. The systematics and ecology of free-living marine Nematodes. *Helminth. Abstr. Series B. Plant Nematology*, 51, 1 – 24;

Holterman, M.; Holovachov, O.; van den Elsen, S.; van Megen, H.; Bongers, T.; Bakker, J. & Helder, J. 2008. Small subunit ribosomal DNA-based phylogeny of basal Chromadoria (Nematoda) suggests that transitions from marine to terrestrial habitats (and vice versa) require relatively simple adaptations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 758-763;

Hugot, J. P.; Baujard, P.; Morand, S. 2001. Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, n.3, 199-208;

Kampfer, S.; Sturmbauer, C. & Ott, J. 1998. Phylogenetic analysis of rDNA sequences from adenophorean nematodes and implications for the Adenophorea-Secernentea controversy. *Invertebrate Biology*, 117, 29-36;

Lamshead, P. J. D. 1993. Recent development in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*, n.19, 5-24;

Litvaitis, M. K.; Bates, J. W.; Hope, W. D. & Moens, T. 2000. Inferring a classification of the Adenophorea (Nematoda) from nucleotide sequences of the D3 expansion segment (26/28S rDNA). *Canadian Journal of Zoology*, 78, 911-922;

Lorenzen, S. 1981. Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. Veröffentlichungen des Institut für Meeresforschungen Bremerhaven, Supplement, 7, 1-449;

Lorenzen, S. 1994 *Phylogenetic Systematics of Freelifving Nematodes*. Ray Society, London, 383pp.

Malhotra, A. & Thorpe, R. S. 2004. A phylogeny of four mitochondrial gene regions suggests a revised taxonomy for *Asian pitvipers* (Trimeresurus and Ovophis). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 83- 100;

Micoletzky H. 1922. Die freilebenden Erd- Nematoden mit beson derer Berücksichtigung der Steiermark und der Bukowina, zugleichmit einer Revision sämtlicher nicht mariner, freilebender Nematoden in Form von Genus-Beschreibungen und Bestimmungsschlüsseln. *Archiv für Naturgeschichte*, 87, 1-650;

Meldal, B. H. M. , N. J. Debenham, P. De Ley, I. Tandingan De Ley, J. R. Vanfleteren, A. R. Vierstraete, W. B., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P. A., Austen, M. C., Blaxter, M. L., Rogers A. D. & Lamshead, P. J. D. 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42 (3): 622-636.

Nadler, S. A. 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology*, 4(5), 615-625;

Neres, P.; Fonsêca-Genevois, V.; Torres, R. A.; Cavalcanti, M. F.; de Castro, F. J.; da Silva, N. R.; Rieger, T. T.; Decraemer, W. 2010. Morphological and molecular taxonomy of a new *Daptonema* (Nematoda, Xyalidae) with comments on the systematics of some related taxa. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 158, 1–15;

Platt, H. M. & Warwick, R. M. 1983. *Free-living marine nematodes. Part I: British Enoplids*. Synopsis of the British fauna (New series) n° 28. Cambridge, Cambridge University Press. 307p;

Platt, H. M. & Warwick, R. M. 1988. *Free-living marine nematodes. Part II: British Chromadorids*. Synopsis of the British fauna (New series) n° 38, E. J. Brill, Leiden. 502p;

Parmakelis, A.; Spanos, L.; Papagiannakis, G.; Louis, C. & Mylonas, M. 2003. Mitochondrial DNA phylogeny and morphological diversity in the genus *Mastus* (Beck, 1837). A study in a recent (Holocene) island group (Koufonisi, SE CRETE). *Biological Journal of the Linnean Society*, 78, 383-399;

Rubinoﬀ, D.; Cameron, S. & Will, K. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for "barcoding" identification. *The Journal of Heredity*, 97(6), 581-94;

Seberg, O.; Humphries, C.; Knapp, S.; Stevenson, D.; Petersen, G.; Scharﬀ, N. & Andersen, N. 2003. Shotcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18 (2), 63-65;

van Megen, H.; van den Elsen, S.; Holterman, M.; Karssen, G.; Mooyman, P.; Bongers, T.; Holovachov, O.; Bakker, J.; Helder, J. 2009. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 11 (6), 927-950(24);

Wiens, J. J. & Penkrot, T. L. 2002. Delimiting species based on DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*, 51, 69–91

Wahlberg, N.; Braby, M. F.; Brower, A. V. Z.; de Jong, R.; Lee, M. M.; Nylin, S.; Pierce, N.; Sperling, F. A.; Vila, R.; Warren, A. D. & Zakharov, E. 2005: Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 272, 1577-1586;

Waite, I. S.; O'Donnel, A. G.; Harrison, A.; Davies, J. T.; Colvan, S. R.; Ekschmitt, K.; Dogan, H.; Wolters, V.; Bongers, T.; Bongers, M.; Bakonyi, G.; Nagy, P.; Papatheodorou, E. M.; Stamou, G. P. & Boström, S. 2003. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 1165-1173;

Warwick, R. M.; Platt, H. M. & Sommerfield, P. 1998. Free-living Marine Nematodes- Part III British Monhysterids. *Synopses of the British Fauna (New Series)* Eds.: Doris M. Kermack e R.S.K. Barnes, 53, 296p.

## **CAPÍTULO 1**

### **Descrição de um novo gênero e uma nova espécie de Desmodoridae.**

Cavalcanti, M. F.; Silva, M. C. & Fonseca-Genevois, V. G. 2009. *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. (Nematoda: Desmodoridae) from Brazilian deep sea (Campos Basin, Rio de Janeiro, Brazil). *Zootaxa*, 2096: 109-118.

## 1. INTRODUÇÃO

Nematódeos marinhos de vida livre pertencentes à família Desmodoridae Filipjev, 1922 têm sido reportados na maioria dos sedimentos de mar profundo, mas sempre em pequenos números, chegando ao máximo a 1% do total de indivíduos (Soetaert & Heip 1995).

Na Bacia de Campos, 195 gêneros foram identificados, sendo 10 deles (5%) representantes de Desmodoridae (comunicação pessoal). Entre estes, quatro (40%) foram identificados como membros da subfamília Spiriniinae: *Chromaspirinia* Filipjev, 1918, *Metachromadora* Filipjev, 1918, *Onyx* Cobb, 1891 e *Spirinia* Gerlach, 1963.

## 2. OBJETIVOS

Descrever um novo gênero e uma nova espécie de nematódeo pertencente à família Desmodoridae.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Descrição de Área

A Bacia de Campos (Figura 1) está situada no litoral Sudeste do Brasil (21°30'W e 23°30'S) e se estende desde o estado do Rio de Janeiro até o Espírito Santo, sendo considerada relativamente jovem em termos de idade geológica (140 – 130 MA) (Defeo 2002). Ocupa a área de cerca de 120.000 km<sup>2</sup> até a batimetria de 3.500 metros. O regime hidrodinâmico da região é controlado pela Corrente do Brasil, que se estende paralelo à costa até 200 metros de profundidade (Soares-Gomes *et al.* 1999).

### 3.2 Procedimento de Campo

As amostras foram coletadas durante o projeto “Ocean Prof” na Bacia de Campos, Rio de Janeiro, Brazil, em Novembro e Dezembro de 2002 e Junho e Julho de 2003, a bordo do Navio de Pesquisas “Astro Garoupa”. As foram divididas em duas regiões: Norte (19 estações) e Sul (24 estações), em cinco profundidades (750, 1050, 1350, 1650 e 1950 m). Para a coleta do sedimento, um corer USNEL SPADE tipo box orer (Ocean Instruments), com superfície de 0.25 m<sup>2</sup> dividido em 25 células, foi utilizado (Hessler & Jumars 1974). Um corer de 2 cm de diâmetro interno foi inserido em cada célula até a profundidade de 10 cm para coleta do sedimento das subamostras. Três subamostras de cada extração foram coletadas, divididas em duas camadas verticais de 0-2 cm e 2-5 cm, estocadas em reservatórios plásticos, e fixadas com 4 % de folmol e água do mar.

### 3.3 Procedimentos de Laboratório

A triagem dos nematódeos foi realizada seguindo a metodologia de Elmegren (1976). As amostras foram colocadas em Becker de 1000 mL, lavadas e elutriadas sucessivamente (mínimo de 10 vezes). O sobre nadante resultante deste procedimento foi vertido em peneiras geológicas de intervalos de malhas de 0,044 mm e 0,5 mm, para a retenção da meiofauna, e fixadas em solução forma 4%. O material retido na peneira foi colocado em placa de Dolffus sob estereomicroscópio para a triagem dos espécimens da nematofauna.

Para identificação foram confeccionadas lâminas permanentes de vidro de acordo com o método descrito por De Grisse (1969). Os indivíduos selecionados foram inseridos em cadinho contendo solução 1 (99% de formol 4% e 1% de glicerina). O cadinho foi posto em repouso em dessecador contendo etanol por um período de 24 horas (para que todo o formol presente nos animais evaporasse, sendo substituído pelo etanol presente no dessecador). Posteriormente, foi introduzida a solução 2 (95% de etanol e 5% de glicerina), três vezes a cada duas horas, à 35°C. No final desse processo colocou-se a solução 3 (50% de etanol e 50% de glicerina), na qual os espécimes ficaram depositados até a montagem das lâminas.

As lâminas foram previamente lavadas com álcool a 70%, para eliminação da gordura presente no vidro e preparadas com um círculo de parafina, contendo uma gota de glicerina no centro. Os animais foram dispostos na glicerina e recobertos por uma lamínula. Por aquecimento, a parafina foi derretida e a lamínula aderida à lâmina através do resfriamento da parafina. As lâminas foram levadas a microscópio óptico OLYMPUS CX31 para a identificação. Destes, oito indivíduos foram selecionados (1 holótipo, 1 alótipo, 3 parátipos machos, 1 parátipos fêmeas e 2 parátipos juvenis).

### 3.4 Identificação dos nematódeos

Os oito indivíduos de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. foram desenhados sob microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmara-clara. Após a elaboração dos desenhos, foram obtidas as medidas corpóreas usando um curvímeter analógico. O registro do gênero novo e da espécie nova foi feito através do desenho manual e fotografia em câmara digital OLYMPUS-C5050 acoplada ao microscópio.

Para a identificação ao nível específico, foram confeccionadas tabelas com as medições corporais dos espécimes, utilizando-se as seguintes abreviações:

**L:** comprimento total do corpo

**head:** diâmetro cefálico

**amph pos:** distância do anfidio a extremidade anterior do corpo

**amph:** diâmetro do anfídeo

**%cbd:** porcentagem do anfidio em relação ao diâmetro correspondente

**mbd:** diâmetro máximo do corpo

**abd:** diâmetro anal

**ph:** comprimento total da faringe

**nr:** localização do anel nervoso em relação a região anterior

**%nr:** localização do anel nervoso em % ao tamanho da faringe

**bulb:** diâmetro do bulbo faríngeo

**cbd:** diâmetro correspondente do corpo

**%cbd:** diâmetro do bulbo faríngeo em % do diâmetro correspondente do corpo

**spic:** comprimento da espícula ao longo do arco

**gub:** comprimento do gubernáculo

**t:** comprimento total da cauda

**v:** posição da vulva em relação à extremidade anterior do corpo

**V%:** posição da vulva em relação à extremidade anterior do corpo, expressa como porcentagem do comprimento total.

**Amph turn:** espessura da volta do anfídeo

**a:** comprimento total do corpo/diâmetro máximo (L/mbd).

**b:** comprimento total do corpo /comprimento total da faringe (L/ph).

**c:** comprimento total do corpo/ comprimento total da cauda (L/t).

**c'** comprimento total da cauda/ diâmetro anal (t/abd)

**annul hd:** distância entre anelações na região cabeça

**annul hb:** distância entre anelações no meio do corpo

**annul t:** distância entre anelações na região da cauda

As regiões do corpo foram nomeadas de acordo com Coomans (1979). Todas as medidas foram feitas em micrometros ( $\mu$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Material estudado

Espécimes: 4 machos; 2 fêmeas; 2 juvenis.

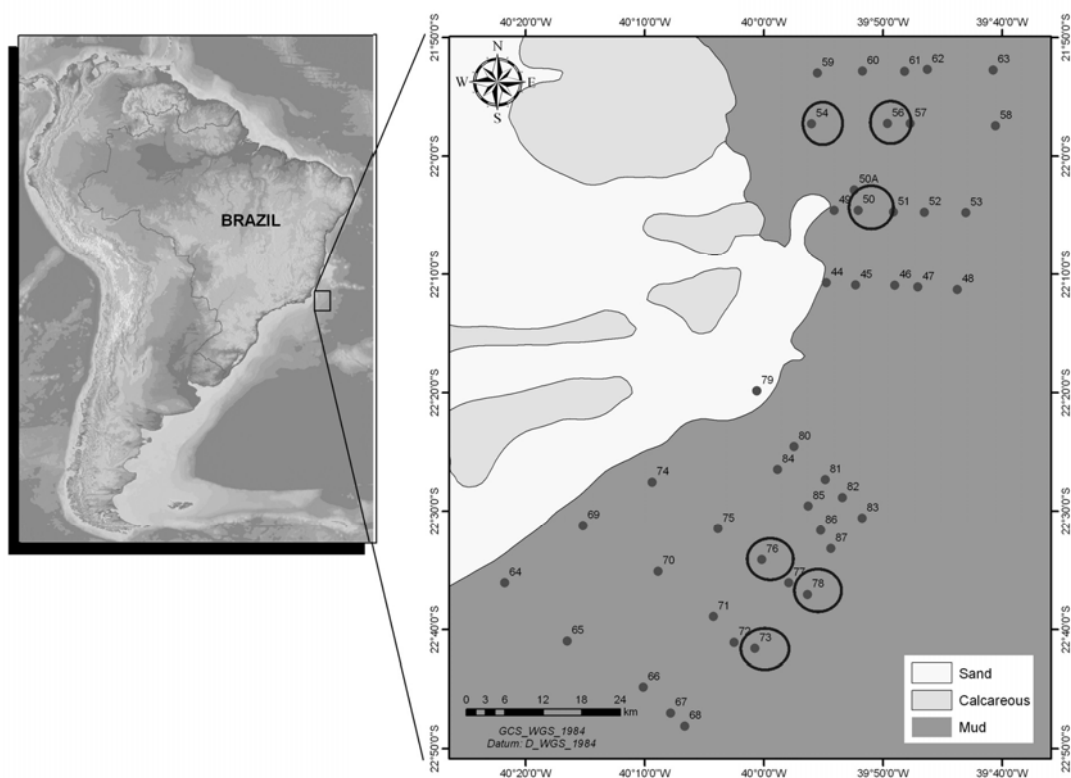
Material tipo: O holótipo (MNRJ 326) e o alótipo (MNRJ 327) foram depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro. Três machos parátipos (NM LMZOO UFPE 116 a 118), 1 fêmea parátipo (119) e 2 juvenis (120 a 121) foram depositados no Laboratório de Meiofauna do Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco.

Local tipo: Mar profundo da Bacia de Campos (Rio de Janeiro, Brasil). O holótipo foi encontrado a 1350 m de profundidade (Figura 1). Os espécimes foram achados no perfil de 2–5 cm no sedimento muito fino.

Outras localidades: o alótipo foi encontrado a 1950 m de profundidade, enquanto que os parátipos macho e fêmea foram encontrados a 750 e 1050 m de profundidade em sedimento muito fino, respectivamente. Todos esses espécimes foram encontrados no perfil 0–2 cm.

#### 4.2 Etimologia

O nome do gênero se refere à presença de caracteres de ambas as subfamílias Spiriniinae e Desmodorinae. O nome específico é em homenagem a Professora Dra. Magda Vincx da Universidade de Ghent, Bélgica.



**Figura 1.** Bacia de Campos, Rio de Janeiro, onde os círculos representam as estações onde os espécimes de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. foram encontrados (Fonseca-Genevois, *et al.* 2009).

### **4.3 Classificação Taxonômica (segundo Decraemer & Smol 2006)**

Ordem Desmodorida De Coninck, 1965

Subordem Desmodorina De Coninck, 1965

Superfamília Desmodoroidea Filipjev, 1922

Família Desmodoridae Filipjev, 1922

Subfamília Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965

### **4.4 Diagnose da subfamília Spiriniinae (segundo Decraemer & Smol 2006)**

Desmodoridae. Cutícula corpórea finamente estriada. Cabeça sem demarcação de cápsula cefálica. Fovea anfideal como espiral simples, geralmente localizada na região bem anterior do corpo. Cavidade bucal pequena, desde minuta a tamanho médio, apresentando dente dorsal; dois dentes ventrosublaterais pequenos, podem estar presentes ou ausentes.

### **4.5 Lista de gêneros válidos em Spiriniinae (Lorenzen 1994; Verschelde, Muthumbi & Vincx 1995; Vincx & Gourbault 1989)**

*Alaimonema* Cobb, 1920

*Chromaspirina* Filipjev, 1918

*Metachromadora* Filipjev, 1918

*Onyx* Cobb, 1891

*Papillonema* Verschelde, Muthumbi & Vincx, 1995

*Parallelocoilas* Boucher, 1975

*Perspiria* Wieser & Hopper, 1967

*Polysigma* Cobb, 1920

*Pseudometachromadora* Timm, 1952

*Sigmophoranema* Hope & Murphy, 1972

*Spirinia* Gerlach, 1963 (gênero tipo)

### **4.6 Diagnose de *Spirodesma* nov. gen.**

Corpo afinando nas extremidades. Cutícula corpórea com fortes anelações transversais. Anfídeos como um único espiral, com fovea anfideal circular. Cavidade bucal com três dentes de tamanho iguais, um dorsal e dois ventrosublaterais. Faringe com bulbo terminal redondo e bem desenvolvido. Um testículo anterior disposto ao lado esquerdo do

intestino, em machos; dois ovários opostos e refletidos, em fêmeas. Espículas curvadas ventralmente, *capitulum* não separado e *velum* bem desenvolvido. Três suplementos tubulares precloacais. Cauda cônica-cilíndrica. Três glândulas caudais terminando em um espinereto.

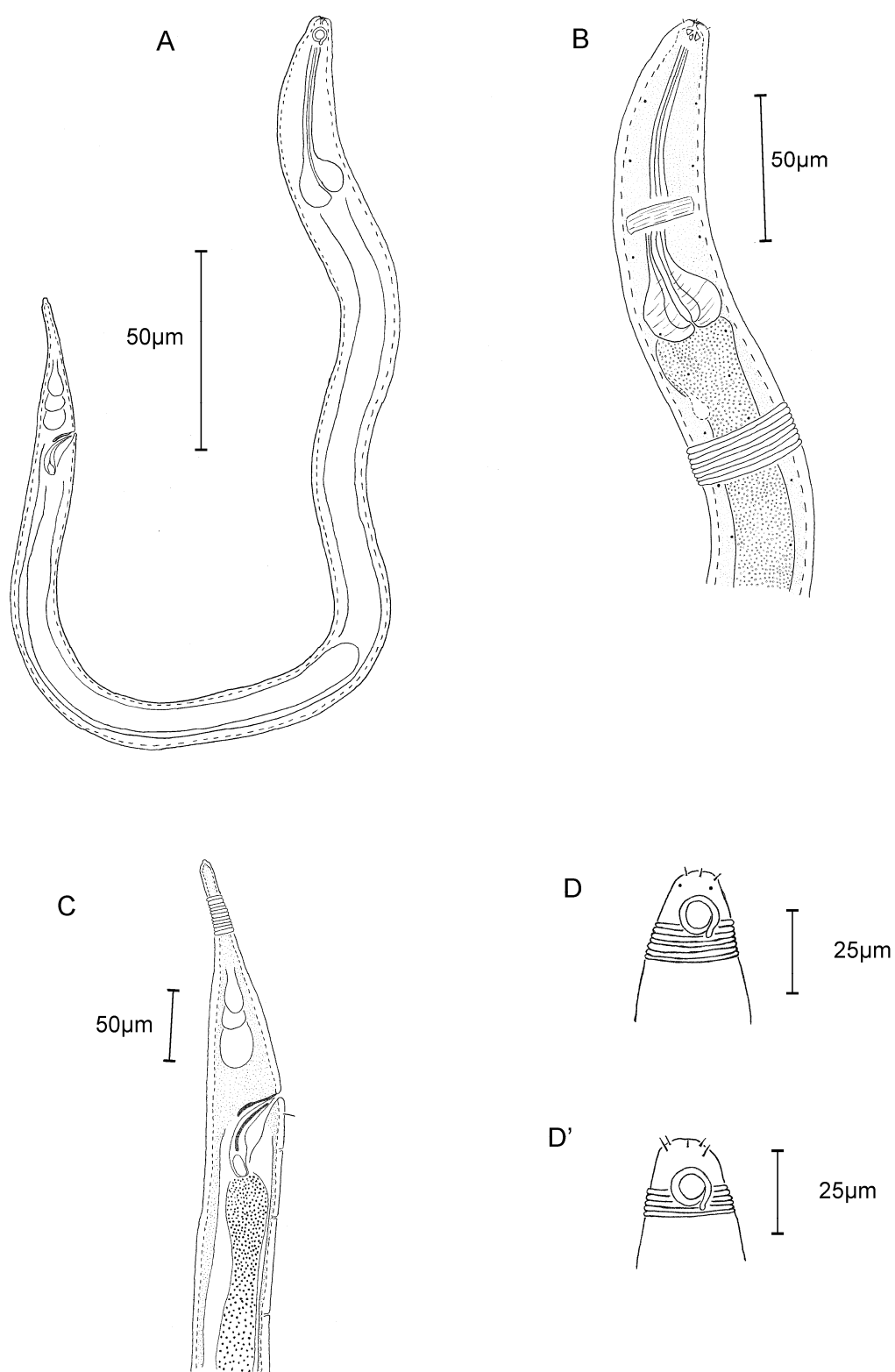
Espécie tipo: *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp.

#### **4.7 Descrição de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp.**

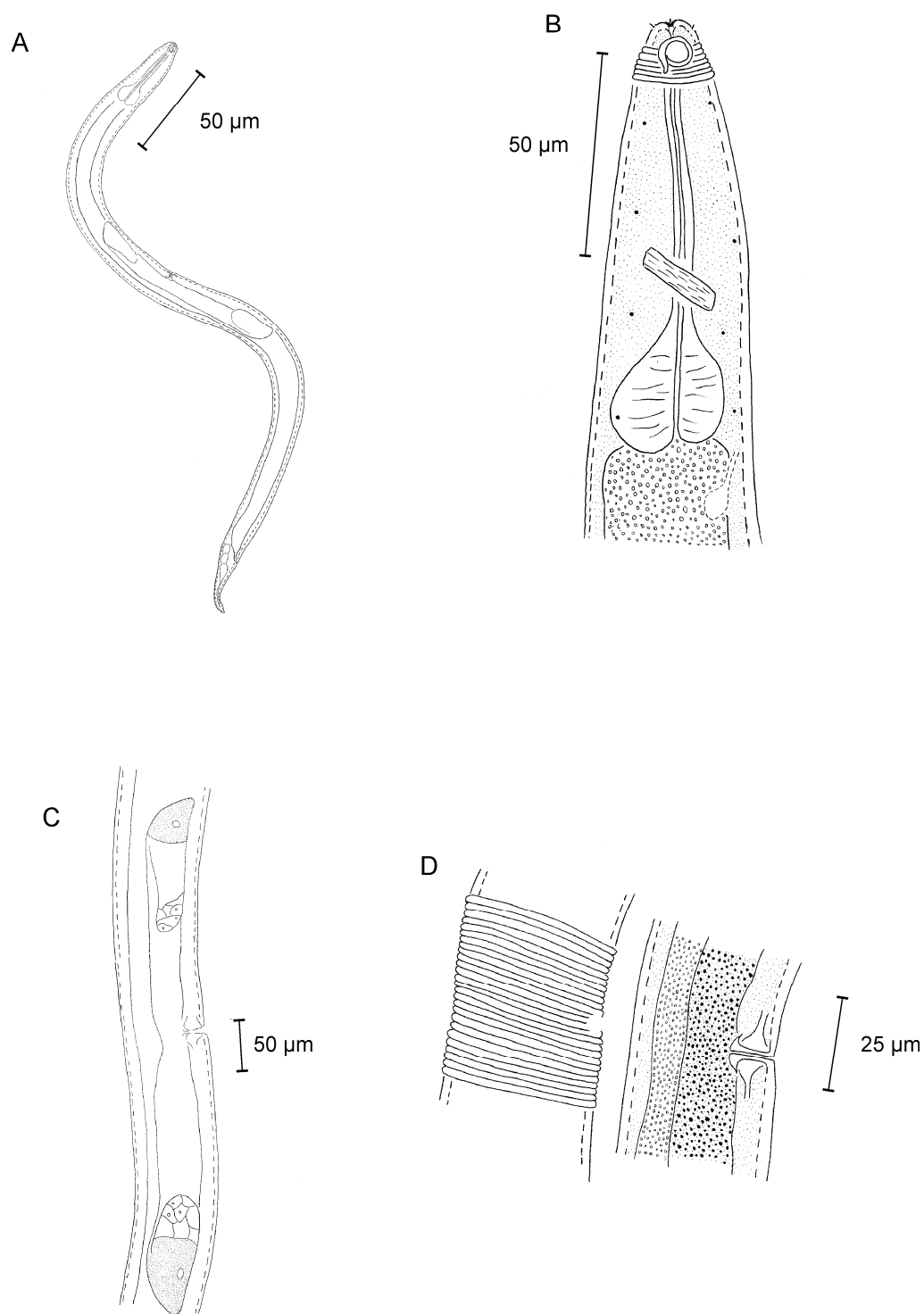
Holótipo (Figuras 2 e 4): Corpo cilíndrico, afinando em direção a ambas extremidades. Cutícula com anelações transversais, menos óbvias na região cefálica (1 µm de espessura) do que na região da cauda (2 µm de espessura). Cabeça não demarcada como cápsula cefálica. Papilas anteriores arranjadas em 6+6+4. Setas papiliformes. Anfídeos como um único espiral com fovea anfídeal circular, voltado ventralmente, envolto parcialmente pelas anelações, e 5 µm da extremidade anterior. Setas subcefálicas ausentes. Papilas somáticas arranjadas simetricamente e aos pares ao longo do corpo lateralmente. Cavidade bucal com 3 dentes de tamanhos iguais, 1 dorsal e 2 ventrosublateral. Faringe muscular, com bulbo esférico bem desenvolvido e terminal, ocupando 75% da espessura do corpo correspondente, parede do lúmen fortemente esclerotizada e musculatura com interrupções citoplasmáticas. Anel nervoso a 65% do total do comprimento da faringe até a extremidade anterior. Poro secretor-excretor não observado. Glândulas excretoras a 134 µm da extremidade anterior. Um testículo anterior disposto à esquerda do intestino. Espículas curvadas ventralmente, *capitulum* não separado, e *velum* bem desenvolvido. *Gubernaculum* sem apófise. Três suplementos precloacais tubulares presentes, o mais anterior 33 µm distante da segunda papila, e segunda papila 22 µm distante da papila mais posterior; esta papila localizada 18 µm anterior a abertura cloacal. Seta poscloacal presente. Cauda cônico-cilíndrica. Três glândulas caudais terminando em um espinereto.

Alótipo (Figuras 3 e 4): Fêmea semelhante ao macho, exceto algumas pequenas diferenças morfométricas (Tabela 1). Dimorfismo sexual não observado. Dois ovários opostos e refletidos presentes, e vulva a 42% de distancia da extremidade anterior.

Parátipo: Juvenil semelhante ao adulto, com diferenças apenas morfométricas (Tabela 1) e o tipo de papilas cefálicas que são em forma de setas (Figura 2).



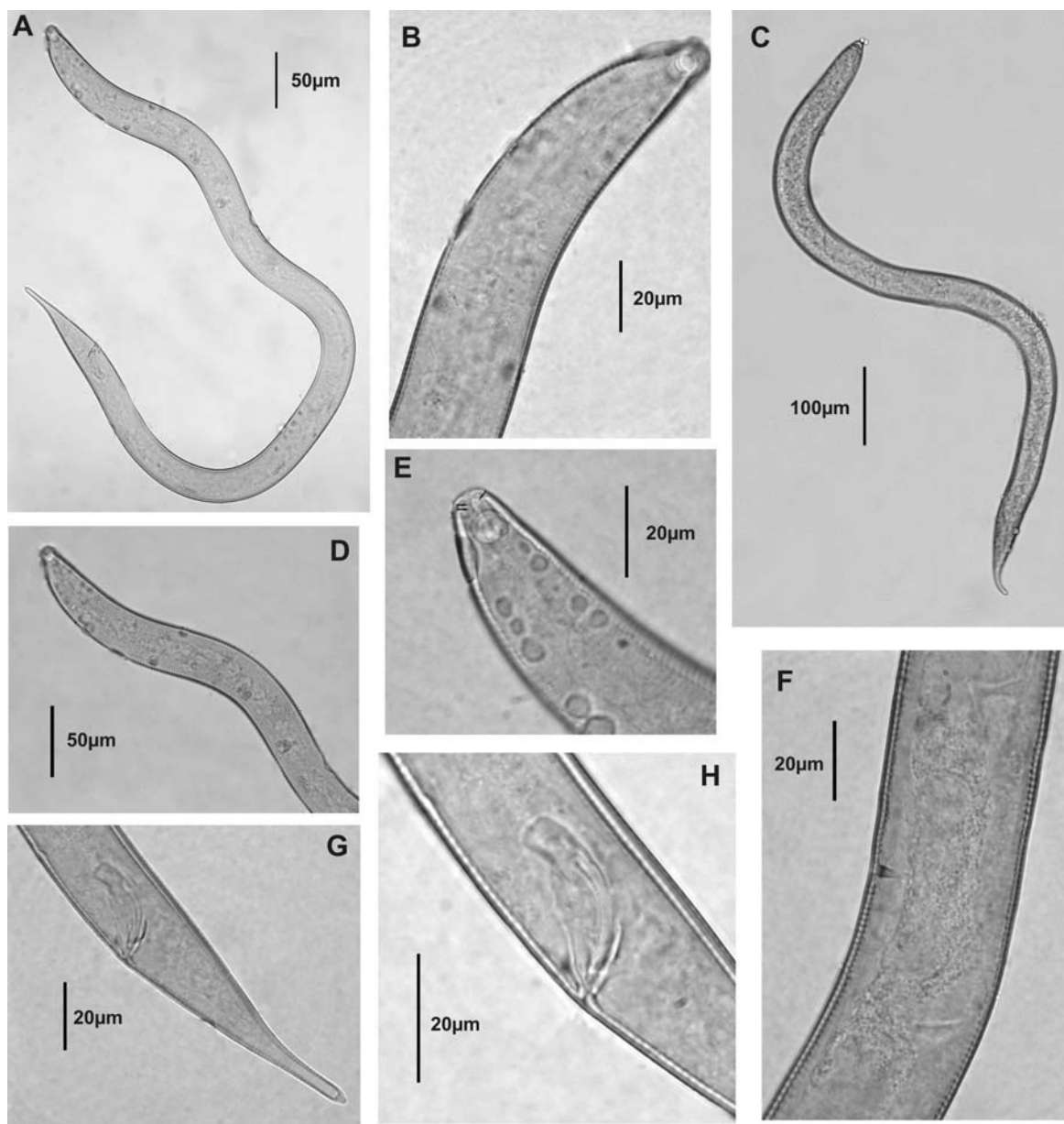
**Figura 2.** *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. Macho: A, corpo total; B, dentes, bulbo, anel nervoso, glândulas secretoria-excretória; C, cauda; glândulas caudais, espinereto, suplementos, espículas, gubernáculo, velum e seta precloacal; D, arranjos das papilas no macho, anulações da cutícula e anfídeos; D', arranjos das papilas no juvenil. Escalas: A, B, C = 50  $\mu$ m e D, D' = 25  $\mu$ m.



**Figura 3.** *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. SP. Fêmea: A, corpo total; B, bulbo, anel nervoso, glândula secretoria-excretória, anulações da cutícula e anfídeo; C, ovários refletidos; D, vulva e anulações do meio do corpo. Escalas: A, B, C = 50 µm e D = 25 µm.

**Tabela 1.** Características morfométricas (em  $\mu\text{m}$ ) de *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. n.v. = não visível, n.a. = não aplicável.

|            | Holótipo | P99  | P100 | P101 | Alótipo | P102 | P103 | P104 |
|------------|----------|------|------|------|---------|------|------|------|
| L          | 765      | 811  | 995  | 857  | 903     | 594  | 588  | 636  |
| Head       | 13       | 14   | 18   | 22   | 16      | 15   | 15   | 14   |
| amph pos   | 5        | 4    | 6    | n.v  | 4       | 4    | 4    | 3    |
| Amph       | 7        | 8    | n.v  | n.v  | 7       | 7    | 9    | 8    |
| %cbd       | 55%      | 57%  | n.v  | n.v  | 48%     | 44%  | 60%  | 61%  |
| mbd        | 28       | 42   | 52,2 | 45,9 | 39      | 33   | 36   | 30   |
| abd        | 23       | 29   | 30   | 31   | 27      | 18   | 26   | 21   |
| ph         | 101      | 104  | 102  | 102  | 99      | 94   | 97   | 95   |
| nr         | 66       | 60   | n.v  | n.v  | 53      | 44   | 49   | 48   |
| % nr       | 65%      | 58%  | n.v  | n.v  | 53%     | 47%  | 50%  | 50%  |
| bulb.      | 23       | 28   | 20   | 27   | 26      | 20   | 22   | 24   |
| cbd        | 31       | 41   | 39   | 35   | 41      | 30   | 30   | 32   |
| %cbd       | 75%      | 70%  | 50%  | 76%  | 63%     | 66%  | 74%  | 75%  |
| Spic       | 34       | 39   | 40   | 32   | n.a     | n.a  | n.a. | n.a. |
| gubern     | 16       | 19   | 17   | 18   | n.a     | n.a  | n.a. | n.a. |
| t          | 77       | 75   | 87   | 77   | 71      | 72   | 62   | 74   |
| v          | n.a.     | n.a. | n.a. | n.a. | 383     | 297  | n.a. | n.a. |
| V %        | n.a.     | n.a. | n.a. | n.a. | 42%     | 50%  | n.a. | n.a. |
| amph turn  | 2        | 2    | n.v. | n.v  | 2       | 1    | 1    | 1    |
| a          | 27       | 19   | 19   | 19   | 23      | 18   | 16   | 21   |
| b          | 8        | 8    | 10   | 8    | 9       | 6    | 6    | 7    |
| c          | 10       | 11   | 11   | 11   | 13      | 8    | 10   | 9    |
| c'         | 3        | 3    | 3    | 3    | 3       | 4    | 2    | 4    |
|            | 1        | 1    | 1    | 1    | 1       | 1    | 1    | 1    |
| annul.head |          |      |      |      |         |      |      |      |
| annul.tail | 1        | 2    | 2    | 1    | 1       | 1    | 1    | 2    |
| half body  | 2        | 1    | 2    | 2    | 2       | 1    | 1    | 2    |



**Figura 4.** *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. Macho: A, corpo total; B, bulbo; D, anulações do corpo; E, dentes; G, cauda, glândulas caudais e espinereto; H, espícula e gubernaculum. Fêmea: C, corpo total; F, vulva e ovários refletidos. Escalas: A, D: 50 µm; B, E, F, G e H: 20 µm; C: 100 µm.

#### 4.8 Diagnose diferencial

A tabela 2 lista as características de todos os gêneros pertencentes a subfamília. O gênero mais similar a *Spirodesma* nov. gen. é *Chromaspirina*, mas o novo gênero apresenta fortes características que o distingue deste. *Spirodesma* nov. gen. e as espécies de *Chromaspirina* possuem uma cabeça redonda, cutícula anelada, anfideo em espiral único e cauda cônica (Muthumbi *et al.* 1995). Entretanto, em *Chromaspirina*, a cavidade bucal é bem desenvolvida, com um dente dorsal grande e dois dentes menores subventrais, não apresenta

glândula ventral, e as espículas com *capitulum* (Muthumbi *et al.* 1995). Enquanto isso, *Spirodesma* nov. gen. possui uma cavidade bucal pequena com três dentes (mesmo tamanho), um dorsal e dois ventrosublaterais, glândula ventral e *capitulum* não separado.

Além disso, a maioria das espécies de *Chromaspirina* ou não formam um bulbo faríngeo ou apresentam um bulbo piriforme (*C. cylindrocollis* Cobb, 1920; *C. parma* Ott, 1972; *C. lunatica* Gerlach, 1963), diferindo de *Spirodesma* nov. gen., que possui uma faringe muscular com um bulbo esférico terminal bem desenvolvido. A cutícula, o tamanho dos três dentes e a forma única dos anfídeos distinguem *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. dentro de Spiriniinae. A presença dos três dentes de mesmo tamanho faz necessário um novo diagnóstico para a subfamília Spiriniinae.

#### **4.9 Emenda na diagnose da subfamília Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965**

Cutícula corpórea finamente ou às vezes fortemente estriada. Cabeça não demarcada como uma cápsula cefálica. Fóvea anfídeal como simples espiral, geralmente localizado bem anterior no corpo. Cavidade bucal pequena, de mínima a tamanho médio, com dente distinto ou um dente dorsal mínimo; 2 dentes pequenos ventrosublaterais podem estar presentes ou ausentes; ou 3 dentes do mesmo tamanho.

### **5. DISCUSSÃO**

A cutícula de *Spirodesma* nov. gen., com fortes anelações, muito parecida com a cutícula dos membros de Desmodorinae. Entretanto, ao contrário do novo gênero brasileiro, os gêneros pertencentes a subfamílias Desmodorinae apresentam uma cápsula cefálica e a fovea anfídeal no geral não esta envolvida pelas estriações e podem estar localizados numa placa cuticularizada (Decraemer & Smol 2006). Quatro gêneros de Desmodorinae também não terem cápsula cefálica (*Paradesmodora* Schuurmans Stekhoven, 1950, *Metadesmodora* Schuurmans Stekhoven, 1942, *Echinodesmodora* Blome, 1982 e *Stygodesmodora* Blome, 1982), entretanto apresentam fortes características que os distinguem de *Spirodesma* nov. gen. Em *Paradesmodora* os anfídeos e as setas cefálicas são maiores do que em *Spirodesma* nov. gen.; os anfídeos de *Metadesmodora* são compostos por duas bandas circulares concêntricas, situadas num prato em forma de disco, e a cavidade bucal não apresenta dentes, ao contrário do novo gênero que não apresenta anfídeos num prato e apresenta dentes na cavidade bucal. Em *Echinodesmodora*, os anfídeos são envoltos pelas estriações da cutícula e apesar de apresentar as mesmas posições dos dentes, estes diferem em tamanho. Como em *Echinodesmodora*, *Stygodesmodora* possui anfídeos envoltos pelas estriações transversais da

cutícula, mas a cavidade bucal apenas apresenta um dente dorsal e um pequeno subventrolateral, o que difere do gênero descrito do presente estudo.

Apesar de o novo gênero *Spirodesma* apresentar cutícula similar aos representantes de Desmodorinae, a presença de muitas diferentes características, permitem a classificação deste como Spiriniinae, tais como: a cabeça não é demarcada com uma cápsula cefálica; a fovea anfideal é um espiral simples localizada no anterior da cabeça; e a pequena cavidade bucal.

**Tabela 2.** Caracteres diagnósticos dos gêneros de Spiriniinae. Os gêneros foram agrupados por similaridade da cutícula.

| Gêneros                     | Cutícula           | Dentes                                                    | Anfídeos                         | Bulbo                  |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| <i>Chromaspirina</i>        | anelada            | 1 dorsal e 2 pequenos ventrais                            | uniespiral                       | Sem bulbo ou piriforme |
| <i>Pseudometachromadora</i> | anelada            | 1 grande dorsal e 1 pequeno ventral                       | oval transversal e criptoespiral | Fracamente dilatado    |
| <i>Spirodesma nov. gen.</i> | anelada            | 1 dorsal e 2 ventrosublaterais (mesmo tamanho)            | uniespiral with circular fovea   | Redondo                |
| <i>Onyx</i>                 | Finamente estriada | 1 dorsal                                                  | uniespiral                       | Alongado               |
| <i>Papillonema</i>          | Finamente estriada | 1 grande dorsal tooth, 2 pequenos subventrais             | multiespiral                     | Alongado               |
| <i>Perspiria</i>            | Finamente estriada | 3 pequenos                                                | Uniespiral, circular outline     | Redondo a piriforme    |
| <i>Spirinia</i>             | Finamente estriada | Sem dentes ou 1 pequeno ou 1 dorsal e 2 ventrosublaterais | uniespiral, circular outline     | Redondo                |
| <i>Metachromadora</i>       | Lisa               | 1 dorsal                                                  | uniespiral                       | Alongado               |
| <i>Polysigma</i>            | Lisa               | not informed                                              | uniespiral                       | Ovóide                 |
| <i>Alaimonema</i>           | Estriada           | 3 bem pequenas <i>onchia</i>                              | multiespiral                     | Piriforme              |
| <i>Sigmophoranema</i>       | Estriada           | 1 dorsal <i>onchium</i>                                   | uniespiral                       | Não informado          |
| <i>Paralellocoidas</i>      | Estriada           | 1 dorsal                                                  | uniespiral                       | Ausente                |

## 6. CONCLUSÃO

*Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. representa um novo gênero e uma nova espécie de nematódeos pertencente à Desmodoridae e classificado como Spiriniinae.

A diagnose da subfamília em questão deve ser reescrita, uma vez que o novo gênero apresenta novo estado de caractere relevantes para subfamília.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Botelho, A. P.; Silva, M. C.; Esteves, A. M. & Fonsêca-Genevois, V. 2007. Four new species of *Sabatieria* Rouville, 1903 (Nematoda, Comesomatidae) from the Continental Slope of Atlantic Southeast. *Zootaxa*, 1402, 39–57;

Boucher, G. 1975. Nématodes des sables fins infralittoraux de la Pierre Noire (Manche occidentale). I. Desmodorida. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris*, 3e série, no 285, *Zoologie*, 195, 101–128;

Blome, D. 1982. Systematik der Nematoda eines Sandstrandes der Nordseeinsel Sylt *Mikrofauna des Meeresbodens*, 86, 1–194;

Cobb, N. A. 1891. *Anticoma*: a genus of free-living marine nematodes. *Proceedings of the Linnean Society*, New South Wales, 2nd series, 5(6), 765–774;

Cobb, N.A. 1920. One hundred new nemas (type species of new genera). *Contribution to a science of nematology*, Baltimore, 9, 217–343;

Coomans, A. 1979. A proposal for a more precise terminology of the body regions of a nematode. *Annales de la Société Royale de Zoologie de Belgique*, 108, 115–117;

Decraemer, W. & Smol, N. 2006. Orders Chromadorida, Desmodorida and Desmoscolecida *In Eyuaalem-Abebe, W. Traunspurger & I. Andrassy. Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*, 497–573;

De Coninck, L. A. 1965. Classe des Nematodes – Systematique des Nematodes et sous-classe des Adenophores. *Traité de Zoologie* (ed. Grasse), 4(2), 586–681;

De Man, J. G. 1880. Die einheimischen, frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht und deskriptiv-systematischer Teil. *Tijdschrift Nederlandsche Dierkundig Vereëiging*, 5, 1–104;

Filipjev, I. 1918/1921. Free-living marine nematodes of the Sevastopol area (In Russian). *Trudy Osoboi Zoologicheskoi Laboratorii i Sevastopol'skoi Biologicheskoi Stantsii Petrograd* (2), 4:1–350 (1918), 351–614 (1921), English translation by M. Raveh, Israel Programme for Scientific Translations, Jerusalem, 1968 (part 1, p. 1–255), 1970 (part 2, p. 1–203);

Filipjev, I. 1922. Encore sur les Nematodes libres de la Mer Noire. *Trudy Stavropol'skago Sel'skokhozyaistvennago Instituta Stavropol*, 1, 83–184;

Gerlach, S. A. 1957. Die Nematodenfauna des Sandstrandes an der Küste von Mittelbrasilien (Brasilianische Meeres-Nematoden IV). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 33, 454–455;

Gerlach, S. A. 1963. Freilebende Meeresnematoden von den Malediven II. *Kieler Meeresforschung*, 19, 67–103;

Gerlach, S. A. & Murphy, D. G. 1965. Die Familiengruppen-Namen der freilebenden Nematoden – Adenophorea (Aphasmidia). *Zoologischer Anzeiger Jena*, 175, 211–216;

Gerlach, S.A & Riemann, F. 1973. The Bremerhaven Checklist of Aquatic Nematodes. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven*, Supplement 4, 1, 1–734;

Hope, W. D. & Murphy, D. G. 1972. A taxonomic hierarchy and checklist of the genera and higher taxa of marine nematodes. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 137, 1–101;

Jensen, P. 1978. Revision of Microlaimidae, Erection of Molgolaimidae fam. n., and Remarks on the Systematics Position of *Paramicrolaimus* (Nematoda, Desmodorida). *Zoologica Scripta*, 7, 159–173;

Lorenzen, S. 1981. Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven*, 7, 1–472;

Lorenzen, S. 1994. *The Phylogenetic systematics of free living nematodes*. The Ray Society, 383pp;

Muthumbi, A.; Verschelde, D. & Vincx, M. 1995. New Desmodoridae (Nematoda: Desmodoroidea): Three new species from Ceriops mangrove sediments (Kenya) and one related new species from the North Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 36(3), 181–195;

Ott, J. A. 1972. Twelve new species of nematodes from an intertidal sandflat in North Carolina. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 57, 463–496;

Schuermans Stekhoven, J. H. 1942. The free-living marine nematodes of the Mediterranean III. The Balearic Islands. *Zoologische Mededelingen (Leiden)*, 23 (3–4), 229–262;

Schuermans Stekhoven, J. H. 1950. The free-living marine nemas of the Mediterranean. I. The bay of Villefranche. *Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique Memoires*, 37, 1–220;

Soetaert, K. & Heip, C. 1995. Nematode assemblages of deep-sea and shelf break sites in the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 125, 171–183.

Steiner, G. 1927. Epsilonematidae, a new nemic family. *Journal of Parasitology*, 14, 65–66;

Timm, R. W. 1952. A survey of the marine nematodes of Chesapeake Bay, Maryland. *Chesapeake Biology Laboratory Publication*, 95, 1–70;

Verschelde, D., Muthumbi, A. & Vincx, M. 1995. *Papillonema danieli* gen. et sp. n. and *Papillonema clavatum* (Gerlach, 1957) comb. n. (Nematoda, Desmodoridae) from the Ceriops mangrove sediments of Gazi Bay, Kenya. *Hydrobiologia*, 257, 129–142;

Vincx, M. & Goubault, N. 1989. Desmodoridae from the Bay of Morlaix (Brittany) and the Southern Bight of the North Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 30, 103–114;

Wieser, W. & Hopper, B. E. 1967. Marine nematodes of the East coast of North America. I. Florida. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 135, 239–344;

## **ANEXO**



## ***Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. (Nematoda: Desmodoridae) from the Brazilian deep sea (Campos Basin, Rio de Janeiro, Brazil)\***

MARIANA DA FONSECA CAVALCANTI<sup>#</sup>, MARIA CRISTINA DA SILVA & VERÔNICA DA FONSÊCA-GENEVOIS

Universidade Federal de Pernambuco – Av. Professor Moraes Rego, s/n, Dept. Zoologia, Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, Brasil. 50670-901.

<sup>#</sup>Corresponding author: mari\_cavalcanti@yahoo.com.br

\* In: Brökeland, W. & George, K.H. (eds) (2009) Deep-sea taxonomy — a contribution to our knowledge of biodiversity. *Zootaxa*, 2096, 1–488.

### **Abstract**

A new genus and species of Desmodoridae was found in deep-sea sediments of the Campos Basin. Although the cuticle annulation of the new species is similar to members of Desmodorinae, many morphological features are strong enough to classify it within the Spiriniinae. *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. is characterized mainly by the presence of a unique form of unispired amphids, with circular amphideal fovea, and a buccal cavity with three equal teeth, one dorsal and two ventrosublateral.

**Key words:** Spiriniinae, new genus, new species, marine taxonomy

### **Introduction**

Free-living marine nematodes belonging to the family Desmodoridae Filipjev, 1922 have been reported from most deep-sea sediment assemblages, but always in small numbers, reaching at most 1% of total individuals (Soetaert & Heip 1995). In the Campos Basin, 185 genera were identified, and 10 of them (18.5%) belonged to the Desmodoridae. Of these, 4 (40%) were identified as members of the subfamily Spiriniinae: *Chromaspirinia* Filipjev, 1918, *Metachromadora* Filipjev, 1918, *Onyx* Cobb, 1891 and *Spirinia* Gerlach, 1963.

Desmodoridae are essentially marine nematodes, with few exceptions (Decraemer & Smol 2006). According to Lorenzen (1994) there is no autapomorphy for this family, and it is largely distinguished by not possessing the typical features of the families Epsilonematidae Steiner, 1927 and Draconematidae Filipjev, 1918, such as adhesion tubes or ambulatory setae. Within the Desmodoridae there are differences in thickness among the various regions of the body; the ovaries and the vulva lie well posterior to the middle of the body; and the cuticle has very coarse annules, at least in the anterior body region. Within this family there are six subfamilies, separated from each other by unique characters. Members of Prodesmodorinae Lorenzen, 1981 have almost exclusively parthenogenetic reproduction and the species are purely limno-terrestrial; members of Stilbonematinae Cobb, 1920 are obligatorily associated with bacterial epigrowth; Molgolaiminae Jensen, 1978 differ mainly in having round amphids; Desmodorinae Filipjev, 1922 have a globular head capsule; members of Pseusochinae Gerlach & Riemann, 1973 have the buccal cavity bilaterally symmetrical, large, tubular, subdivided, and with ventrosublateral teeth at the level of the junction; and members of Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965 have no head capsule and the buccal cavity is rather small, from minute to medium-sized (Lorenzen 1994).

The present report describes a new genus within one of these six subfamilies, Spiriniinae.

## Material and Methods

Details about the material and methods (field and laboratory works) and about the study area are shown in Botelho *et al.* (2007).

Abbreviations used in the text:

abd: anal body diameter

amph: amphideal fovea diameter

amph%: percentage of amphideal fovea diameter in relation to head diameter

amphd pos: distance of amphideal fovea from anterior end

annul hd: distance between “annulations” in head region

annul hb: distance between “annulations” in the mid-body region

annul t: distance between “annulations” in tail region

bulb: pharyngeal bulb diameter

bulb %: pharyngeal bulb diameter as % of corresponding body diameter

cbd: corresponding body diameter

cs: cephalic setae length

gub: gubernaculum length

hd: head diameter

L: body length

mbd: body maximum diameter

ph: pharynx length

nr: position of nerve ring from anterior body end

som s: somatic setae length

subc. s.: sub-cephalic setae length

spic: spiculum length measured along the arc

t: tail length

v: vulva distance from anterior end

V: position of the vulva as percentage of body length from anterior end

a, b, c, c': ratio's of De Man (1880)

Body regions were named according to Coomans (1979)

All measurements are in micrometers.

## Study material

*Specimens:* 4 males; 2 females; 2 juveniles.

*Type material:* The holotype (MNRJ 326) and the allotype (MNRJ 327) are deposited in the National Museum of Rio de Janeiro. Three male paratypes (NM LMZOO UFPE 116 a 118), 1 female paratype (119) and 2 juveniles (120 a 121) are deposited in the Meiofauna Laboratory of the Zoology Department, Universidade Federal de Pernambuco.

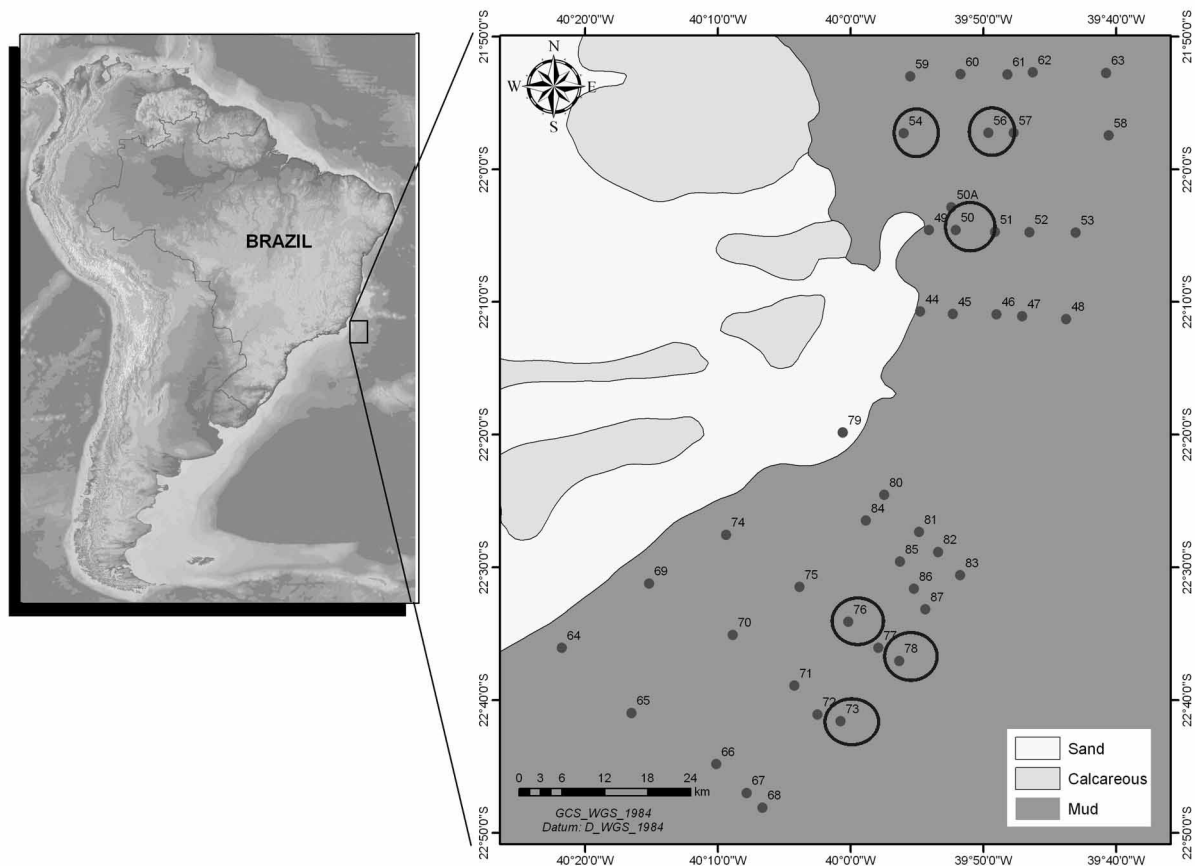
*Type locality:* Campos Basin (Rio de Janeiro, Brazil) deep-sea. The holotype was found in 1350 m depth (Figure 1). The specimen was found at 2–5 cm depth in the silt-clay sediment profile.

*Other localities:* the allotype was found in 1950 m depth while the male and female paratypes were found in 750 and 1050 m depth in silt-clay sediment, respectively. All these specimens were found at the profile 0–2 cm.

*Measurements:* see table 1

*Etymology.* The genus name refers to the presence of characters from both subfamilies Spiriniinae and

Desmodorinae. The specific epithet is in honor of Professor Dr. Magda Vincx from Ghent University, Belgium.



**FIGURE 1.** Study area with the station locations circled where *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. specimens were found.

#### Taxonomy (after Decraemer & Smol 2006)

**Desmodora** De Coninck, 1965

**Desmodorina** De Coninck, 1965

**Desmodoroidea** Filipjev, 1922

**Desmodoridae** Filipjev, 1922

**Spiriniinae** Gerlach & Murphy, 1965

*Diagnosis of the subfamily Spiriniinae (after Decraemer & Smol 2006).* Desmodoridae. Body cuticle finely striated. Head not demarcated as a cephalic capsule. Amphideal fovea a simple spiral, usually located far anterior on the body. Buccal cavity rather small, from minute to medium-sized, with a distinct or a minute dorsal tooth; two smaller ventrosublateral teeth may be present or absent.

List of valid genera within Spiriniinae (Lorenzen 1994; Verschelde, Muthumbi & Vincx 1995; Vincx & Goubault 1989):

*Alaimonema* Cobb, 1920

*Chromaspirina* Filipjev, 1918

*Metachromadora* Filipjev, 1918

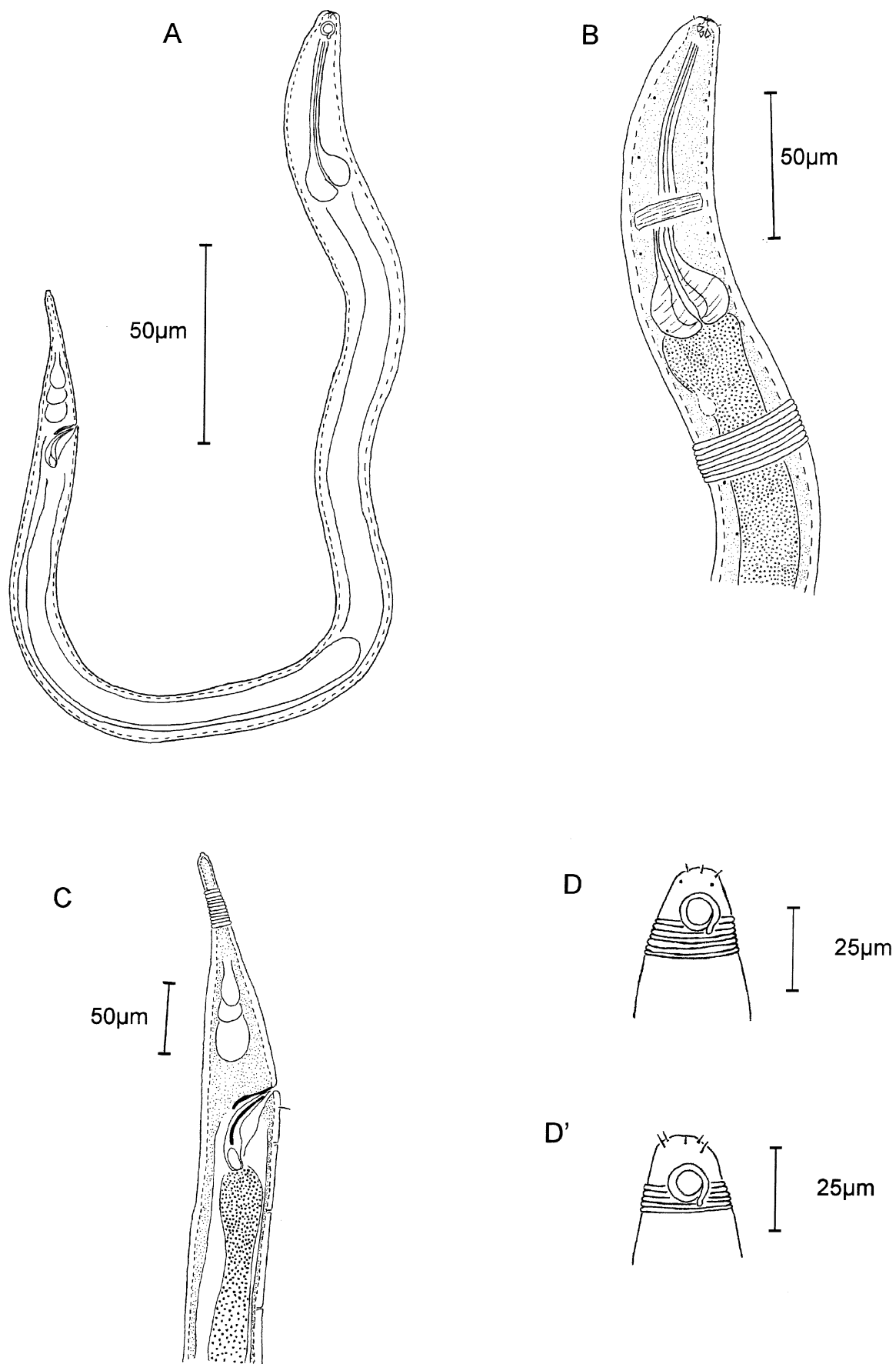
*Onyx* Cobb, 1891  
*Papillonema* Verschelde, Muthumbi & Vincx, 1995  
*Parallelocoilas* Boucher, 1975  
*Perspiria* Wieser & Hopper, 1967  
*Polysigma* Cobb, 1920  
*Pseudometachromadora* Timm, 1952  
*Sigmophoranema* Hope & Murphy, 1972  
*Spirinia* Gerlach, 1963 (type genus)

**TABLE 1.** Morphometrical characteristics (in  $\mu\text{m}$ ) of *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. n.v. = not visualized, n.a. = not applied.

|            | Hollotype | P 99 | P100 | P101 | Allotype | P102 | P103 | P104 |
|------------|-----------|------|------|------|----------|------|------|------|
| L          | 765       | 811  | 995  | 857  | 903      | 594  | 588  | 636  |
| hd         | 13        | 14   | 18   | 22   | 16       | 15   | 15   | 14   |
| amph pos   | 5         | 4    | 6    | n.v. | 4        | 4    | 4    | 3    |
| amph       | 7         | 8    | n.v. | n.v. | 7        | 7    | 9    | 8    |
| %cbd       | 55%       | 57%  | n.v. | n.v. | 48%      | 44%  | 60%  | 61%  |
| mbd        | 28        | 42   | 52   | 46   | 39       | 33   | 36   | 30   |
| abd        | 23        | 29   | 30   | 31   | 27       | 18   | 25.8 | 21   |
| ph         | 101       | 104  | 102  | 102  | 99       | 94   | 97   | 95   |
| nr         | 66        | 60   | n.v. | n.v. | 53       | 44   | 49   | 48   |
| % nr       | 65        | 58   | n.v. | n.v. | 53       | 47   | 50   | 50   |
| bulb       | 23        | 29   | 20   | 27   | 26       | 20   | 22   | 24   |
| cbd        | 31        | 41   | 39   | 35   | 41       | 30   | 30   | 32   |
| %cbd       | 75        | 70   | 50   | 76   | 63       | 66   | 74   | 75   |
| spic       | 34        | 39   | 40   | 32   | n.a.     | n.a. | n.a. | n.a. |
| gubern     | 16        | 19   | 17   | 18   | n.a.     | n.a. | n.a. | n.a. |
| t          | 77        | 75   | 87   | 77   | 71       | 72   | 62   | 74   |
| v          | n.a.      | n.a. | n.a. | n.a. | 383      | 297  | n.a. | n.a. |
| V %        | n.a.      | n.a. | n.a. | n.a. | 42       | 50   | n.a. | n.a. |
| amph turn  | 2         | 2    | n.v. | n.v. | 2        | 1    | 1    | 1    |
| a          | 27        | 19   | 19   | 19   | 23       | 18   | 16   | 21   |
| b          | 8         | 8    | 10   | 8    | 9        | 6    | 6    | 7    |
| c          | 10        | 11   | 11   | 11   | 13       | 8    | 10   | 9    |
| c'         | 3         | 3    | 3    | 3    | 3        | 4    | 2    | 4    |
| annul.head | 1         | 1    | 1    | 1    | 1        | 1    | 1    | 1    |
| annul.tail | 1         | 2    | 2    | 1    | 1        | 1    | 1    | 2    |
| annul hb   | 2         | 1    | 2    | 2    | 2        | 1    | 1    | 2    |

*Diagnosis of Spirodesma nov. gen.* Body tapering at extremities. Body cuticle with strong transverse annulations. Amphids unispired, with circular amphideal fovea. Buccal cavity with 3 equally sized teeth. Pharynx with well-developed spherical and terminal esophageal bulb. One anterior testis lying left of intestine in male; two opposed reflexed ovaries in female. Spicules ventrally curved, capitulum not offset and velum well developed. Three tubular precloacal supplements. Conico-cylindrical tail. Three caudal glands ending in a spinneret.

*Type species: Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp.



**FIGURE 2.** Male: A, entire body; B, teeth, bulb, nerv ring, secretory-excretory gland; C, tail, caudal glands, spinneret, supplements, spicules, gubernaculum, velum and precloacal setae; D, papillae arrangement in the male, cuticle annulation and amphid; D', papillae arrangement in juvenil. Scales: A, B, C = 50 µm and D, D' = 25 µm.

**Description.** Holotype (Figures 2 and 4): Cylindrical body, tapered towards both extremities. Cuticle with transverse annulations, less obvious in head (1 µm width) than in tail (2 µm width) region. Head not set off as distinct capsule. Anterior sensilla arrangement 6+6+4. Cephalic sensilla papilliform. Amphids unispired with circular amphideal fovea, turned ventrally, half surrounded by annulations, and 5 µm from anterior end. Sub-cephalic setae not present. Somatic papillae arranged symmetrically and in pairs laterally along the body. Buccal cavity with 3 equal teeth, 1 dorsal and 2 ventrosublateral. Pharynx muscular, with well-developed spherical and terminal esophageal bulb, occupying 75% of corresponding body width, its lumen wall strongly cuticularized and musculature with median protoplasmatic interruption. Nerve ring at 65% of total pharynx length from anterior end. Secretory-excretory pore not observed. Excretory gland 134 µm from anterior end. One anterior testis lying left of intestine. Spicules ventrally curved, capitulum not offset, and velum well developed. Gubernaculum without apophysis. Three tubular precloacal supplements present, anterior most papilla 33 µm distant from second papilla, and second papilla 22 µm distant from posterior most papilla; this papilla located 18 µm anterior to cloacal opening. Postcloacal setae present. Conico-cylindrical tail. Three caudal glands ending in a spinneret.

Allotype (Figures 3 and 4): Female quite similar to male, apart from minor morphometrical differences (Table 1) in the range of body lengths. Sexual dimorphism not observed. Two opposed reflexed ovaries present, and vulva at 42% distance from anterior end.

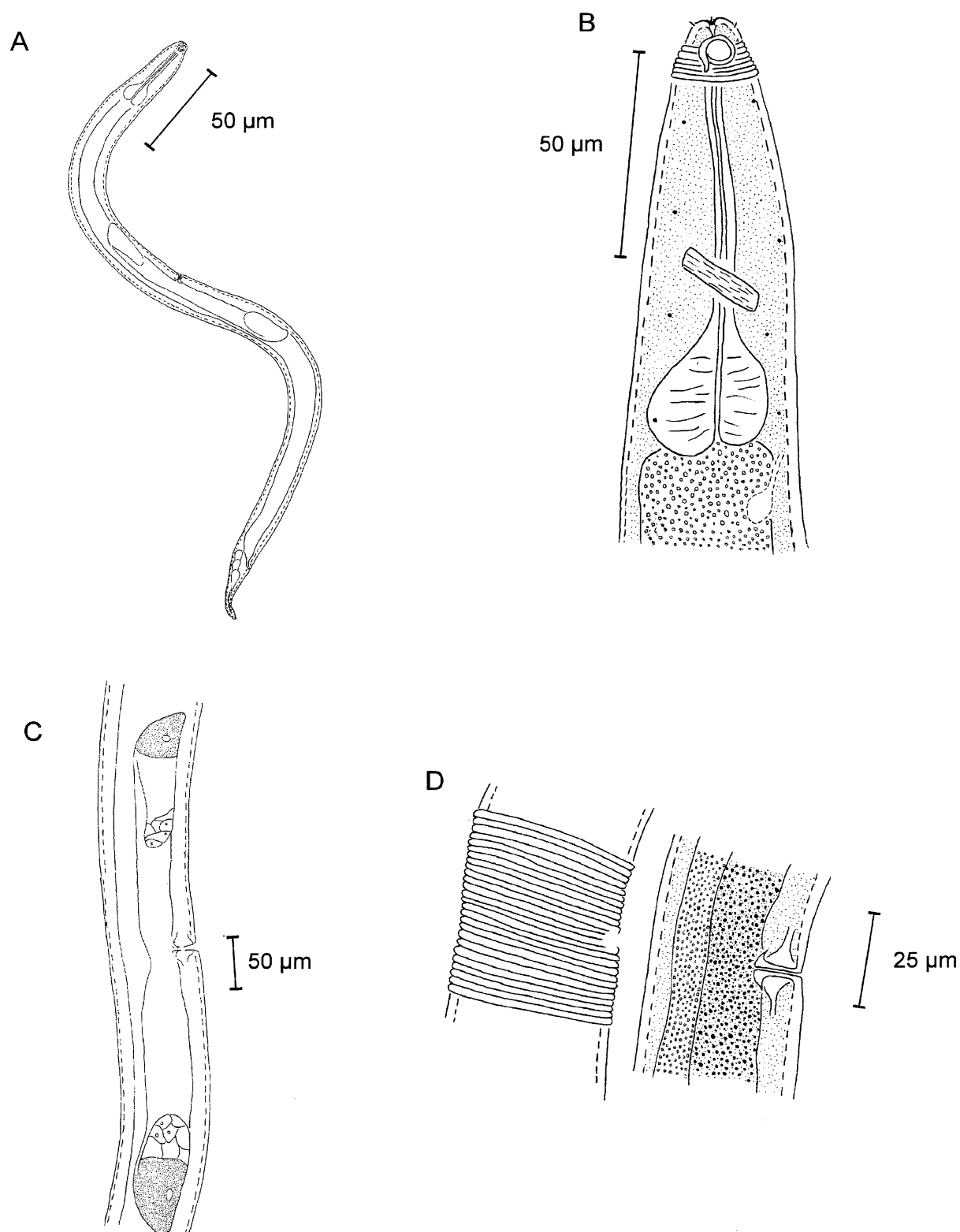
Paratype: Juvenile quite similar to adult, apart from minor morphological differences (Table 1), and the type of cephalic papillae, which are setiform (Figure 2).

**TABLE 2.** Different characters between *Spirodesma* nov. gen. and the other genera within the Spiriniinae.

| Genus                       | Cuticle         | Teeth                                                 | Amphid form                                    | Esophageal bulb                           |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>Chromaspirina</i>        | annulated       | dorsal and 2 small ventral teeth                      | spiral with circular outline                   | no bulb or pyriform bulb                  |
| <i>Pseudometachromadora</i> | annulated       | large dorsal tooth and smaller ventral tooth          | transversally oval in outline and cryptospiral | only weakly dilated posteriorly           |
| <i>Spirodesma</i> nov. gen. | annulated       | dorsal tooth and 2 ventrosublateral teeth (same size) | unispiral with circular fovea                  | well developed spherical and terminal     |
| <i>Onyx</i>                 | finely striated | dorsal tooth                                          | spiral                                         | enlarges to a longish bulb                |
| <i>Papillonema</i>          | finely striated | large dorsal tooth, 2 minute subventral teeth         | multispiral                                    | elongate muscular terminal                |
| <i>Perspiria</i>            | finely striated | three minute teeth                                    | spiral with circular outline                   | prominent round to pyriform terminal bulb |
| <i>Spirinia</i>             | finely striated | no teeth or minute one or 1 dorsal tooth and 2        | unispiral, circular out line                   | well developed spherical and terminal     |
| <i>Metachromadora</i>       | smooth striated | dorsal tooth                                          | large and spiral                               | large, long bulb                          |
| <i>Polysigma</i>            | smooth striated | not informed                                          | unispiral                                      | ovoid swelled                             |
| <i>Alaimonema</i>           | striated        | 3 very small onchia                                   | multispiral                                    | pyriform                                  |
| <i>Sigmophoranema</i>       | striated        | 1 dorsal onchium                                      | unispiral                                      | not informed                              |
| <i>Parallelocoidas</i>      | striated        | 1 dorsal tooth                                        | unispiral                                      | absent                                    |

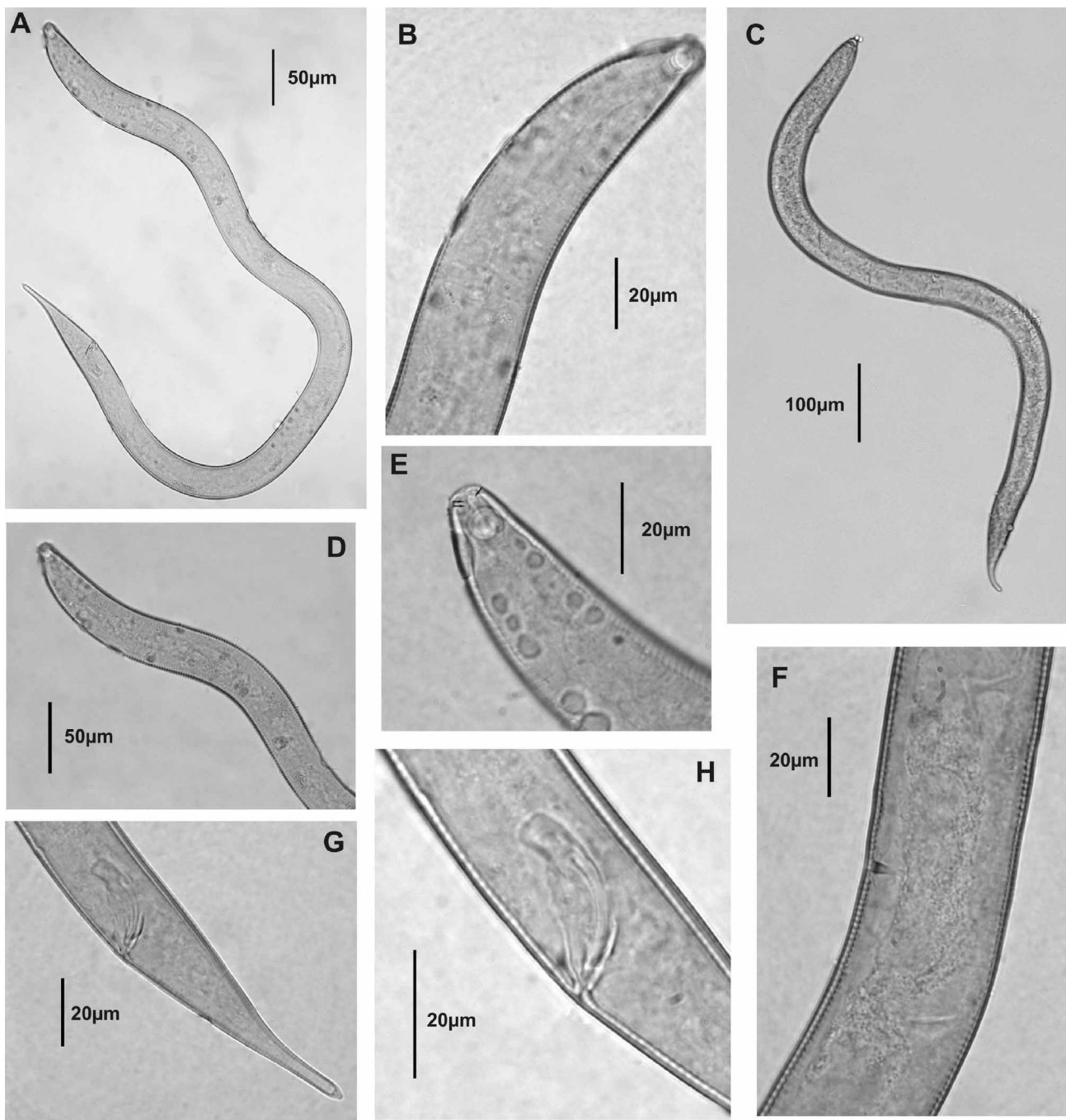
**Differential diagnosis:** Table 2 lists the features of all genera belonging to the subfamily. The most similar genus to *Spirodesma* nov. gen. is *Chromaspirina*, but the new genus has strong characters distinct from this. *Spirodesma* nov. gen. and species of *Chromaspirina* have a rounded head, annulated cuticle, spiral amphideal fovea, and conical tail (Muthumbi *et al.* 1995). However, in *Chromaspirina* the buccal cavity is well developed, with a large, pointed, anteriorly-directed dorsal tooth and two smaller subventral teeth, no ventral gland, and spicules with a capitulum (Muthumbi *et al.* 1995); whereas *Spirodesma* nov. gen. has a small

buccal cavity with 3 teeth (equally sized), 1 dorsal and 2 ventrosublateral, ventral gland and capitulum not offset. Furthermore, most species of *Chromaspirina* either do not form a bulb or have a pyriform bulb (*C. cylindrocollis* Cobb, 1920; *C. parva* Ott, 1972; *C. lunatica* Gerlach, 1963), differing from *Spirodesma* nov. gen., which has a muscular pharynx with a well-developed spherical and terminal esophageal bulb.



**FIGURE 3.** Female: A, entire body; B, bulb, nerve ring, secretory-excretory gland, cuticle annulation and amphid; C, reflexed ovaries; D, vulva and middle body annulation. Scales: A, B, C = 50 µm and D = 25 µm.

The cuticle, the size of the 3 teeth and the unique amphids shape distinguish *Spirodesma magdae* nov. gen. nov. sp. as a new genus and species within Spiriniinae. The presence of these 3, similarly sized, teeth make it necessary to emend the diagnosis of Spiriniinae.



**FIGURE 4.** Male: A, entire body, B, bulb, D, body annulation, E, teeth, G, tail, caudal glands and spinneret, H, spicules and gubernaculum. Female: C, entire body, F, vulva and reflexed ovaries. Scales: A, D: 50µm; B, E, F, G and H: 20µm; C: 100µm.

Emended diagnosis of the subfamily Spiriniinae Gerlach & Murphy, 1965

Body cuticle finely or sometimes coarsely striated. Head not demarcated as a cephalic capsule. Amphideal fovea a simple spiral, usually located far anterior on the body. Buccal cavity rather small, from

minute to medium-sized, with a distinct or a minute dorsal tooth; 2 smaller ventrosublateral teeth may be present or absent; or 3 teeth of the same size.

## Discussion

The cuticle of *Spirodesma* nov. gen., with strong annulations, greatly resembles members of the Desmodorinae. In contrast to the Brazilian new genus, the genera within Desmodorinae have a head set off as a conspicuous cephalic capsule or helmet, and the amphideal fovea in general, is not surrounded by striations and may be located on a cuticularized plate (Decraemer & Smol 2006).

Four genera within the Desmodorinae also do not have a head capsule (*Paradesmodora* Schuurmans Stekhoven, 1950, *Metadesmodora* Schuurmans Stekhoven, 1942, *Echinodesmodora* Blome, 1982, and *Stygodesmodora* Blome, 1982). Those genera have features strong enough to distinguish them from *Spirodesma* nov. gen. In *Paradesmodora* the amphids are large and cryptospiral and the cephalic setae are longer than those in *Spirodesma* nov. gen.. Moreover, the amphids of *Metadesmodora* are composed of two concentric circular bands, situated on a disc-like plate, and its buccal cavity has no teeth. In *Echinodesmodora*, the amphids are cryptospiral and surrounded by transverse striation, although the positions of the teeth are similar to *Spirodesma* nov. gen., differing only in size. As in *Echinodesmodora*, *Stygodesmodora* has amphids surrounded by transverse striations, but the buccal cavity only possesses a large dorsal tooth and a small ventrosublateral tooth, which differs from the Brazilian genus.

Although the new genus *Spirodesma* shows a body cuticle similar to those in Desmodorinae, many strong characters make it possible to classify it within Spiriniinae, such as: the head not demarcated as a cephalic capsule; the amphideal fovea as a simple spiral, located anteriorly on the body; and a small buccal cavity.

## Acknowledgements

We gratefully thank the Brazilian Petroleum and Gas Company (PETROBRAS S.A.) for financial support leading to a nematode taxonomic project included on the Brazilian deep-sea research. We thank Nic Smol and Professor Dr. Wilfrida Decraemer (Ghent University, Belgium) for their help and advice with *Spirodesma* nov. gen. We also thank Alessandra Botelho for taking the pictures of the specimens and Luciana Tosta Sobral for designing the drawing plates.

## References

- Botelho, A. P., Silva, M. C., Esteves, A. M., Fonsêca-Genevois, V. (2007) Four new species of *Sabatieria* Rouville, 1903 (Nematoda, Comesomatidae) from the Continental Slope of Atlantic Southeast. *Zootaxa*, 1402, 39–57.
- Boucher, G. (1975) Nématodes des sables fins infralittoraux de la Pierre Noire (Manche occidentale). I. Desmodorida. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 3<sup>e</sup> série*, no 285, *Zoologie*, 195, 101–128.
- Blome, D. (1982) Systematik der Nematoda eines Sandstrandes der Nordseeinsel Sylt *Mikrofauna des Meeresbodens*, 86, 1–194.
- Cobb, N. A. (1891) *Anticoma*: a genus of free-living marine nematodes. *Proceedings of the Linnean Society, New South Wales*, 2<sup>nd</sup> series, 5(6), 765–774.
- Cobb, N.A. (1920) One hundred new nemas (type species of new genera). *Contribution to a science of nematology*, Baltimore, 9, 217–343.
- Coomans, A. (1979) A proposal for a more precise terminology of the body regions of a nematode. *Annales de la Société Royale de Zoologie de Belgique*, 108, 115–117.
- Decraemer, W. & Smol, N. (2006) Orders Chromadorida, Desmodorida and Desmoscolecida In *Eyuaalem-Abebe, W. Traunspurger & I. Andrassy*. Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy, pp 497–573.
- De Coninck, L. A. (1965) Classe des Nématodes – Systematique des Nématodes et sous-classe des Adenophores. *Traité*

- de Zoologie* (ed. Grasse), 4(2), 586–681.
- De Man, J. G. (1880) Die einheimischen, frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht und deskriptiv-systematischer Teil. *Tijdschrift Nederlandsche Dierkundig Vereëiging*, 5, 1–104.
- Filipjev, I. (1918/1921) Free-living marine nematodes of the Sevastopol area (In Russian). *Trudy Osoboi Zoologicheskoi Laboratorii i Sevastopol'skoi Biologicheskoi Stantsii Petrograd* (2), 4:1–350 (1918), 351–614 (1921), English translation by M. Raveh, Israel Programme for Scientific Translations, Jerusalem, 1968 (part 1, p. 1–255), 1970 (part 2, p. 1–203).
- Filipjev, I. (1922) Encore sur les Nematodes libres de la Mer Noire. *Trudy Stavropol'skago Sel'skokhozyaistvennago Instituta Stavropol*, 1, 83–184.
- Gerlach, S. A. (1957) Die Nematodenfauna des Sandstrandes an der Küste von Mittelbrasilien (Brasilianische Meeres-Nematoden IV). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 33, 454–455.
- Gerlach, S. A. (1963) Freilebende Meeresnematoden von den Malediven II. *Kieler Meeresforschung*, 19, 67–103.
- Gerlach, S. A. & Murphy, D. G. (1965) Die Familiengruppen-Namen der freilebenden Nematoden – Adenophorea (Aphasmidia). *Zoologischer Anzeiger Jena*, 175, 211–216.
- Gerlach, S.A & Riemann, F. (1973) The Bremerhaven Checklist of Aquatic Nematodes. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven*, Supplement 4, 1, 1–734.
- Hope, W. D. & Murphy, D. G. (1972) A taxonomic hierarchy and checklist of the genera and higher taxa of marine nematodes. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 137, 1–101.
- Jensen, P. (1978). Revision of Microlaimidae, Erection of Molgolaimidae fam. n., and Remarks on the Systematics Position of *Paramicrolaimus* (Nematoda, Desmodorida). *Zoologica Scripta*, 7, 159–173.
- Lorenzen, S (1981) Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven*, 7, 1–472.
- Lorenzen, S. (1994) *The Phylogenetic systematics of free living nematodes*. The Ray Society, 383pp.
- Muthumbi, A., Verschelde, D. & Vincx, M. (1995) New Desmodoridae (Nematoda: Desmodoroidea): Three new species from Ceriops mangrove sediments (Kenya) and one related new species from the North Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 36(3), 181–195.
- Ott, J. A. (1972) Twelve new species of nematodes from an intertidal sandflat in North Carolina. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 57, 463–496.
- Schuurmans Stekhoven, J. H. (1942) The free-living marine nematodes of the Mediterranean III. The Balearic Islands. *Zoologische Mededelingen (Leiden)*, 23 (3–4), 229–262.
- Schuurmans Stekhoven, J. H. (1950) The free-living marine nemas of the Mediterranean. I. The bay of Villefranche. *Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique Memoires*, 37, 1–220.
- Soetaert, K. & Heip, C. (1995) Nematode assemblages of deep-sea and shelf break sites in the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 125, 171–183.
- Steiner, G. (1927) Epsilonematidae, a new nemic family. *Journal of Parasitology*, 14, 65–66.
- Timm, R. W. (1952) A survey of the marine nematodes of Chesapeake Bay, Maryland. *Chesapeake Biology Laboratory Publication*, 95, 1–70.
- Verschelde, D., Muthumbi, A. & Vincx, M. (1995) *Papillonema danieli* gen. et sp. n. and *Papillonema clavatum* (Gerlach, 1957) comb. n. (Nematoda, Desmodoridae) from the Ceriops mangrove sediments of Gazi Bay, Kenya. *Hydrobiologia*, 257, 129–142.
- Vincx, M. & Goubault, N. (1989) Desmodoridae from the Bay of Morlaix (Brittany) and the Southern Bight of the North Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 30, 103–114.
- Wieser, W. & Hopper, B. E. (1967) Marine nematodes of the East coast of North America. I. Florida. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 135, 239–344.

## **CAPÍTULO 2**

### **Uso de dados moleculares e morfológicos nas relações genético-evolutivas em Desmodoridae (Nematoda: Desmodoridae).**

## 1. INTRODUÇÃO

A sistemática do Filo Nematoda tem sofrido grandes mudanças e ainda não é totalmente reconhecida (De Ley & Blaxter 2002). Logo, estabelecer o mais baixo nível taxonômico, em particular, a descrição de várias novas espécies tem levado a um contínuo rearranjo e subdivisão do grupo (Traunspurger 2002).

Antes do avanço das análises filogenéticas moleculares dos nematódeos, o estudo sistemático do filo era limitado pelo: (1) número de espécies e diversidade morfológica, (2) limitações das análises de sua morfologia por microscopia óptica, (3) a inevitável especialização da sistemática desses animais e (4) a dificuldade de formar sistematas (Blaxter 2001). Diante destas dificuldades, técnicas moleculares vêm sendo cada vez mais aplicadas para o estudo das relações filogenéticas e classificação rápida de vários grupos da meiofauna. Nestes estudos estão incluídos os nematódeos marinhos de vida livre que são, frequentemente, os mais abundantes e, por isso, o componente ecológico mais importante da meiofauna (Bhadury *et al.* 2005).

Devido à natureza ainda imatura da taxonomia de nematódeos, se faz necessário comparar as tradicionais características morfológicas observadas por microscopia com as análises moleculares (Bhadury *et al.* 2005). Nesse sentido, estudos de iluminação recíproca vêm sendo cada vez mais freqüentes em grupos animais, cuja biodiversidade é controversa (Lanzone *et al.* 2006; Padial & Riva 2009).

Métodos filogenéticos moleculares propiciam comparação de táxons diferentes usando o mesmo sistema: a evolução de uma única molécula conservada e que atenda a um padrão dicotômico de evolução ao longo da hierarquia taxonômica criada por Linneu. O uso de marcadores moleculares certamente apresenta suas limitações, mas em geral, o modelo da evolução das seqüências de DNA é mais bem entendido do que o dos caracteres morfológicos (Dorris *et al.* 1999). Nesse sentido, a robustez dos métodos de sistemática molecular pode ser sustentada nos diferentes parâmetros considerados (*e.g.* tipos de substituição nucleotídica e/ou distribuição da variância dos sítios) pelos 56 diferentes modelos que explicam a evolução molecular (Hillis 2003; Posada & Crandall 1998).

A identificação de espécimes através do uso de DNA já está sendo utilizada para comunidades microbianas e protozoárias, e tem revelado uma diversidade rica e escondida. Como forma de exemplificação, o CBOL (Consortium for Barcode of Life – [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)) é uma iniciativa internacional dedicada à decifração da assinatura genética das espécies animais, tendo em vista a variação nucleotídica do gene que codifica

para a Citocromo C oxidase I (mtDNA). De acordo com Blaxter (2004) Nematoda parece ser um grupo ideal no qual o sistema de identificação molecular pode ser usado. Uma vez que apesar de grande parte dos nematódeos medir aproximadamente 1 milímetro e compreender 1000-2000 células, seu tamanho é o suficiente para a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), com o mínimo esforço requerido para preparação de amostras. Em vários casos, o nematódeo pode ser simplesmente esmagado numa gota de água e uma parte da solução adicionada diretamente à reação de PCR. Outros métodos de preparo envolvem digestão protéica e purificação de DNA. Múltiplas amplificações (5-10) podem ser alcançadas apenas um nematódeo (Powers & Harris 1993).

RNAs ribossomais (rRNA) têm sido extensivamente estudados e vêm sendo frequentemente utilizados como fonte de informação cladística (Blaxter *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 2004; Meldal *et al.* 2007; Holterman *et al.* 2008) e ecológicos (Floyd *et al.* 2002; Foucher & Wilson 2002; Eyualet & Blaxter 2003; Waite *et al.* 2003). Além disso, existem atualmente milhares de sequências de 18S disponíveis no banco de dados GenBank (Griffiths *et al.* 2005; Genbank acessado em 26/01/2010). Nos eucariotos, essas regiões genômicas estão presentes em múltiplas cópias significativamente idênticas, não codificam proteínas, e ainda, há uma extensiva literatura na área (Blaxter 2001). A porção genômica 18S rRNA se apresenta como um bom marcador, pois parte da região é altamente conservada, servindo como ponto de referência para estudos de divergência evolutiva entre táxons, especialmente na diferenciação de espécies (Foucher & Wilson 2002).

Como forma de exemplificação, mais recentemente, Neres *et al.* (2010) utilizaram métodos moleculares associados a evidências morfométricas e merísticas tradicionais em representantes da família Xyalidae, para desenvolver uma taxonomia integrativa focada na descrição de um novo táxon do gênero *Daptonema* na região Neotropical. Tais autores ainda reavaliam o status taxonômico de diversas espécies da família Xyalidae, confirmando a estreita relação entre os gêneros *Daptonema* e *Theristus*, os indicando como grupos naturais. Além disso, foram sugeridos dois erros de identificação, pelo posicionamento filogenético de *Daptonema normandicum* e *Metadesmolaimus* sp., uma possível sinonimização entre *Daptonema hirsutum* e *D. setosum*, além de uma sugestão de identificação taxonômica de um *Theristus* sp. como um representante da espécie *Theristus acer*.

Devido ao número ainda restrito de sequências disponíveis, o relacionamento de diversos grupos continua não resolvido (Decraemer & Smol, 2006). Como alternativa, diferenças morfológicas são solicitadas, mas a grande lista de espécies sinonimizadas na literatura é uma testemunha da subjetividade desse método (Eyualet & Blaxter 2003).

Algumas espécies podem ser morfologicamente idênticas, porém isoladas reprodutivamente (De Ley *et al.* 1999; Ferris 1983; Kaplan *et al.* 2000; Nguyen *et al.* 2001). Já outras podem ser geneticamente semelhantes, mas fenoticamente diferentes. Como resultado, dados moleculares, ecológicos, fisiológicos, etc. têm sido reconhecidos mais do que nunca como uma ferramenta vital na descoberta e diagnose de espécies de Nematoda (De Ley *et al.* 1999; Sommer *et al.* 1996).

No que se refere a estudos sistemáticos em Desmodoridae, Meldal *et al.* (2007) indicaram a família como um grupo monofilético, porém as relações filogenéticas internas dessa família estão muito pouco esclarecidas, necessitando assim de estudos um pouco mais aprofundados. Apesar do forte conjunto de evidências morfológicas potencialmente sinapomórficas que sistematizam a diversidade da família Desmodoridae em 6 subfamílias, o advento dos métodos de taxonomia cladística, com base em caracteres moleculares de DNA, tem revelado interessantes padrões de diversidade em nematódeos em geral (Foucher *et al.* 2004; Griffiths *et al.* 2005; De Ley *et al.* 2005; Meldal *et al.* 2007; Holterman *et al.* 2008; Ferri *et al.* 2008) e, especialmente em Desmodoridae (Holterman *et al.* 2008; Megen *et al.* 2009). Entretanto, a atual sistematização da biodiversidade de Desmodoridae, torna-se ainda passiva de testes por meio de conjuntos de dados integrativos, analisados e abordados de forma distinta daqueles já utilizados.

Claramente, espécies crípticas devem ser abundantes no filo Nematoda, e as técnicas moleculares podem ser a única estratégia prática para reconhecê-las (Powers 2004). O desenvolvimento de técnicas moleculares e a identificação de sequências do DNA fornecem uma quantidade muito mais vasta de dados, permitindo uma análise mais profunda (número de caracteres e robustez analítica) de relacionamentos filogenéticos (Decraemer & Smol 2006).

## 2. HIPÓTESES

- Desmodoridae constitui um grupo monofilético;
- Os táxons analisados relacionam-se filogeneticamente tal e qual a inferência morfológica disponível;
- As seis subfamílias de Desmodoridae constituem-se como grupos monofiléticos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Geral

- ✓ Usar de um protocolo baseado em evidências moleculares e morfológicas (taxonomia integrativa/iluminação recíproca) para o melhor entendimento sobre a diversidade taxonômica de Desmodoridae.

### 3.2 Específicos

- ✓ Amplificar e sequenciar a região 18S rDNA de alguns representantes de Desmodoridae;
- ✓ Posicionar filogeneticamente representantes da família Desmodoridae, a partir de um banco de dados de seqüências 18S a serem obtidas além daquelas disponíveis no GenBank.
- ✓ Reavaliar a monofilia da família Desmodoridae, através da taxonomia cladística em nível molecular e morfológico, perante uma amostragem taxonômica mais ampla;
- ✓ Testar a monofilia das subfamílias, filogeneticamente, perante bases de dados distintos (molecular/morfológico), plataforma analítica robusta e perante as inferências acerca das relações de similaridade dos táxons estudados, providas pela literatura e baseadas em um conjunto dados de natureza morfológica;
- ✓ Verificar quais dos ramos evolutivos de Desmodoridae se sustentam reciprocamente por meio de arranjos filogenéticos providos por moléculas e morfologia

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material estudado

Exemplares dos gêneros pertencentes à família Desmodoridae foram obtidos a partir de amostras oriundas da Bacia de Campos (Rio de Janeiro), Bacia do Pina (Recife) e Bacia do Maranhão (Maranhão). Além disso, foram angariadas as seqüências 18S rDNA do banco de dados do GenBank para uma melhor representatividade amostral de Desmodoridae.

### 4.2 Procedimentos de Laboratório

A elutriação da amostra foi feita pela técnica adaptada de Gray & Rieger (1971). As amostras foram colocadas em Becker de 1000 mL, lavadas e elutriadas sucessivamente (mínimo de 10 vezes). O sobre nadante resultante deste procedimento foi vertido em peneiras geológicas de intervalos de malhas de 0,044 mm e 0,5 mm, para a retenção da meiofauara, e

fixadas em solução de álcool P.A. 96%. O material retido na peneira foi colocado em placa de Dolffus sob estereomicroscópio para a triagem dos nematódeos.

A diafanização foi feita pela adaptação da técnica de De Greisse (1969). Os nematódeos triados, foram colocados em cadinhos contendo solução 2 (95% de etanol e 5% de glicerina) e levados a estufa por 10 horas. A cada duas horas foi adicionado mais solução 2, e por fim, colocou-se a solução 3 (50% de etanol e 50% de glicerina), na qual os nematódeos ficaram depositados até a montagem das lâminas.

Os indivíduos então foram dispostos em lâminas permanentes para posterior identificação ao nível de gênero dos representantes da família Desmodoridae. Para a montagem das lâminas de vidro, estas foram previamente lavadas com álcool a 70%, para eliminação da gordura e preparadas com um círculo de parafina, contendo uma gota de glicerina no centro do círculo. Em cada lâmina foi disposto um indivíduo na glicerina, que foi posteriormente recoberta por uma lamínula.

A identificação dos indivíduos ao nível de gênero foi feita com o auxílio de um microscópio óptico, modelo OLYMPUS CX31RBSFA, com consulta da chave pictorial de Warwick *et al.* (1998) e Eyualet-Abebe *et al.* (2006). A classificação taxonômica foi baseada em Lorenzen (1994) e as diagnoses das famílias, das subfamílias e dos gêneros seguem Decraemer & Smol (2006).

### **4.3 Extração do DNA, PCR e Sequenciamento**

Dois indivíduos de cada gênero identificado como pertencentes à família Desmodoridae, foram separados e fotografados. O material foi em seguida levado para a Universidade de Gent, Bélgica, para serem realizados os procedimentos moleculares: extração do DNA genômico, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento da região nuclear 18S.

A extração do DNA foi realizada a partir do protocolo de extração de Paul De Lay (De Ley *et al.* 2005). Cada espécime foi colocado em uma lâmina com 20 µl de tampão WLB (5ml de 0,5M KCl; 5ml de 0,1M Tris HCl pH 8,3; 0,5ml de 0,25M MgCl<sub>2</sub>; 0,225ml de NP40 e 0,225ml de Tween 20), onde foi cortado, com um bisturi estéril, em dois ou mais pedaços (dependendo do tamanho do animal). Depois o tampão, juntamente com os pedaços dos nematódeos, foi pipetado dentro de tubos eppendorf contendo 2 µl de proteinase K. Após agitar em vortex rapidamente, os tubos foram colocados no nitrogênio líquido por 10 minutos, e em seguida incubados no termociclador durante 1 hora a 65°C e 10 minutos a 95°C. Ao

término da incubação, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 3 minutos e estocados no freezer a -20°C.

A reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo de Paul De Lay (De Ley *et al.* 2005). Sendo utilizados os seguintes primers 18S (Waite *et al.* 2003).

- *Forward*: 5'-CGC AAA TTA CCC ACT CTC-3'
- *Reverse*: 5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG-3'.

Para cada espécime foi preparada a PCR master mix contendo 18,2 µl de DDH<sub>2</sub>O, 2,5 µl de PCR tampão 10x, 0,75 µl de 10 mM DNTPs, 0,4 µl de 25 µM primer (18S *Forward*, *Reverse*), 0,25 µl de Taq Polimerase e 2,5 µl de DNA da amostra extraída. Em seguida, os tubos foram colocados no termociclador para seguir o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação DNA), 55°C por 30 segundos (anelamento do Primer), 72°C por 1 minuto (extensão), e 72°C por 7 minutos (extensão final); e finalmente, 1 ciclo de 4°C para repouso.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% (0,9 µl de brometo de etídio em 20 ml de gel de agarose), onde 1 µl do tampão de corrida de gel e 5 µl do produto da PCR foram homogenizados e colocados em cada poço do gel. O marcador de peso molecular (5 µl, 1kb DNA ladder, PROMEGA Corp, Madison, WI, USA) foi adicionado no primeiro poço.

A purificação do produto da PCR, onde, para cada reação, foi pipetado, num tubo Eppendorf, 5 µl do produto a ser limpo e 1 µl de Exo-SAP-it. Em seguida, a solução foi misturada, centrifugada rapidamente e incubada por 15 minutos a 37°C, seguido de mais 15 minutos a 85°C para inativação protéica.

As seqüências foram geradas por meio do uso do seqüenciador automatizado Applied Biosystems – 3130x/Genetic Analyzer – 16 capilares, segundo o protocolo de reação de sequenciamento por BigDye V3.1, disponibilizado pelo fabricante.

Em um tubo tipo eppendorf, foram pipetados 4 µl *Terminator Ready Reaction Mix*, 1,25 µl do produto de PCR limpo, 0,5 µl dos Primers (5 µM) e água esterilizada até o volume total de 10 µl.

A reação de sequenciamento foi estabelecida em 25 ciclos de 30 segundos a 6°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Então, foi feita a precipitação, a qual consiste em adicionar a cada tubo 26 µl (95% etanol + 0,12 M NaAc), misturar e deixar em temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm (4°C), remover o sobrenadante, adicionar 125 µl de etanol 70% em cada tubo, misturar, centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm (4°C). Remover sobrenadante novamente e secar por 15 minutos no

vácuo. Foi adicionado 10 µl de Hi-Di-formaldeído em cada tudo, misturado e transferido para uma placa de 96 poços. As amostras foram aquecidas por 2 minutos a 95°C e colocadas imediatamente no gelo. Depois colocadas no seqüenciador e o programa foi rodado.

#### 4.4 Análise dos dados moleculares

Seqüências 18S rRNA de 30 espécies de 13 gêneros pertencentes a família Desmodoridae foram utilizadas para o estudo (Tabela 1), além dos espécimes sequenciados neste trabalho.

As seqüências foram alinhadas no BioEdit (Hall 1999) utilizando o alinhamento múltiplo pelo programa ClustalW. Para tal, foram adotadas os valores de 15 para abertura de um *Gap* e 0,3 para a extensão de um *Gap* (Hall 2001). Os caracteres foram designados como não-ordenados e com pesos iguais. Após o alinhamento, as extremidades das seqüências foram cortadas, tanto na região inicial quanto no final das mesmas, de modo a evitar o acúmulo de *gaps* entre os sítios analisáveis. Tal iniciativa também foi conduzida a fim de otimizar o tratamento das seqüências pelos métodos utilizados para a geração das hipóteses de relacionamento genético e filogenético.

As seqüências foram exportadas como um arquivo *Nexus* e analisadas por meio dos softwares PAUP\* 4.0b10 (Swofford 2001), por meio da sua interface gráfica PaupUp (Calendini & Martin, 2005), e Winclada/NONA (Nixon 2002; Goloboff 1999), pelos métodos de *neighbor-joinnng* (NJ; Saitou & Nei 1987) e Máxima Parcimônia (PM sem pesagem; Fitch 1977) com *Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia contata*, *Calomicroalimus* sp. e *Daptonema matrona* como grupos externos.

O modelo de evolução molecular que melhor explica a variação dos sítios foi determinado por meio do software Modeltest (incorporado ao PAUP\* 4.0b10), usando o critério Akaike (Posada & Crandall 1998). Dessa forma, a análise dos dados pelo método de distância de *neighbor-joining* foi conduzida usando os parâmetros do modelo indicado.

A análise de parcimônia foi conduzida por busca heurística e todos os caracteres foram designados como não-ordenados, com o peso equivalente e otimizados nas modalidades Acctran e Deltran. Foi estabelecido um número máximo (*MaxTrees*) de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias, sendo ainda determinado o consenso estrito das árvores geradas.

Para ambas as análises, os índices de *Bootstrap* e *Jackknife* foram utilizados como suporte de ramos, sendo geradas árvores sob o consenso de restrição maior que 50%, por meio da opção de busca *fast stepwise addition* em 10.000 pseudoréplicas. Para a análise de máxima parcimônia, adição de OTUs (*operational taxonomic units*) também foi randômica e a sua

permuta igualmente realizada por meio de *tree-bisection-reconnection* (TBR). Para a análise de *neighbor-joining* os índices *Bootstrap* e *Jackknife* foram determinados usando os mesmos parâmetros outrora utilizados para a análise de agrupamento.

A análise de inferência Bayesiana foi conduzida por meio do uso do software MrBayes v. 3.1.1 (Huelsenbeck *et al.* 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) e usando igualmente o modelo de evolução indicado pelo Modeltest em 3 milhões de gerações de 4 cadeias de Markov. As probabilidades posteriores dos ramos foram obtidas a partir do consenso de maioria das árvores obtidas, usando o critério de finalização da análise perante a obtenção de um desvio padrão inferior à 0,01 e um período *burnin* igual à 400 gerações.

**Tabela 1.** Espécies de Desmodoridae e seus respectivos número de acesso do banco de dados GenBank. As cinco primeiras sequências são os grupos externos.

| Espécie                           | Número de acesso  |
|-----------------------------------|-------------------|
| <i>Panagrolaimus rigidus</i>      | DQ285636.1        |
| <i>Paratrichodorus minor</i>      | GQ995710.1        |
| <i>Monoposthia costata</i>        | AY854221.1        |
| <i>Calomicrolaimus</i> sp.        | AY854219.1        |
| <i>Daptonema matrona</i>          | EF436228.1        |
| <i>Spirinia parasitífera</i>      | AY854217.1        |
| <i>Spirinia elongata</i> 1        | presente trabalho |
| <i>Spirinia elongata</i> 2        | FJ429257.1        |
| <i>Metachromadora remanei</i> 1   | AM234620.1        |
| <i>Metachromadora remanei</i> 2   | AY854216.1        |
| <i>Metachromadora</i> sp. 2       | AF036595.1        |
| <i>Metachromadora</i> sp. 1       | FJ040469.1        |
| <i>Acanthopharynx micans</i>      | Y16911.1          |
| <i>Acanthopharynx</i> sp.         | presente trabalho |
| <i>Croconema ovigera</i>          | Y16913.1          |
| <i>Desmodora pontica</i>          | AM234628.1        |
| <i>Desmodora communis</i>         | AY854215.1        |
| <i>Xyzzors</i> sp.                | Y16923.1          |
| <i>Molgolaimus demani</i>         | AY854220.1        |
| <i>Prodesmodora</i> sp. 1         | FJ040477.1        |
| <i>Prodesmodora</i> sp. 2         | FJ040476.1        |
| <i>Prodesmodora circulata</i> 1   | AY284722.1        |
| <i>Prodesmodora circulata</i> 2   | AY284721.1        |
| <i>Prodesmodora circulata</i> 3   | AY284720.1        |
| <i>Prodesmodora circulata</i> 4   | AY284719.1        |
| <i>Eubostrichus topiarius</i>     | Y16917.1          |
| <i>Eubostrichus parasitíferus</i> | Y16916.1          |
| <i>Eubostrichus diana</i>         | Y16915.1          |
| <i>Robbea</i> sp. 3               | EU784735.1        |
| <i>Robbea</i> sp. 2               | EU768871.1        |
| <i>Robbea</i> sp. 1               | EU768870.1        |
| <i>Robbea hypermnestra</i>        | Y16921.1          |
| <i>Catanema</i> sp.               | Y16912.1          |
| <i>Laxus oneistus</i>             | Y16919.1          |
| <i>Laxus cosmopolitus</i>         | Y16918.1          |
| <i>Leptonemella</i> sp.           | Y16920.1          |
| <i>Stilbonema majum</i>           | Y16922.1          |

Os grupos externos foram escolhidos de acordo com grau de parentesco e suas sequências 18S rDNA foram selecionadas do bando de dados Genbank: *Panagrolaimus rigidus* DQ285636 (Rhabditida, Panagrolaimidae), *Paratrichodorus minor* GQ995710.1 (Triplonchida, Trichodoridae), *Daptonema matrona* EF436228.1 (Monystherida, Xyalidae), *Monoposthia contata* AY854221.1 (Desmodorida, Monoposthiidae), *Calomicrolaimus* sp. AY854219.1 (Desmodorida, Microlaimidae). Classificação baseada em De Ley, Decraemer & Eyualem-Abebe (2006).

#### **4.5 Análise de dados morfológicos**

A partir dos dados morfológicos providos por Lorenzen (1994), os quais se baseiam em grupos externos, critério de ontogenia, princípio comum (“commonality principle”) e conceito de complexidade, foram interpretados os estados plesiomórficos (zero, 0) e apomórficos (1 ou mais) e assim foi elaborada uma matriz de dados polarizados (Tabela 2). Quando um gênero apresentou mais de um estado de caractere o táxon foi incluído duas vezes, isto é, com cada um dos estados do caractere. No caso em que o estado do caractere não se apresentava na diagnose do gênero, as descrições das espécies deste foram então consultadas.

##### **A. Cutícula**

Baseado no princípio comum, a cutícula lisa do corpo é considerado como caractere plesiomórfico. Baseado no princípio comum, a presença de ornamentação na cutícula é considerado como caractere plesiomórfico.

##### **B. Setas subcefálicas**

Baseado no princípio comum e relações de grupos irmãos, a presença de setas subcefálicas é considerada um caractere apomórfico.

##### **C. Posição dos anfídeos**

De acordo com Chitwood & Chitwood (1950), a posição dos anfídeos posterior a região labial é considerado um caractere plesiomórfico e sua posição na região do lábio é um caractere apomórfico.

##### **D. Fovea anfideal**

De acordo com Chitwood & Chitwood (1950), a forma uniespiral da fovea anfideal é considerado plesiomórfico em Chromadoria.

#### E. Anfideos na placa cuticular

Baseado no princípio comum e relações de grupos irmãos, anfideos na placa cuticular é considerado um caractere apomórfico.

#### F. Cápsula cefálica

Baseado no princípio comum e relações de grupos irmãos, a presença de cápsula cefálica é considerada um caractere apomórfico.

#### G. Cavidade bucal

Baseado na relação de grupo irmão, bacterófagos mais primitivos e princípio da complexidade a presença de dentes é considerada um caractere apomórfico.

#### H. Bulbo esofágiano

Baseado no princípio comum e relações de grupos irmãos, a ausência de bulbo esofágiano é considerada um caractere plesiomórfico.

**Tabela 2.** Séries de homólogos, seus respectivos estados de caráter e suas polaridades, sendo 0 plesiomorfia, 1, 2, 3 e 4 apomorfias, e ? ausência de informação.

|                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| A. Cutícula                  | E. Anfideos em placa cuticular |
| 0: Lisa                      | 0: Ausente                     |
| 1: Estriada sem ornamentação | 1: Presente                    |
| 2: Estriada com ornamentação |                                |
| 3: Anelada sem ornamentação  | F. Cápsula cefálica            |
| 4: Anelada com ornamentação  | 0: Ausente                     |
|                              | 1: Presente subdividida        |
| B. Setas subcefálicas        | 2: Presente não subdividida    |
| 0: Ausente                   |                                |
| 1: Presente                  | G. Cavidade bucal              |
|                              | 0: absent                      |
| C. Posição dos anfideos      | 1: Sem dentes                  |
| 0: Posterior a região labial | 2: Com denticulos apenas       |
| 1: Anterior na região labial | 3: Com dentes apenas           |
|                              | 4: Com dentes e denticulos     |
| D. Fovea anfideal            |                                |
| 0: uniespiral                | H. Bulbo esofágiano            |
| 1: multiespiral              | 0: Ausente                     |
| 2: criptoespiral             | 1: Alongado                    |
| 3: forma de loop             | 2: Piriforme                   |
|                              | 3: Redondo                     |

Foi estabelecido um grupo externo hipotético para a análise, que foi conduzida em um número máximo (*MaxTrees*) de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias, por meio da opção de busca *fast stewise addition*. A adição de OTUs também foi randômica e a sua permuta realizada por meio de *tree-bisection-reconnection* (TBR), sendo ainda determinado o consenso de maioria das árvores geradas

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Sequenciamento e alinhamento

O sequenciamento da região 18S rRNA foi bem sucedido para duas espécies de dois gêneros de Desmodoridae: *Spirinia elongata* Castro *et al.* (2005) e *Acanthopharynx* sp.

As duas novas sequências foram alinhadas juntamente com as sequências 18S rRNA de Desmodoridae (30 sequências) e os cinco grupos externos, providas do banco de dados Genbank. Cabe destacar que as novas sequências obtidas de 18S serão ainda depositadas no banco de dados do GeneBank. Quando alinhadas, os 204 nucleotídeos iniciais e 885 nucleotídeos finais foram excluídos da análise para evitar grandes *Gaps*, e então o alinhamento das 37 sequências ficou com 874 nucleotídeos. Destes, 874 caracteres alinhados, 413 foram constantes, 177 não foram informativos e 284 foram filogeneticamente informativos.

### 5.2 Determinação do modelo de evolução das sequências

A análise realizada pelo Modeltest versão 3.8 (Posada 2006) indicou o General time reversible (GTR+I+G), como sendo o cálculo matemático mais propício para o estudo dos dados. O Índice de Verossimilhança foi de  $-\ln L$  (Negative log likelihood) = 7464.8652, K= 81, AIC= 15091,7305 e as frequências das bases foram: freqA = 0.2588, freqC = 0.1891, freqG = 0.2618 e freqT = 0.2904. A proporção dos sítios invariáveis (I) foi de 0,2094; e a distribuição Gama, 0,4843. O modelo de matriz da taxa de substituição de bases foi: R(a) [A-C] = 1.2715, R(b) [A-G] = 3.2639, R(c) [A-T] = 1.2233, R(d) [C-G] = 0,6567, R(e) [C-T] = 5.7602, R(f) [G-T] = 1.0000.

### 5.3 Similaridade genética (*Neighbor-joining*)

A análise de Neighbor-joining, a partir de uma matriz de distância, gerou uma fenograma de distância genética (Figura 1), e os valores de *Bootstrap* e *Jackknife* estão dispostos da mesma.

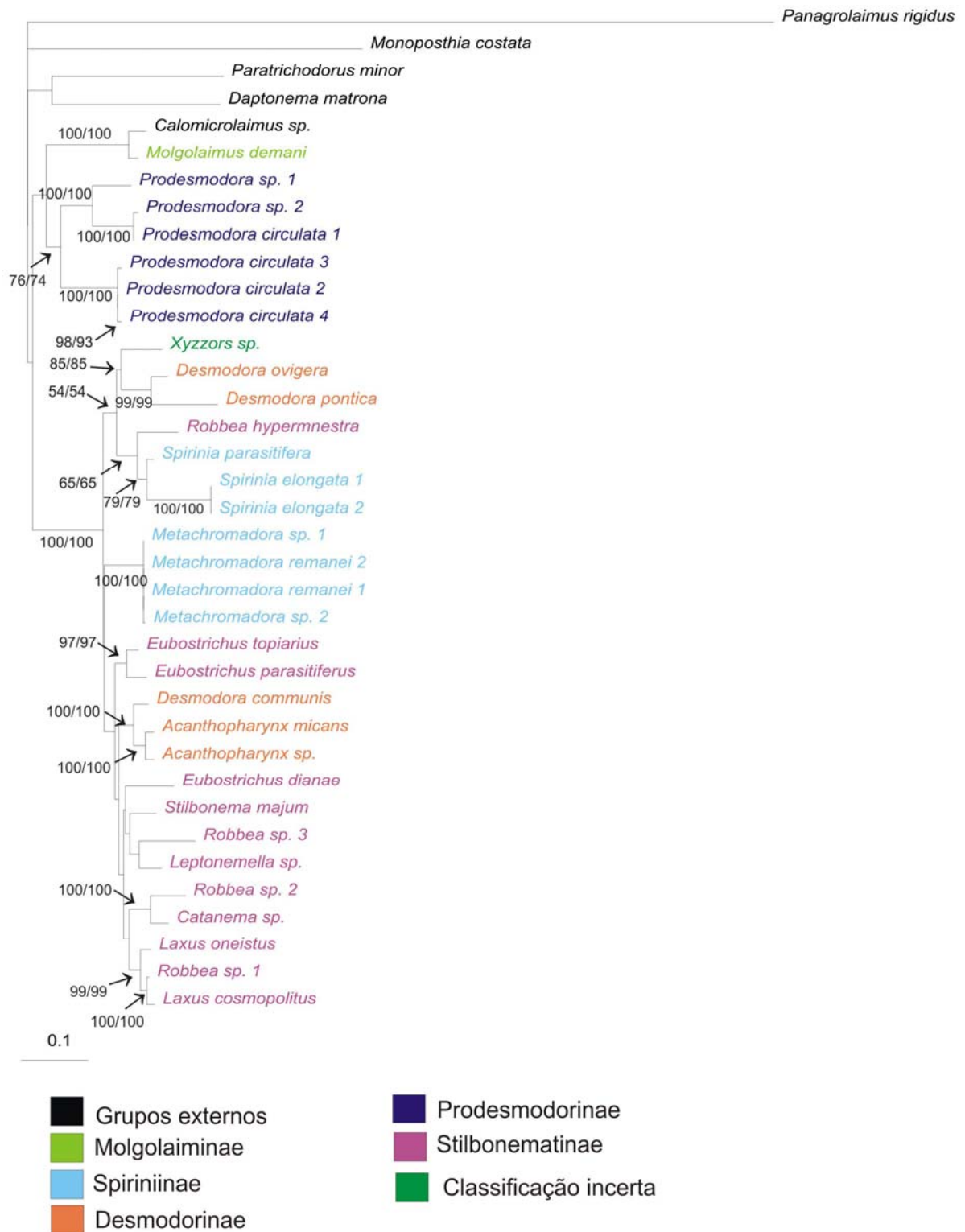
Desmodoridae se mostrou como uma unidade genética diferente dos demais táxons utilizados como grupos externos. Os membros de Desmodoridae se dividiram em dois agrupamentos genéticos com alta robustez estatística. O primeiro grupo compreendeu *Molgolaimus demani* + *Calomicrolaimus* sp. e todos as espécies/morfotipos de *Prodesmodora*.

*Spirinia elongata* se comportou como uma única unidade genética e próxima geneticamente de *Spirinia parasitifera*. Além disso, *Metachromadora* sp. 1, *Metachromadora remanei* 1 e *Metachromadora remanei* 2 formaram unidades genéticas idênticas, e se agruparam com *Metachromadora* sp.

*Xyzzors* sp. se apresentou geneticamente mais próximo do grupo genético formado por *Croconema ovigera* e *Desmodora pontica*. *Desmodora communis* se comportou como unidade genética mais próxima do agrupamento composto por *Acanthopharynx micans* e *Acanthopharynx* sp. Além disso, *Desmodora communis*, *Acanthopharynx micans* e *Acanthopharynx* sp. se apresentaram geneticamente mais próximas da unidade genética de Stilbonematinae.

O gênero *Robbea* se apresentou como uma unidade genética descontínua. *Robbea hypermnestra* se mostrou distante geneticamente dos demais membros de Stilbonematinae, se apresentando mais similar a *S. parasitifera*. *Robbea* sp. 2 e *Catanema* sp. formaram um grupo genético mais similar e este mais próximo do ramo compreendido por *Laxus oneistus*, *Laxus cosmopolitus* e *Robbea* sp. 1. Já *Robbea* sp. 3 e *Leptonemella* sp. formaram um grupo genético mais similar, e este geneticamente mais próximo de *Stilbonema majum*.

O gênero *Eubostrichus* apresentou-se com uma unidade genética descontínua, apesar da maior similaridade genética entre *Eubostrichus parasitiferus* e *Eubostrichus topiarius*. Já *E. diannae* ficou mais próximo de *Stilbonema majum*.



**Figura 1.** Topologia do Neighbor-joining baseado em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia costata*, *Calomicrolaimus sp.* e *Daptonema matrona*). Os números são valores de bootstrap e jackknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50%. Barra de escala= 0,1 substituições por sítio.

## 5.4 Filogenia Molecular

### 5.4.1 Máxima parcimônia (MP)

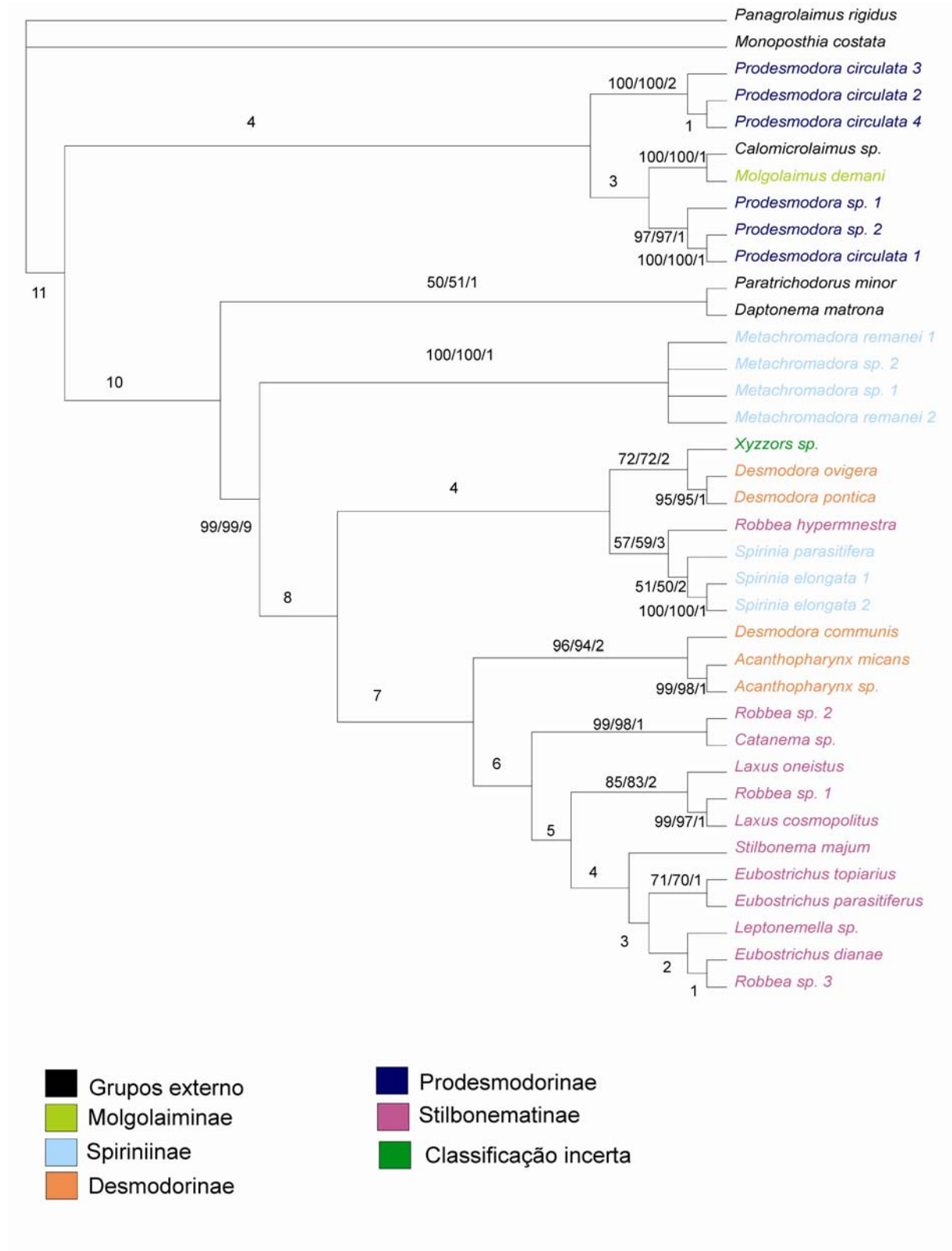
A topologia de máxima parcimônia (Figura 2) estabeleceu-se a partir do consenso estrito de 6 árvores igualmente parcimoniosas, geradas à partir de 1.014.586 rearranjos. Conjunto total de sítios analisados foi de 874 e destes, 413 foram constantes, 177 foram parcimoniosamente não-informativos e 284 foram parcimoniosamente informativos. O comprimento da árvore consenso (L) foi de 1422 passos e os índices de consistência (CI), de retenção (RI) e de homoplasias foram de 0,518, 0,320 e 0,482, respectivamente.

A topologia obtida indicou que a família Desmodoridae compreende dois ramos monofiléticos com forte sustentação estatística. O primeiro formado por *Molgolaimus demani* e todas as espécies e morfotipos estudados de *Prodesmodora*. Este último apresentou-se segregado em dois grupos: *Prodesmodora* sp. 1 (*Prodesmodora* sp. 2 + *P. circulata* 1) e *P. circulata* 3 (, *P. circulata* 2 + *P. circulata* 4), enquanto que, *Calomicrolaimus* sp. se agrupou com *Molgolaimus demani* formando um clado.

O segundo grande agrupamento filogenético observado compreendeu todos os demais táxons estudados de Desmodoridae. Os espécimes de *Metachromadora* se agruparam num clado a parte dos demais Desmodoridae, e se apresentaram como um grupo natural. Os desmodorides restantes formaram dois clados. O primeiro formado por *Robbea hypermnestra* + *Spirinia*, e este clado como grupo irmão de *Xyzzors* sp.+ *Croconema ovigera* + *D. pontica*. E o segundo grupo foi formado por *Desmodora communis* + *Acanthopharynx* e os demais Desmodoridae.

O gênero *Desmodora* se mostrou polifilética. *Croconema ovigera* se revelou como grupo irmão de *D. pontica*, e ambas como grupo irmão de *Xyzzors* sp., enquanto que *D. communis* se comportou como grupo irmão de *Acanthopharynx*, onde as duas espécies deste último formaram um clado monofilético com forte sustentação estatística.

Todas as espécies de Stilbonematinae, com exceção de *Robbea hypermnestra*, se agruparam em um único clado. *Robbea* sp. 2 e *Catanema* sp. se apresentaram com um clado irmão dos demais membros de Stilbonematinae. *Robbea* sp. 1 se apareceu como grupo irmão de *Laxus cosmopolitus*, e estes dois com grupo irmão de *Laxus oneistus*. *Stilbonema majum* e comportou como grupo irmão dos demais espécimes, sendo *Eubostrichus topiarius* e *Eubostrichus parasitiferus* grupo irmão do clado *Eubostrichus diana*e + *Robbea* sp. 3 + *Leptonemella* sp.



**Figura 2.** Árvore de consenso estrito da Máxima Parcimônia baseada em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia costata*, *Calomicroalaimus* sp. e *Daptonema matrona*). Os números nos ramos são valores de bootstrap, jackknife (10.000 pseudoréplicas), respectivamente, ambos com suporte de ramo acima de 50% e suporte de Bremen.

#### 5.4.2 Análise de inferência Bayesiana (IB)

A topologia da inferência Bayesiana (Figura 3) resultou do consenso (regra de maioria) de 29.601 árvores e o desvio padrão foi de 0,009947.

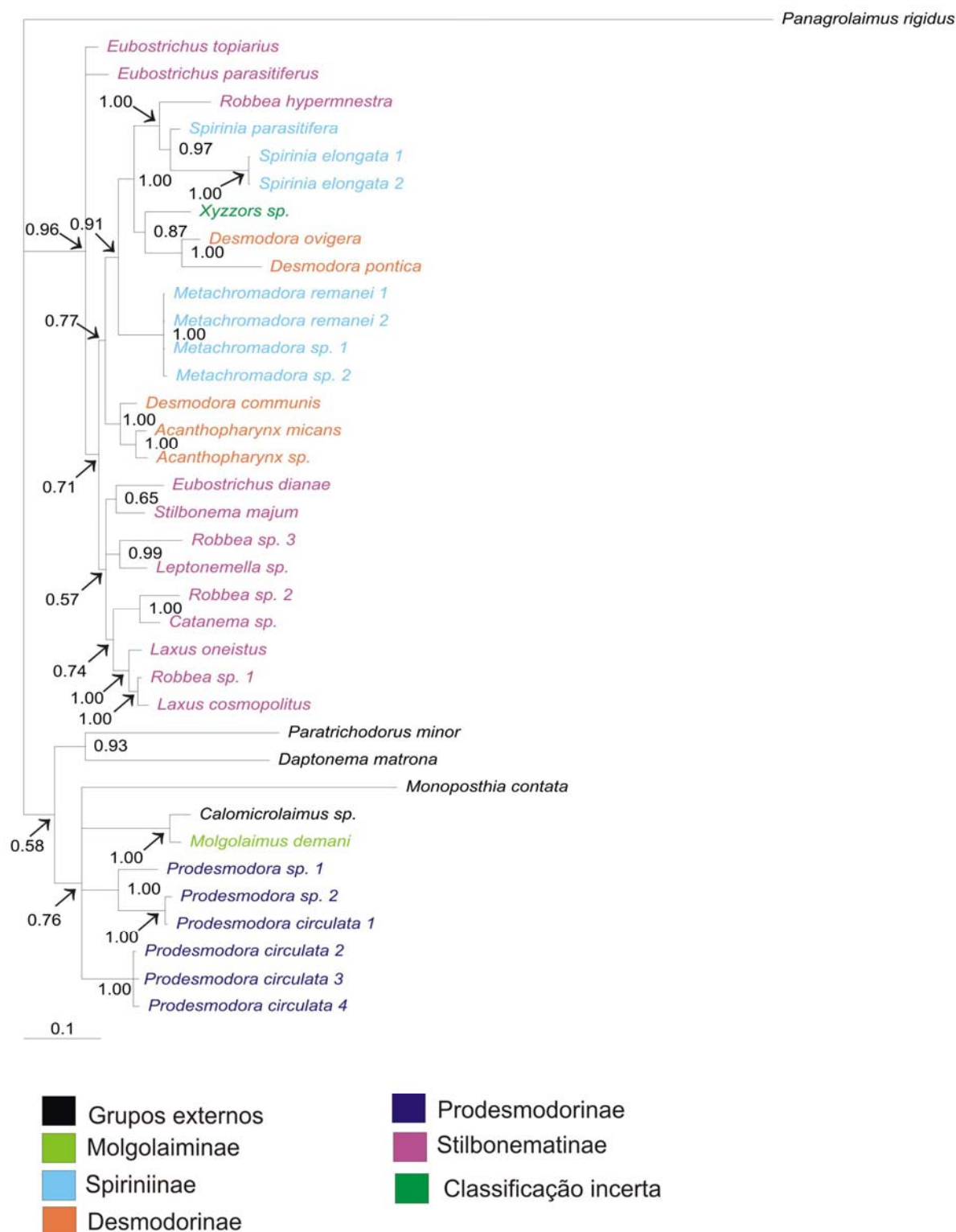
A família Desmodoridae se caracterizou como polifilética segundo a análise Bayesiana. Tal parafilia foi caracterizada pelo posicionamento de *Molgolaimus demani* e os espécimes de *Prodesmodora* fora do clado formado pelos demais membros de Desmodoridae. Estes dois gêneros se agruparam com quatro grupos externos (*Paratrichodorus minor*, *Daptonema matrona*, *Monoposthia costata* e *Calomicrolaimus* sp.), sustentados por um baixo suporte pela probabilidade posterior.

Uma tricotomia foi formada por *E. tropiarus*, *E. parasitiferus* e os demais membros de Desmodoridae. Estes foram divididos em dois clado, sendo o primeiro formado por uma tricotomia entre *E. diana* + *Stilbonema majum*, *Robbea* sp. 3 + *Leptonemella* sp., e *Robbea* sp. 2 + *Catanema* sp. + *Robbea* sp. 1 + *Laxus oneitus* + *Laxus cosmopolitus*.

A subfamília Spiriniinae se mostrou como um grupo parafilético. Por outro lado, o gênero *Spirinia* apresentou-se como monofilético com forte sustentação probabilística, e grupo irmão de *Robbea hypermnestra*. *Spirinia elongata* é igualmente um grupo natural, assim como o gênero *Metachromadora*.

O clado composto pelos representantes de *Spirinia* e *Robbea hypermnestra*, revelou-se com grupo irmão do clado composto por *Xyzzors* sp., que parece se relacionar evolutivamente com *Croconema ovigera* e *D. pontica*. Estes últimos ainda se apresentaram como grupos irmãos. Por outro lado, o gênero *Desmodora* se mostrou polifilético. Desmodorinae se reiterou como polifilético. Já *Desmodora communis* se comportou como grupo irmão de *Acanthopharynx*, que se apresentou como monofilético.

Stilbonematinae não se apresentou coesa tendo em vista a análise Bayesiana. O gênero *Eubostrichus* se revelou polifilético, devido ao posicionamento de *E. tropiarus* e *E. parasitiferus*. O gênero *Robbea* se apresentou como polifilético. O gênero *Laxus* se mostrou parafilético, apesar do posicionamento filogenético de *Robbea* sp 1.



**Figura 3.** Topologia de Inferência Bayesiana baseada em seqüências de 18S de 32 espécimes de Desmodoridae e 5 grupos externos (*Panagrolaimus rigidus*, *Paratrichodorus minor*, *Monoposthia contata*, *Calomicroalimus* sp. e *Daptonema matrona*). A topologia é resultante de 29.601 árvores (3.000.000 de gerações/desvio padrão de 0,009947).

### 5.5 Filogenia morfológica

A topologia de máxima parcimônia (Figura 4) estabeleceu-se a partir do consenso de maioria de 5650 árvores igualmente parsimoniosas. O comprimento da árvore consenso (L) foi de 51 passos e os índices de consistência (CI) e de retenção (RI) foram de 37 e 70 respectivamente.

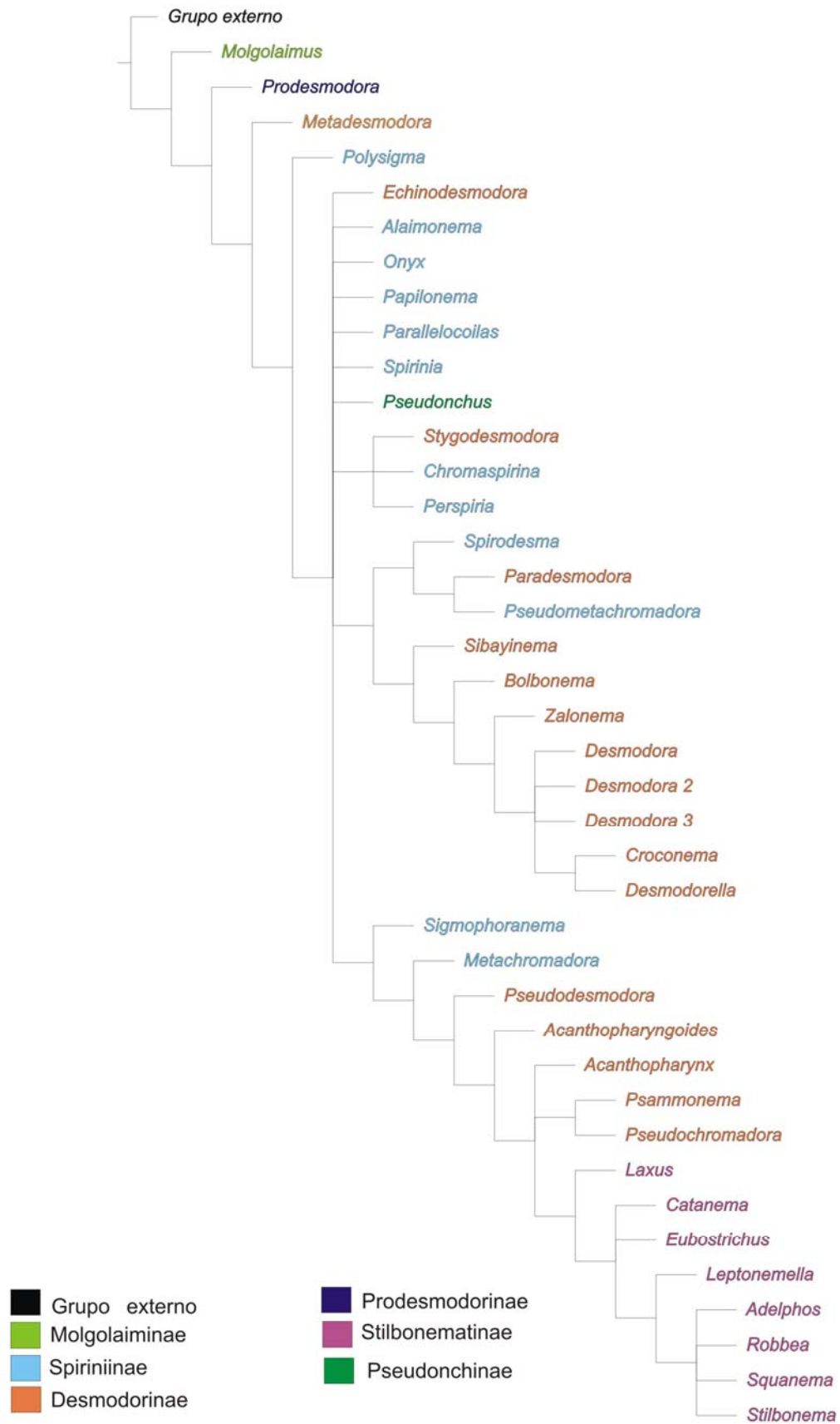
A topologia da análise de máxima parcimônia (Figura 4) apresentou *Molgolaimus* como grupo irmão dos demais desmodorídeos. *Prodesmodora* se comportou como táxon irmão do desmodorídeos restantes. Uma dicotomia mostrou *Metadesmodora* como grupo irmão dos demais desmodorídeos, e novamente outra dicotomia apresentou *Polysigma* como grupo irmão dos desmodorídeos restantes.

Uma politomia foi formada por *Echinodesmodora*, *Alaimonema*, *Onyx*, *Papillonema*, *Parallelocoilas*, *Spirinia*, *Pseudonchus*, o clado *Stygodesmodora* + *Chromaspirinia* + *Pespiria*, o clado formado por *Spirodesma*, *Paradesmodora* + *Pseudometachromadora*, *Sibayinema*, *Bolbonema*, *Zalonema* e a politomia que compreendeu *Desmodora*, *Desmodora* 2 e *Desmodora* 3, *Croconema* + *Desmodorella*. O último clado foi composto por *Sigmophoranema*, *Metachromadora*, *Pseudodesmodora*, *Acanthopharyngoides*, *Acanthopharynx*, *Psammonema*, *Pseudochromadora* e os demais restantes pertencentes à subfamília Stilbonematinae.

Portanto, Stilbonematinae se mostrou como um grupo monofilético, sendo *Laxus* o táxon irmão dos demais membros da subfamília. Uma tricotomia foi formada por *Catanema*, *Eubostrichus* e *Leptonemella* como grupo irmão da politomia formada por *Adelphos*, *Robbea*, *Squanema* e *Stilbonema*.

**Tabela 3.** Matriz formada pelos táxons estudados e os caracteres morfológicos polarizados. Grupo externo hipotético.

|                             | A | B | C | D | E | F | G | H |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Grupo externo</i>        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Acanthopharyngoides</i>  | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Acanthopharynx</i>       | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Bolbonema</i>            | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| <i>Croconema</i>            | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Desmodora</i>            | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| <i>Desmodora 2</i>          | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| <i>Desmodora 3</i>          | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| <i>Desmodorella</i>         | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| <i>Echinodesmodora</i>      | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Metadesmodora</i>        | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| <i>Paradesmodora</i>        | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Psammonema</i>           | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Pseudochromadora</i>     | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Pseudodesmodora</i>      | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Sibayinema</i>           | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 |
| <i>Stygodesmodora</i>       | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 |
| <i>Zalonema</i>             | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 |
| <i>Alaimonema</i>           | 1 | ? | 0 | 1 | 0 | 0 | ? | 2 |
| <i>Chromaspirina</i>        | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| <i>Metachromadora</i>       | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| <i>Onyx</i>                 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Papilonema</i>           | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| <i>Parallelocoilas</i>      | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| <i>Perspiria</i>            | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| <i>Polysigma</i>            | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Pseudometachromadora</i> | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| <i>Sigmophoranema</i>       | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| <i>Spirinia</i>             | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Spirodesma</i>           | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Adelphos</i>             | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 |
| <i>Catanema</i>             | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| <i>Eubostrichus</i>         | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| <i>Laxus</i>                | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| <i>Leptonemella</i>         | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| <i>Robbea</i>               | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 |
| <i>Squanema</i>             | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | ? |
| <i>Stilbonema</i>           | 3 | 1 | 1 | ? | 0 | 2 | 1 | 2 |
| <i>Molgolaimus</i>          | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| <i>Pseudonchus</i>          | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 |
| <i>Prodesmodora</i>         | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 |



**Figura 4.** Topologia da Máxima Parcimônia baseada em caracteres morfológicos dos 40 táxons de Desmodoridae e o grupo externo hipotético.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Monofilia de Desmodoridae.

A análise de distância genética indicou que Desmodoridae é uma unidade genética coesa, porém subdivida em dois agrupamentos mais similares entre si: um deles tendo como referência os ramos de *Molgolaimus demani* e *Prodesmodora* spp. e o outro pelos demais desmodorídeos (Figura 1). Apesar da coesão genética de Desmodoridae, as análises de máxima parcimônia (Figura 2) e de inferência Bayesiana (Figura 3) indicaram que a família é polifilética. Segundo Meldal *et al* (2007) e Holterman *et al.* (2008) Desmodoridae é monofilético, mesmo demonstrando que representantes da família parecem não serem descendentes do ramo ancestral e comum de Desmodoridae. Por outro lado, Megen *et al.* (2009) indicaram que Desmodoridae é polifilético devido ao posicionamento de *Spirinia elongata* e *Prodesmodora* spp. Assim, os dados aqui obtidos reforçaram a hipótese de polifilia (Figuras 2 e 3), uma vez que o clado *Molgolaimus demani* + *Calomicrolaimus* sp. e *Prodesmodora* spp. formaram um grupo monofilético e irmão aos demais desmodorídeos. Tais espécies já compuseram outrora a família Molgolaimidae (Molgolaiminae *strictu sensu*; Ditlevsen, 1921; Micoletzky 1923). A análise de máxima parcimônia feita a partir de dados morfológicos mostrou Desmodoridae como monofilético diante do grupo externo hipotético.

### 6.2 Status taxonômico e filogenético de *Molgolaimus demani* (Molgolaiminae) e *Prodesmodora* spp. (Prodesmodorinae).

Segundo todas as análises moleculares aqui desenvolvidas (Figuras 1-3), *Molgolaimus demani* se mostrou como uma linhagem genético-evolutiva grupo irmã de *Calomicrolaimus* sp. (Microlaimidae). Tal evidência corrobora a hipótese de maior relação entre os dois táxons, previamente indicada por filogenia molecular (Meldal *et al.* 2007) e similaridade morfológica (Ditlevsen 1921). Por meio dos morfológicos (Figura 4) o gênero *Molgolaimus* se mostrou grupo irmão dos demais desmodorídeos. Assim, os dados aqui obtidos sugerem que *Molgolaimus demani* parece ter mais relação com Microlaimidae do que com Desmodoridae, fato que contraria Jensen (1978). Assim, devido à descontinuidade entre representantes de Microlaimidae e Desmodoroidea, com referência às evidências da literatura e com o suporte das análises aqui desenvolvidas, sugere-se uma revisão mais pormenorizada de *Molgolaimus demani*, a fim de melhor compreensão do seu *status* taxonômico e evolutivo.

*Prodesmodora* spp. formaram uma unidade genética coesa (Figura 1). Entretanto, pelas análises de máxima parcimônia (Figura 2) e inferência Bayesiana (Figura 3), este gênero se mostrou polifilético, uma vez que os seus caracteres moleculares apresentaram-se oriundos de diferentes ramos ancestrais, reforçando a hipótese demonstrada por Megen *et al.* (2009). Nas análises de Holterman *et al.* (2008) e de Megen *et al.* (2009) *Prodesmodora* spp. também se agrupou fora do clado formado por espécies de Desmodoridae. *Prodesmodora circulata* foi primeiramente classificada como um *Microlaimus fluvialis* (Microlaimidae) (Cobb 1914), atestando a possível maior relação entre *Prodesmodora* e Microlaimidae. Na análise de máxima parcimônia a partir de dados morfológicos, *Prodesmodora* se mostrou com grupo irmão dos demais desmodorídeos, e mais próximo evolutivamente de *Molgolaimus*, cuja relação com Microlaimidae é igualmente bem demonstrada acima. A associação de tais evidências sugere, portanto, que *Prodesmodora* spp. Aqui estudadas como não pertencentes à Desmodoridae.

### 6.3 Monofilia de Stilbonematinae.

As análises moleculares aqui desenvolvidas indicam Stilbonematinae ser tanto descontínua em termos de similaridade genética (Figura 1), assim como parafilética sob o ponto de vista filogenético pela análise de máxima parcimônia e polifilético pela análise de inferência Bayesiana (Figuras 2 e 3). Stilbonematinae se mostrou polifilética devido à posição de *Robbea hypermnestra*, *Eubostrichus topiarius* e *E. parasitiferus*. Tal evidência reforçou os dados apresentados por Holterman *et al.* (2008), segundo a sua análise de inferência Bayesiana. Assim como nas análises de Meldal *et al.* (2007), *Robbea hypermnestra* ficou mais próxima evolutivamente de *Spirinia parasitifera* do que qualquer outro membro de Stilbonematinae. A análise filogenética (MP) por meio dos dados morfológicos apresentou Stilbonematinae como monofilético. Tal evidência apóia os resultados previamente disponibilizados por Kampfer *et al.* (1998), Bayer *et al.* (2009) e Megen *et al.* (2009) de que Stilbonematinae é um grupo monofilético.

Stilbonematinae tem se mostrado como um grupo monofilético, tendo em vista uma combinação de caracteres morfológicos, citológicos e ecológicos (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1995). Sendo assim, tendo em vista que um dos principais objetivos da sistemática filogenética é a identificação de grupos monofiléticos (Hennig, 1966), e perante todo o conjunto de evidência angariadas da literatura, bem como aqueles aqui obtidos, o status de monofilia de Stilbonematinae mostra-se como o mais parcimonioso. Cabe reforçar que ignorar a hipótese da monofilia de Stilbonematinae, demandaria refutar o diversos ramos

evolutivos que compreenderam o atual arranjo de Stilbonematinae, além da necessidade de ocorrência de 6 passos mutacionais (suporte de Bremer; Figura 2) para a desarticulação desse grupo monofilético, segundo a topologia de máxima parcimônia perante os dados moleculares (Figura 2). Tais eventos certamente exigiriam um número muito maior de passos do que aqueles destinados à exclusão *Robbea hypermnestra*, *Eubostrichus topiarius* e *E. parasitiferus* do clado de Stilbonematinae *sensu lato*.

O gênero *Robbea* se mostrou polifilético, tendo em vista a divisão filogenética interna de Stilbonematinae, em ambas as análises filogenéticas, assim como demonstrado por Bayer *et al.* (2009). Platt & Zhong (1998) sugeriram uma sinonímia de *Robbea* e *Catanema*, com base em dados morfológicos. Perante a filogenia morfológica aqui obtida, o gênero *Robbea* compreende a subfamília Stilbonematinae. Assim, devido à controvérsia acerca to *status* taxonômico e evolutivo deste táxon, não serão discutidos os pormenores das inconsistências observadas, mas sugere-se uma profunda revisão taxonômica do gênero.

#### **6.4 Status taxonômico e filogenético de *Spirinia* e de *Metachromadora* (Spiriniinae).**

Segundo todas as análises aqui desenvolvidas o gênero *Spirinia* se mostrou como um ramo genético coeso e monofilético (Figura 1 e 2), o mesmo sendo observado para a espécie *S. elongata*. Este táxon se mostrou como uma linhagem genética distinta, porém genealogicamente e filogeneticamente irmã à *S. parasitifera*. Os resultados aqui apresentados mostraram que apesar das diferenças sutis entre *S. parasitifera* e *S. elongata* (Castro *et al.* 2006), estas espécies parecem constituir-se como espécies distintas. Evidências adicionais de estatística de árvores corroboram essa hipótese tendo em vista que os valores obtidos para os índices de bootstrap, jackknife, suporte de Bremer e probabilidades posteriores se mostraram de satisfatórios a muito bons (Figuras 2).

O gênero *Metachromadora* se apresentou como um táxon monofilético e como uma unidade genética particular em todas as análises. Tal resultado corrobora os resultados previamente providos por Holterman *et al.* (2008) e Bayer *et al.* (2009). Dessa forma, os resultados aqui obtidos, bem como o confronto destes com a literatura sugerem que *Metachromadora* sp. 1 e *Metachromadora* sp. 2 sejam classificados como *M. remanei*. Tal sugestão permitirá que o banco de sequências 18S de Nematoda do NCBI possa ser incrementado sob o ponto de vista da associação de tais sequências a uma designação no nível específico, sustentado por suportes de bootstrap, jackknife e probabilidades posteriores.

Os gêneros *Spirinia* e *Metachromadora* se mostraram, segundo os dados aqui obtidos, distantes tanto em termos evolutivos quanto em termos genealógicos (Figuras 1-4). Porém, segundo a sua similaridade morfológica, tais táxons são reconhecidos como membros da subfamília Spiriniinae (Lorenzen 1994). Tal descontinuidade sugere que os dois gêneros devam ser re-classificados como membros de subfamílias diferentes, sustentando *Spirinia* como o gênero tipo de Spiriniinae e *Metachromadora* como membro de outra subfamília.

#### **6.5 Status taxonômico e filogenético de *Desmodora* e *Acanthopharynx* (Desmodorinae).**

Segundo a análise de máxima parcimônia com dados moleculares e de inferência Bayesiana, o gênero *Desmodora* se mostrou parafilético, devido à maior relação genético-evolutiva de *D. communis* com as duas espécies do gênero *Acanthopharynx*, corroborando os resultados de Meldal *et al.* (2007) e Holterman *et al.* (2008). *D. communis* é a espécie tipo de *Desmodora*, e espécies de *Acanthopharynx* são morfológicamente muito semelhantes à espécies de *Desmodora*, a exceção do alongamento do bulbo faríngeo (Decraemer & Smol, 2006).

*Croconema ovigera* e *D. pontica* são grupos irmãos em ambas as análises e mais próximas entre si geneticamente do que com *D. communis*. A espécie *Croconema ovigera* foi reclassificado como *Croconema ovigera*, com base em taxonomia tradicional, na revisão do gênero *Desmodora*, entretanto *Desmodora (Pseudochormadora) pontica* permaneceu como *Desmodora* (Vershelde *et al.* 2006). Por sua vez, os resultados aqui apresentados sugerem então que *D. pontica* seja revisado, uma vez que este se mostrou mais próximo genético-evolutivamente (com valores de suporte de ramos bem satisfatórios) de *D. ovigera* (*syn. Croconema ovigera*) do que de *D. communis* (Figuras 1-3). Considerando a filogenia obtida à partir dos caracteres morfológicos (Figura 4), *Desmodora* se mostrou uma linhagem politômica. Tendo em vista que a indicação *Desmodora*, *Desmodora 2* e *Desmodora 3* foi devido a uma grande variação na forma dos anfídeos, o arranjo politômico sugere a linhagem com uma acentuado polimorfismo dos anfídeos, respondendo assim negativamente para um critério de ancestralidade e derivação, segundo a parcimônia.

De acordo com Vershelde *et al.* (1998) *Desmodorella* pode se distinguir de *Desmodora* devido a presença de fileiras de espinhos longitudinais na cutícula (ala lateral), o que não é sinapomorfia de *Desmodorella*. Verchelde *et al.* (1998) também ressaltou que *Desmodora* podia se distinguir de *Croconema* pela combinação dos seguintes caracteres: anelações da cutícula mais finas sem ornamentações, setas somáticas finas, cápsula cefálica

sem ou com poucas setas subcefálicas, cauda longa e cônica. Entretanto, na presente análise (Figura 4), dessas características apenas a presença de ornamentações e de setas subcefálicas foram levadas em consideração (Tabela 2), pois os demais estados de caracteres apontados como diferenças entre *Desmodora* e *Croconema*, variam entre espécies de um mesmo gênero.

Assim, os resultados providos na figura 4 sugerem duas hipóteses para o entendimento do status taxonômico, a relação filogenética entre os gêneros *Desmodorella* e *Desmodora*, e a solidez de alguns caracteres morfológicos na diferenciação de gêneros. A primeira seria que a “ala lateral” pode não ter sinal filogenético suficiente para diferenciar os gêneros entre si. Já a segunda hipótese implicaria em que as espécies de *Desmodora* que apresentam a “fovea anfideal multiespiral” sejam reclassificados como *Desmodorella*. Assim, a principal diferença entre os dois táxons seria a forma da fôvea anfideal.

#### **6.6 Posicionamento filogenético de *Xyzzors* sp.**

O gênero *Xyzzors* apresenta taxonomia bem controversa. Este táxon foi primeiramente classificado como um desmodorideo (Inglis 1963). Posteriormente, o mesmo foi indicado como componente de Cyatolaiminae (De Coninck 1965; Lorenzen 1994). Por outro lado, nas análises genealógicas e de sistemática molecular aqui desenvolvidas indicam *Xyzzors* sp. como os representantes de Desmodoridae. Essa evidência corrobora a hipótese de Meldal *et al.* (2007) e Decraemer & Smol (2006). Assim, os dados aqui obtidos apóiam a primeira classificação de Inglis, 1963 (*op. cit.*). Cabe ressaltar os suportes estatísticos observados nas topologias obtidas, como evidências aditiva na possível maior verossimilhança da hipótese aqui sustentada.

#### **6.7 Resolução da monoflia das subfamílias pela filogenia morfológica**

Das seis subfamílias de Desmodoridae, apenas três podem ser ditas como monofiléticas, Stilbonematinae, Molgolaiminae e Prodesmodorinae.

Stilbonematinae se mostrou como um grupo monofilético, porém as relações internas nesta subfamília ainda se mostraram controversas.

Devido à natureza monogenérica de Molgolaiminae e Prodesmodorinae, apenas podemos confirmar a monofilia destas, uma vez que foram utilizadas apenas as características dos gêneros, sem levar em consideração as variações interespecíficas. Entretanto, *Pseudonchus* se agupou numa politomia com os demais membros de Desmodoridae, então não podemos confirmar a monofilia de Pseudonchinae. Spiriniinae e Desmodorinae também não tiveram uma resolução monofilética.

Cabe comentar que tais estados de caracteres são todos aqueles previamente utilizados por Lorenzen (1994), a fim de sistematizar feneticamente a biodiversidade daquilo que se conhece com Desmodoridae. Assim, os resultados do presente estudo, acerca das relações absolutamente controversas entre as subfamílias Spiriniinae e Desmodorinae (Lorenzen, 1994; *strictu sensu*) sugerem a necessidade de uma revisão sobre o sinal filogenético dos caracteres utilizados na taxonomia e classificação dos táxons dessas duas subfamílias. Além disso, as diagnoses antigas dos gêneros dessas subfamílias devem passar por uma revisão, pois algumas podem estar incompletas, por falta de acuidade da tecnológica da época.

De forma acessória e consolidando a proposta de iluminação recíproca do presente estudo, as evidências moleculares aqui obtidas, associadas àquelas de análises prévias sustentam a monofilia de Molgolaiminae, Prodesmodorinae, e Stilbonematinae. Além disso, a presente iniciativa reforça sobremaneira o princípio da integração das informações biológicas, focadas na melhor compreensão de tão diversificada biodiversidade, tal e qual aquela dos nematódeos de vida livre.

## 7. CONCLUSÃO

- As análises indicaram que Desmodoridae é uma família polifilética.
- A partir dos dados morfológicos, Stilbonematinae, Molgolaiminae e Prodesmodorinae se mostraram monofiléticas.
- Molgolaiminae e Prodesmodorinae apresentam íntima relação filogenética e devem pertencer ao mesmo grupo taxonômico e grupo irmão dos demais desmodorídeos.
- *Molgolaimus demani* não pertence à família Desmodoridae, mas a um grupo irmão.
- *Prodesmodora* é parafilética e grupo irmão de *Molgolaimus demani*.
- *Spirinia* é um táxon monofilético, e *S. elongata* é um táxon distinto e irmão de *S. parasitifera*.
- *Metachromadora* é monofilético, porém não pertencente a subfamília Spiriniinae.
- *Acanthopharynx* é monofilético e táxon irmão de *Desmodora*.
- *Desmodora pontica* é um táxon irmão de *Croconema ovigera* e deve ser revisado quanto a sua classificação taxonômica.
- *Robbea* é um táxon polifilético e deve ser reavaliado quanto a sua validade taxonômica.
- *R. hypermnestra* não faz parte da subfamília Stilbonematinae e deve ser revisado quanto sua natureza taxonômica;

- *Eubostrichus* é um grupo polifilético, e além disso *E. topiarius* e *E. parasitiferus* não fazem parte de Stilbonematinae.
- *Xyzzors* sp. pertence a família Desmodoridae.
- A filogenia baseada em 18S se mostrou mais eficaz no entendimento das relações internas da família Desmodoridae do que a filogenia baseada em caracteres morfológicos, à exceção de Stilbonematinae.
- A compreensão da evolução dos caracteres morfológicos se faz muito necessária e, portanto assim, reconhecer quais destes apresentam sinal filogenético.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, D. S. 2002. Fundamentos de Sistemática Filogenética. Holos Editora, Ribeirão Preto, 147-148;

Bauer-Nebelsick, M.; Blumer, M.; Urbancik, W. & Ott, J. A. 1995. The glandular sensory organ of Desmodoridae (Nematoda) – ultrastructure and phylogenetic implications. *Invertebrate Biology*, 114(3), 211-219;

Bayer, C.; Heindl, N.; Rinke, C.; Lückner, S.; Ott, J. A. & Bulgheresi, S. 2009. Molecular characterization of the symbionts associated with marine nematodes of the genus *Robbea*. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 136- 144;

Blaxter, M. L.; De Ley, P.; Garey, J. R.; Liu, L. X.; Scheldeman, P.; Vierstraete, A.; Vanfleteren, J. R.; Mackey, L. Y.; Dorris, M.; Frisse, L. M.; Vida, J. T. & Thomas. W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75;

Blaxter, M. L. 2001. Molecular analysis of nematode evolution. *CAB International Parasitic nematodes*, Cap. 1, 1-24;

Blaxter, M. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Phil. Trans. Royal Society of London B.*, 359, 669- 679;

Bhadury, P.; Austen, M. C.; Bilton, T.; Lamshead, P. J. D. & Rogers, A. D. 2005. Combined morphological and molecular analysis of individual nematodes through short-term preservation in formalin. *Molecular Ecology Notes*, 5, 965 -968;

Bremer, Kåre. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10, 295–304;

Calendini, F. & Martin, J. F. 2005. PaupUP v1.0.3.1. A free graphical frontend for Paup\* Dos software;

Castro, F. J. V.; Bezerra, T. N. C.; Silva, M. C. & Fonseca-Genevois, V. 2006. *Spirinia elongata*, sp. nov. (Nematoda, Desmodoridae) from Pina Basin, Pernambuco, Brazil. *Zootaxa*, 1121, 53-68;

Chitwood B. G. & M.B. Chitwood, 1950. An Introduction to Nematology (second ed.). Monumental Printing Company, Baltimore, MD. 372 pp;

Cobb, N. A. 1914. Citrus-root nematode. *Journal of Agriculture Res.*, 2, 217- 230;

Consortium for Barcode of Life – WWW.barcoding.si.edu;

Decraemer, W. & Smol, N. 2006. Orders Chromadorida, Desmodorida and Desmoscolecida In *Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*, 17, 497-573;

De Coninck, L. A. 1965. Classe des Nematodes-Systematique des Nematodes et sous-classe des Adenophores. *Traite de Zoologie* (ed. Grasse), 4(2), 586–681;

De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisés dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. *Meded. Rjksfakulteit Landbouwwetenschappen Gent*, 34, 351-369;

De Ley, P.; Félix, M. A.; Frisse, L. M.; Nadler, S. A.; Sternberg, P. W. & Thomas, W. K. 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1, 519–612;

De Ley, P. & Blaxter M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. *In*: D.L. Lee (ed.) *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London, 1-30;

De Ley, P.; De Ley, I. T; Morris, K.; Abebe, E.; Mundo-Ocampo, M.; Yoder, M.; Heras, J.; Waumann, D.; Rocha-Olivares, A.; Burr, A. H. J.; Baldwin, J. G. & Thomas, W. K. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchers of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1945–1958;

De Ley, P.; Decraemer, W. & Eyualet-Abebe. 2006. Introduction: Summary of Present Knowledge and Research Addressing the Ecology and Taxonomy of Freshwater Nematodes. *In*: Eyualet-Abebe, Traunspurger, W. & Andr  ssy, I. (eds) *Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy* (pp. 3-30). CABI Publishing, UK;

Ditlevsen, H. 1921. Marine free-living nematodes from the Auckland and Campbell Islands. (Papers from Dr. Th.. Mortensen's Pacific Expedition 1914-16. III) - Vid. Medd. dansk naturhist. Foren., 73, 1-32, Kobenhaven;

Dorris, M.; De Ley, P. & Blaxter, M. 1999. Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. *Parasitology Today*, 15(5), 188-193;

Eyualet, A. & Blaxter, M. 2003. Comparison of Biological, Molecular, and Morphological Methods of Species Identification in a Set of Cultured *Panagrolaimus* Isolates. *Journal of Nematology*, 35(1), 119-128;

Eyualet-Abebe, Traunspurger, W. & Andr  ssy, I. 2006. Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy. *CABI Publishing*. 752pp;

Ferri, E.; Barbuto, M.; Bain, O.; Uni, S.; Guerrero, R.; Fert  , H.; Bandi, C.; Martin, C. & Casiraghi, M. 2008. Integrated taxonomy: tradicional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6:1;

Ferris, V. R. 1983. Phylogeny, historical biogeography, and the species concept in soil nematodes. 143–161, In A. R. Stone, H. M. Platt, and L. F. Khalil, eds. Concepts in nematode systematics. London: Academic Press;

Fitch, W. M. 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.*, 111, 223- 257;

Floyd, R.; Abebe, E.; Papert, A. & Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11, 839-850;

Foucher, A. M.; Bongers, T.; Noble, L. & Wilson, M. 2004. Assessment of nematodes biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 2027-2032;

Foucher, A. & Wilson, M. 2002. Development of a polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis technique to study nematode species biodiversity using the 18s rDNA gene. *Molecular Ecology Notes*, 2, 45–48;

Gray, J. S. & Rieger, R. M. 1971. A quantitative study of the meiofauna of an exposed sand beach at Robin Hood's Bay, Yorkshire. *Journal of Marine Biology Association, UK*, 51, 1-19;

Griffith, R., R. M. Giblin-Davis, P. K. Koshy, & V. K. Sosamma. 2005. Chapter 13. Nematode parasites of coconut and other palms. In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd edition. M. Luc, R. Sikora, and J. Bridge, eds. *CABI Publishing*, 493-527;

Goloboff, P. 1999. NONA (NO NAME) ver. 2 Published by the author, Tucumán, Argentina; Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleotide Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98;

Hall, B. G. 2001. Phylogenetics Trees Made Easy. A How to Manual for Molecular Biologists. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Masssachusetts, 179p;

Hennig, W.1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press. 280pp;

Hillis, D. M.; Pollock, D. D.; McGuire, J. A. & Zwickl, D. J. 2003. Is Sparse Taxon Sampling a Problem for Phylogenetic Inference? *Systematic Biology*, 52(1), 124- 126;

Holterman, M.; Holovachov, O.; van den Elsen, S.; van Megen, H.; Bongers, T.; Bakker, J. & Helder, J. 2008. Small subunit ribosomal DNA-based phylogeny of basal Chromadoria (Nematoda) suggests that transitions from marine to terrestrial habitats (and vice versa) require relatively simple adaptations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 758-763;

Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F.; Nielsen, R. & Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310–2314;

Inglis, W. G. 1963. New marine nematodes from off the coast of South Africa. *Bullet. Brit. Museum natural History (Zoology)*, 10 (9), 529-552;

Jensen, P. 1978. Revision of Microlaimidae, Erection of Molgolaimidae fam. n., and Remarks on the Systematics Position of *Paramicrolaimus* (Nematoda, Desmodorida). *Zoologica Scripta*, 7, 159–173;

Kampfer, S., Sturmbauer, C. & Ott, J. 1998. Phylogenetic analysis of rDNA sequences from adenophorean nematodes and implications for the Adenophorea-Secernentea controversy. *Invertebrate Biology*, 117, 29-36;

Kaplan, D. T., W. K. Thomas, L. M. Frisse, J. L. Sarah, J. M. Stanton, P. R. Speijer, D. H. Marin, & C. H. Opperman. 2000. Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus sinilis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif. *Journal of Nematology*, 32, 132–142;

Lanzone, C.; Ojeda, R. A. & Gallardo, M. H. 2006. Integrative taxonomy, systematics and distribution of the genus *Eligmodontia* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) in the temperate Monte Deserto of Argentina. *Mammalian Biology*, 72(5), 299- 312;

Lorenzen, S. 1994 *Phylogenetic Systematics of Freelifving Nematodes*. Ray Society, London, 383p;

van Megen, H.; van den Elsen, S.; Holterman, M.; Karssen, G.; Mooyman, P.; Bongers, T.; Holovachov, O.; Bakker, J.; Helder, J. 2009. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 11(6), 927-950(24);

Meldal, B. H. M.; Debenham, N. J.; De Ley, P.; De Ley, I. T.; Vanfleteren, J. R.; Vierstraete, A. R.; Bert, W.; Borgonie, G.; Moens, T.; Tyler, P. A.; Austen, M. C.; Blaxter, M. L.; Rogers A. D. & Lamshead, P. J. D. 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 622-636;

Micoletzky H. 1922. Die freilebenden Erd- Nematoden mit beson derer Berücksichtigung der Steiermark und der Bukowina, zugleichmit einer Revision sämtlicher nicht mariner, freilebender Nematoden in Form von Genus-Beschreibungen und Bestimmungsschlüsseln. *Archiv für Naturgeschichte*, 87, 1–650;

National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
Acessado em 28/05/2007;

Neres, P.; Fonsêca-Genevois, V.; Torres, R. A.; Cavalcanti, M. F.; de Castro, F. J.; da Silva, N. R.; Rieger, T. T. & Decraemer, W. 2010. Morphological and molecular taxonomy of a new *Daptonema* (Nematoda, Xyalidae) with comments on the systematics of some related taxa. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 158, 1–15;

Nguyen, Dang-Minh-Chanh; Nguyen, Van-Nam; Seo, Dong-Jun; Park, Ro-Dong & Jung, Woo-Jin. 2009. Nematicidal activity of compounds extracted from medicinal plants against the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 11(6), 835-845(11);

Nixon, K. C. 1999-2002. WinClada ver. 1.0000 Published by the author, Ithaca, NY, USA;

Oliveira, C. M. G.; Hübschen, J.; Brown, D. J. F.; Ferraz, L. C. C. B.; Wright, F. & Neilson, R. 2004. Phylogenetic relationship among Xiphinema and Xiphidorus nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA sequence. *Journal of Nematology*, 36, 153- 149;

- Padial, J. M. & Riva, I. L. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 97-122;
- Platt, H. M. & Warwick, R. M. 1983. Free-living marine nematodes. Part I: British Enoplids. Synopsis of the British fauna (New series) n° 28. Cambridge, Cambridge University Press, 307p;
- Platt, H. M. & Warwick, R. M. 1988. *Free-living marine nematodes. Part II: British Chromadorids*. Synopsis of the British fauna (New series) n° 38, E. J. Brill, Leiden. 502p.
- Platt, H. M. & Zhang, Z. M. 1982. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist./Zool.*, 42(4), 227- 246;
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model DNA substitution. *Bioinformatics applications note*, 14(9), 817-818;
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 367-83;
- Powers, T. O. & Harris, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major Meloidogyne species. *Journal of Nematology*, 25, 1-6;
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574;
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology*, 4, 406- 425;
- Sommer, R. J., L. K. Carta, S-Y. Kim, & P. Sternberg. 1996. Morphological, genetic, and molecular description of *Pristionchus pacificus* sp. n. (Nematoda: Neodiplogasteridae). *Fundamental and Applied Nematology*, 19, 511- 521;
- Sorenson, M. D. & Franzosa, E. A. 2007. TreeRot, version 3. Boston University, Boston, MA;

Swofford, D. L. 2000. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b4a. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts;

Traunspurger, W. 2002 Nematoda. In: Rundle, S.D., Robertson, A.L. and Schmid-Araya, J.M. In: (eds) *Freshwater Meiofauna. Biology and Ecology*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp.63-104;

Verschelde, D., Goubault, N. & Vincx, M. 1998. Revision of *Desmodora* with descriptions of new desmodorids (Nematoda) from hydrothermal vents of the Pacific. *Journal of Marine Biology*, 78, 75-112;

Verschelde, D., Nicholas, W. & Vincx, M. 2006. A review of the genera *Croconema* Cobb, 1920 and *Pseudochromadora* Daday, 1899 (Nematoda, Desmodoroidea): new species from the Coast of Kenya and Australia. *Hydrobiology*, 571, 17-40;

Waite, I.; O'Donnell, A. G.; Harrison, A.; Davies, J. T.; Colvan, S. R.; Ekschmitt, K.; Dogan, H.; Wolters, V.; Borgers, T.; Bongers, M.; Bakonyi, G.; Nagy, P.; Paptheodorous, E. M.; Stamou, G. P. & Boström, S. 2003. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 1165-1173;

Warwick, R. M.; Platt, H. M. & Somerfield, P. J. 1998. Free-living marine nematodes. Part III: British Monhysterids. Synopsis of the British fauna (New series) n° 53. Shrewsbury, Field Studies Council. 296p.