Cláudia Tangerino Olivares

Diversidade filogenética de *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Onchoproteocephalidea)

São Paulo
2014

Cláudia Tangerino Olivares

Diversidade filogenética de *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Onchoproteocephalidea)

Phylogenetic diversity of *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Onchoproteocephalidea)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Zoologia.

Orientador: Fernando Portella de Luna Marques

São Paulo
2014

Olivares, Cláudia Tangerino
Diversidade filogenética de *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Onchoproteocephalidea).
x + 99p
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. *Potamotrygonocestus*
2. Sistemática
3. Otimização direta

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr.
Nome

Prof. Dr.
Nome

Prof. Dr.
Fernando Portella de Luna Marques

Aos meus pais, com carinho

Interessa-me, entretanto, conhecer o verso, o problema e a lenda, pois são produções que nobilitam o homem e podem trazer consolo ao aflito, ensinamento ao leigo e advertência ao poderoso

Malba Tahan, 1938

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família. À minha mãe Elisabete Tangerino Olivares e meu pai Wanderley Martins Olivares por todo carinho, apoio moral e paciência. Não apenas durante meus estudos na Pós-Graduação, mas por toda minha vida, apoiando minhas escolhas e compreendendo meus problemas. Agradeço também ao meu irmão Caio César Tangerino Olivares por estar presente em todas as etapas da minha vida. Agradeço aos meus avós, porque apesar da simplicidade e humildade, puderam transmitir sua sabedoria que me auxiliou muito nos momentos mais difíceis; e minha avó Celestina, que não teve a oportunidade de ver algum neto formado, mas que com seu amor e paciência me ajudou a ser quem eu sou hoje.

Aos amigos que me trazem momentos de alegria, mesmo quando parece só haver tristeza, Jairo Lima, Beatriz Freire, Paulo Kuchembuck, Guilherme Gatti, Estela Brandi, Jefferson Oliveira, Gabriella Malheiros, Gustavo, Michelle Neves, Ariane Alves, Liv Ascer, Jonas Mindrisz, Ligia Kobayashi, Sabrina Baroni, Maíra Consistré, Renata Amaro, Lilian Matos, Manoel Antunes, Denis Machado, e Fabio, o menino que sempre andava com a gente; obrigada. Obrigada por me ouvirem, obrigada pelos conselhos, obrigada pelas risadas. Obrigada Edu Solà, Marta Álvarez e Eva Lázaro por me apresentarem a lugares fantásticos, que jamais me esquecerei. Obrigada George Martin e Douglas Adams pelo companheirismo nos momentos de solidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Portella de Luna Marques, que me ensinou muito e tem me ajudado a superar etapas importantes da minha vida acadêmica e científica, muito obrigada.

Agradecer imensamente à Dra Sabrina Baroni, técnica do Laboratório de Sistemática Molecular (LSM), por tudo que me ensinou desde a iniciação científica. Seus ensinamentos foram desde técnicas laboratoriais a teóricas, todas necessárias à execução do meu projeto de Mestrado. Por tudo isso minha consideração.

A Denis Jacob Machado que, além de um grande amigo, tem me ajudado muito a entender várias metodologias filogenéticas e tem tido paciência de me ensinar diversos assuntos relacionados à informática.

Aos outros técnicos do LSM; Beatriz Vieira Freire, pela grande amizade provinda de anos de convivência e também pelo grande auxílio na preparação de sequências nucleotídicas; e Manoel Antunes Júnior, pela amizade e pela assistência na parte laboratorial e em vários assuntos burocráticos.

Às minhas colegas de laboratório, Bruna Trevisan e Anna Carolina Kobayashi, na época técnicas nível TT3 e TT1 da Fapesp respectivamente, por me ajudarem a triar materiais e montar lâminas de *vouchers*. Também a Juliana Primon (ex-TT1 da Fapesp) pela organização de tabelas de coletas e de fotos de hospedeiros e parasitas. A Murilo Rodrigues, Iniciação Científica, pela ajuda na triagem de parasitas e pelas risadas.

A Thiago Loboda, doutorando do Departamento de Zoologia, pela ajuda na identificação de hospedeiros da região do Rio Salobra. A Pedro Dias, também doutorando da Zoologia, pela ajuda na utilização no programa MorphoJ. A Paulo Kuchembuck, Beatriz Freire e Jairo Lima, grandes amigos, pelas correções no texto.

À Luci Deise Navarro, técnica do laboratório de Bioquímica, responsável por sequenciar todas as minhas amostras. O agradecimento é especial pela sua eficiência e por sempre estar apta a ajudar-nos nos momentos mais difíceis e urgentes. Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan, professor da Universidade Federal de Manaus, pelo material enviado do Rio Solimões.

Ao Tomáš Scholz, Diretor do Institute of Parasitology, České Budějovice, pelo empréstimo de tecidos destinados ao grupo externo da análise. A Tjard Bergmann da University of Veterinary Medicine Hannover pela ajuda na utilização do programa CAOS.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo e Pesquisa (Fapesp), pela bolsa oferecida e pelo auxílio financeiro para a elaboração do projeto (projetos números 2011/15946-1 e 2011/18947-9, respectivamente).

Sumário

1 Introdução 1
2 Material e métodos 4
2.1 Obtenção de material biológico 4
2.2 Obtenção de dados moleculares 4
2.3 Análises filogenéticas 8
2.4 Obtenção de imagens 11
3 Resultados 11
3.1 Hipótese de trabalho 11
4 Discussão 17
4.1 Histórico taxonômico do gênero: exclusividade de dados morfológicos 17
4.2 Implicações da hipótese filogenética na taxonomia 19
4.3 Biogeografia 48
4.4 Relação Hospedeiro/Parasita 53
5 Conclusão 57
6 Referências 58

Resumo **70**

Abstract **71**

Anexos **72**
1 Material de hospedeiros disponíveis para o estudo 73
2 Material de cestóideos disponíveis para o estudo 78
3 Médias das distâncias fenéticas das matrizes de sequências nucleotídicas de COI e nucleares 89
4 Preparação de lâminas de hologenóforos 93
5 Protocolo otimizado para extração de DNA genômico com DNAdvance ™ . . 94
6 Protocolo otimizado para purificação de DNA genômico com AMPure® kit . . 96
7 Hipótese Filogenética utilizada no estudo 97
8 Árvore de consenso estrito da análise completa em TNT 98
9 Árvore de consenso estrito da análise parcial em TNT 99

Lista de Tabelas

1 Iniciadores 7
2 Custos obtidos na análise de otimização dinâmica 13
3 Sumário de espécies nominais de *Potamotrygonocestus* 18
4 Sumário da relação dos parasitas com seus hospedeiros 56
A.5 Hospedeiros amostrados 73
A.6 Material de exemplares parasitas coletados na América do Sul 78
A.7 Médias das distâncias fenéticas internas por clado 89
A.8 Médias das distâncias fenéticas para a matriz de COI entre clados 90
A.9 Médias das distâncias fenéticas para a matriz de nucleares entre clados 91

Lista de Figuras

1 Representatividade biogeográfica 5
2 Hipótese Filogenética 14
3 Sumário visual dos atributos puros por linhagens 16
4 Relações filogenéticas das diferentes linhagens de *P. fitzgeraldae sensu lato* . . 21
5 Morfologia do gancho de *P. fitzgeraldae sensu stricto* e de espécimes do Clado A2.2. 22
6 Relações haplotípicas das linhagens do Clado A1 24
7 Sobreposição do contorno dos ganchos mediais de *P. fitzgeraldae sensu lato* e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 25
8 Relações haplotípicas das linhagens do Clado A2.2 e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 27
9 Sobreposição da forma dos ganchos mediais do Complexo *P. travassosi* 32
10 Clados do Complexo *P. travassosi* 33
11 Relações haplotípicas das linhagens do Clado B1 39
12 Relações haplotípicas das linhagens do Clado B2 41
13 Relações haplotípicas das linhagens do Clado B3 43
14 Comparação morfológica entre *Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 e outras espécies do Clado B 46
15 Cladograma por áreas amostradas 49
A.16 Hipótese Filogenética com todos haplótipos estudados 97
A.17 Árvore de consenso estrito da análise completa 98
A.18 Árvore de consenso estrito da análise parcial 99

1 Introdução

Diversas disciplinas da Ciência vêm popularizando o uso de dados moleculares. Popularização propiciada pela constante redução de custo e pelo desenvolvimento de protocolos cada vez mais eficientes na obtenção de dados genotípicos. Dentre outros fatores que também contribuem para esta popularização estão: a criação de novas ferramentas analíticas e o acúmulo e disponibilização de dados (*i.e.*, sequências nucleotídicas), os quais possibilitam abordar problemas cada vez mais complexos e interessantes. Desta forma, dados moleculares permeiam a literatura moderna e permitem testar inúmeras hipóteses pertinentes à várias disciplinas da biologia comparada (Hillis *et al.*, 1996; Cracraft & Donoghue, 2004).

Para além das vantagens citadas acima a respeito do uso de dados moleculares, sequências nucleotídicas também são capazes de solucionar impasses criados pela análise de dados meramente morfológicos (Litvaitis & Rohde, 1999). Atualmente, algoritmos e protocolos mais eficientes estão disponíveis ou estão em desenvolvimento para abordar perguntas em diferentes escalas filogenéticas, desde relações de parentesco entre grandes grupos, a estudos populacionais/filogeográficos (Hillis, 1995; Hillis *et al.*, 1996; Cracraft & Donoghue, 2004). Estas técnicas de sistemática molecular também são usadas em várias áreas que afetam diretamente a sociedade moderna; como a saúde; a descoberta de novos vírus (Nichol *et al.*, 1993); a agricultura, na qual os conhecimentos filogenéticos podem otimizar o melhoramento genético em detrimento das técnicas aleatórias mais tradicionais de seleção artificial (Oliver & Mishler, 2000; Cracraft & Donoghue, 2004) e o reconhecimento de espécies invasoras e suas origens (Wang *et al.*, 1999); e por fim a economia, a qual também está relacionada aos outros tópicos citados e ao descobrimento de produtos derivados de táxons próximos, como por exemplo controle biológico e medicamentos (Cracraft & Donoghue, 2004; Brock & Freeze, 1969). Estes exemplos evidenciam que a incorporação de dados moleculares na resolução de vários problemas biológicos tem sido fundamental para o desenvolvimento de nosso conhecimento sobre as entidades naturais deste planeta.

Nas últimas décadas, dados moleculares estão sendo incorporados às metodologias que buscam determinar de forma mais robusta os limites das entidades biológicas que reconhecemos como espécies e, o entendimento, dos processos evolutivos responsáveis por sua origem e diversificação (Sites & Marshall, 2003). O conceito de espécies tem sido alvo de discussões influenciando a biologia moderna desde a publicação das ideias de Darwin em 1859 (Queiroz, 2011). O termo espécie pode ser classificado de duas formas (Hey *et al.*, 2003). Espécies podem ser entendidas como categoria, e portanto possuirem um significado taxonômico, ou seu conceito pode estar associado à uma entidade evolutiva. Porém, muitos autores (*e.g.*, Mayr, 1996; Cracraft, 1989, entre outros) defendem a unificação destas interpretações em um único conceito, ao passo que outros admitem a distinção entre espécies taxonômicas e espécies

como entidades evolutivas. Embora estejamos longe de um conceito universal de espécie, é fato que diversas disciplinas da Biologia (*e.g.*, sistemática, ecologia, etologia, entre inúmeras outras) utilizam esta entidade (ou termo) como unidade fundamental de análise (Queiroz, 1998). Espécies como unidades centrais de evolução, representam entidades evolutivas únicas, derivadas de processos históricos singulares (Mace, 2004). A delimitação de espécies, portanto, tem importância primária em vários estudos que envolvem conhecimento da diversidade biológica em nosso planeta.

Queiroz (1998) listou diversas definições de espécies baseadas em ecologia, evolução, isolamento ou mesmo no conjunto deles. Cracraft (1983) propôs o conceito de espécies filogenéticas, cujas definições estão associadas às estruturas filogenéticas e cladísticas. Baum & Shaw (1995) consideraram que espécies são exclusivas de um grupo de organismos cujos genes coalescem mais recentemente dentro de seu grupo do que entre os membros de outros grupos de organismos. Este foi considerado como "conceito monofilético de espécies". Independente dos diversos conceitos filogenéticos propostos, todas as versões concordam que os critérios de delimitação de espécies devem ter um embasamento filogenético e não reprodutivo (Avise, 2000). Este trabalho, portanto, utilizará o conceito de espécie monofilética associada à diagnose morfológica ou molecular. Este conceito foi selecionado porque é aplicável às ferramentas utilizadas neste estudo e é coerente com a filosofia deste grupo de trabalho.

Um modelo interessante para implementar o uso de dados moleculares na delimitação de espécies é o sistema hospedeiro/parasita. Nesse sistema, é fundamental que as espécies sejam delimitadas de forma precisa para que os processos que regem sua evolução possam ser compreendidos. A sistemática moderna tem utilizado análises de dados moleculares para possibilitar tais delimitações (Sites & Marshall, 2003, 2004). Para Criscione *et al.* (2005), essas ferramentas moleculares, quando utilizadas na identificação de espécies, (*i*) permitem associar formas morfológicas indistinguíveis de larvas ao seu respectivo adulto conhecido, processo importante para compreender a transmissão da doença e, consequentemente, ajudar o diagnóstico clínico; (*ii*) contribuem na elucidação dos ciclos de vida do parasita por associar as espécies hospedeiras intermediárias em relação às larvas do parasita nelas encontradas; e (*iii*) possibilitam a prospecção de espécies crípticas. Ademais, o estudo da evolução molecular de parasitas pode ter aplicações mais práticas, como controle de resistências às drogas (Criscione *et al.*, 2005).

Dentro do contexto acima, este trabalho visa abordar a sistemática molecular de um componente da fauna parasitária das arraias de água doce neotropicais da família Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Myliobatoidei). Estas arraias são os únicos elasmobrânquios endêmicos dos sistemas fluviais da região Neotropical e formam um grupo com mais de 30 espécies inseridas em quatro gêneros (*Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Heliotrygon*) e encontradas nas grandes bacias hidrográficas da América do Sul (Rosa *et*

al., 2010; de Carvalho *et al.*, 2011; de Carvalho & Ragno, 2011; de Carvalho & Lovejoy, 2011). Há um consenso entre os especialistas de que os ancestrais dos potamotrigonídeos eram marinhos, no entanto ainda está em debate qual seria sua origem, rota e o evento de colonização desta linhagem de elasmobrânquios (Brooks *et al.*, 1981; Brooks & Amato, 1992; Marques, 2000; Lovejoy, 1997; Lovejoy *et al.*, 1998; de Carvalho *et al.*, 2004). Independentemente, desses fatores há uma gama diversa de helmintos que habita estes hospedeiros, muito dos quais representam linhagens tipicamente encontradas em elasmobrânquios marinhos (*e.g.*, "Tetraphyllidea" e Trypanorhyncha (Eucestoda) e Monocotylidae (Monogenoidea), entre outras; Caira & Reyda, 2005; Domingues & Marques, 2010; Reyda & Marques, 2011).

Nas últimas décadas, vários estudos documentaram a fauna parasitária dos potamotrigonídeos. Espécies de *Rhinebothroides* foram descritas e revisadas ao longo de três décadas (Brooks *et al.*, 1981; Brooks & Amato, 1992; Marques, 2000; Reyda, 2008; Bueno, 2010), sendo que o estudo mais recente incorporou pela primeira vez dados moleculares na delimitação de espécies do gênero e propôs uma nova hipótese filogenética para suas espécies (Bueno, 2010). Para os representantes de *Rhinebothrium* encontrados em potamotrigonídeos, que até recentemente só se conheciam três espécies (*R. copianulum* Reyda, 2008; *R. paranaensis* Menoret & Ivanov, 2009 e *R. paratrygony* Rego & Dias, 1976), atualmente quatro linhagens foram reconhecidas com base em dados moleculares em conjunção com dados morfológicos (Reyda & Marques, 2011). Para *Acanthobotrium* Blanchard, 1848 – um dos gêneros mais diversificados de oncoproteocefalídeos, com mais de 150 espécies (Campbell & Beveridge, 2002; Ivanov, 2005; Fyler, 2009) –, são reconhecidas cinco linhagens residentes em potamotrigonídeos atualmente (Brooks *et al.*, 1981; Reyda, 2008; Ivanov, 2005; Cardoso, 2010). Recentemente, Machado (2012) propôs uma hipótese filogenética para as linhagens de água doce de *Acanthobothrium* e testou a monofilia das espécies propostas por Cardoso (2010) utilizando dados moleculares. Para *Potamotrygonocestus* Brooks & Thornson, 1976, são reconhecidas onze linhagens com base em dados fenotípicos (Brooks & Thorson, 1976; Brooks *et al.*, 1981; Marques *et al.*, 2003; Luchetti *et al.*, 2008), sendo que quatro delas ainda aguardam descrição formal (Luchetti, 2011). As relações filogenéticas das espécies deste gênero foram esboçadas em dois estudos utilizando dados morfológicos (Brooks, 1992; Marques *et al.*, 2003), mas nenhuma destas hipóteses contempla a diversidade atualmente reconhecida para o gênero. Conclui-se que, apesar dos esforços destes autores em compreender a diversidade da fauna parasitária de potamotrigonídeos, diversas lacunas permanecem em nosso conhecimento impedindo a elucidação dos processos de diversificação desse sistema.

Dentro deste contexto, este trabalho objetivou refinar a sistemática de *Potamotrygonocestus* com a incorporação de dados moleculares na expectativa de promover o conhecimento necessário para compreender melhor a evolução desta fauna de helmintos. Para atingir este objetivo, a análise cladística de sequências nucleotídicas foi utilizada para testar a monofilia

das espécies nominais de *Potamotrygonocestus* e, consequentemente, propôr uma hipótese filogenética para o gênero. A hipótese filogenética baseada em dados moleculares objetiva testar se as espécies reconhecidas fenotipicamente para *Potamotrygonocestus* possuem suporte molecular e ainda indicar a possível existência de novas linhagens que não foram detectadas por caracteres morfológicos. Esta hipótese filogenética também tem como objetivo identificar padrões biogeográficos para as diversas populações do gênero. Assim, o presente estudo apresentará uma hipótese de delimitação de espécies do gênero *Potamotrygonocestus* dentro de um contexto biogeográfico.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção de material biológico

O material utilizado neste estudo é resultado de nove atividades de campo realizadas durante o período de 2007 a 2013 em diversas bacias hidrográficas da América do Sul (Figura 1). Na Bacia Amazônica, sete localidades foram amostradas: Rio Negro, Rio Solimões, Rio Jutaí, Baía do Marajó, Rio Naway, Rio Amazonas e Rio Puinahua. Na Bacia do Prata, duas localidades: Rio Mutum e Rio Salobrinha e na Bacia do Tocantins-Araguaia, uma localidade: Rio Tocantins. A Bacia do Orinoco foi amostrada em cinco localidades: Rio Orinoco, Rio Apure, Delta Amacuro (Tucupita e Pedernales) e no Rio Tomo. As coletas contemplam, ao todo, quatro países sulamericanos: Brasil, Peru, Venezuela e Colômbia (Figura 1).

No total foram amostrados 87 hospedeiros representantes de 18 espécies/morfoespécies putativas de Potamotrygonidae. A representatividade biogeográfica destas amostras incluí as bacias Amazônica e do Prata, assim como o Bacia do Rio Orinoco. Informações mais detalhadas sobre cada hospedeiro amostrado estão disponíveis na Tabela A.5 (Anexos).

Os hospedeiros foram obtidos utilizando redes, espinhéis ou arpões. Após as coletas, eles foram eutanasiados e seus intestinos foram removidos. Foi feita uma incisão longitudinal para expôr os septos intestinais sobre os quais se fixam os parasitas, facilitando a visualização e entrada do fixador no tecido dos parasitas. Em seguida, os intestinos foram fixados em etanol 90-100%, mantidos sob refrigeração e examinados sob estereomicroscópio em laboratório para a remoção dos helmintos. Após a triagem, os indivíduos foram separados e estocados sob refrigeração (-20°C) em etanol absoluto.

2.2 Obtenção de dados moleculares

Este estudo contempla múltiplos haplótipos de cada morfotipo parasita encontrado, buscando representar o máximo de número de hospedeiros para cada localidade. A escolha destes

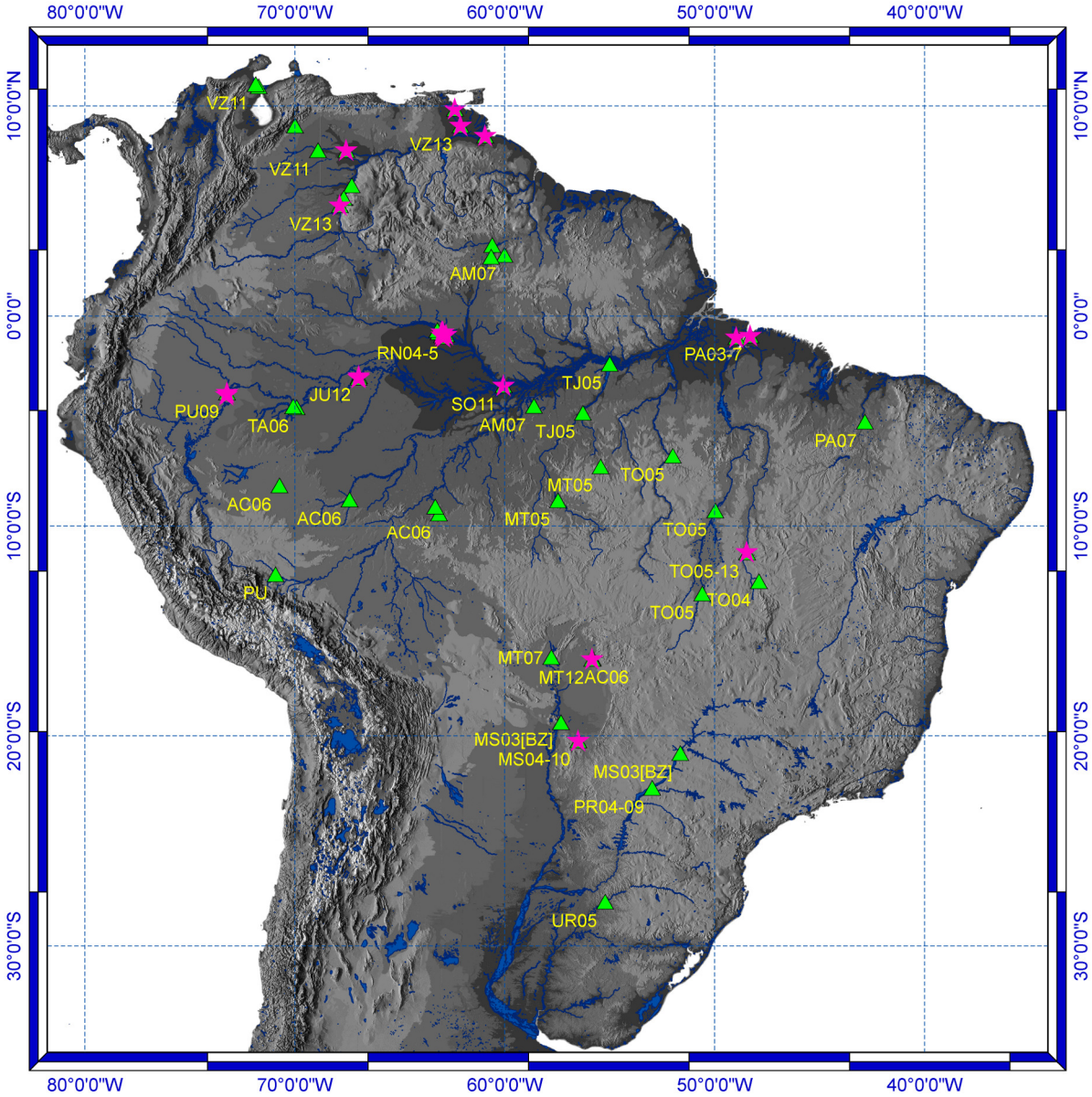


Figura 1: Representatividade biogeográfica. Triângulos verdes indicam localidades amostradas para parasitas de Potamotrygonidae. Estrelas lilás representam localidades para as quais foram obtidos exemplares de *Potamotrygonocestus* destinados aos estudos de sistemática molecular. Informações detalhadas sobre as localidades exibidas no mapa podem ser encontradas em `http://tapewormdb.uconn.edu/index.php/parasites/species_search/` utilizando como busca os códigos de coletas (*e.g.*, VZ11, por exemplo) em texto amarelo.

representantes tem base na diversidade morfológica de membros de *Potamotrygonocestus* encontrados em cada um dos hospedeiros examinados. Todas as sequências foram obtidas de hologenóforos (sensu Pleijel *et al.*, 2008) e o material testemunho (*i.e.*, escólex e proglótide terminal), associado aos dados moleculares (*vouchers*), foram montados em lâminas permanentes de acordo com Olson *et al.* (2010). As lâminas permanentes estão depositadas na coleção helmintológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, números de tombos na Tabela A.6 (Anexos).

Amostras de DNA genômico foram extraídas a partir dos espécimes fixados em etanol 90-100% e as extrações realizadas utilizando o kit de extração da DNAdvance™ (AGENCOURT® Inc.) segundo recomendações do fabricante. Após a extração, fragmentos genômicos foram amplificados por "*Polimerase Chain Reaction*" (PCR) utilizando termociclador Touchgene Gradient (Techne, Inc). Os fragmentos genômicos amostrados representam regiões dos genes nucleares 28S rDNA, região D1-D3, ITS I rDNA e Calmodulina e do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Dados sobre os iniciadores (*i.e.*, *primers*) utilizados para obter sequências nucleotídicas destas regiões estão detalhados na Tabela 1.

Os ciclos do termociclador incluíram denaturação inicial por 3min a 98°C, seguido por 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s de 50-60°C e 30-60s a 72°C e a extenção final a 72°C por 3min. As temperaturas específicas de hibridização foram: 55°C para 28S rDNA, 55°C para ITS rDNA, 55-49°C para Calmodulina ("*touchdown*", segundo Audzijonyte & Vrijenhoek, 2010) e 50°C para COI. O volume final de cada reação de PCR foi de 20 µL, contendo 0,2 µL Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, 4,0 µL de Phusion® HF Buffer, 1,0 µL de ambos iniciadores, 2,0 µL dNTP, 0,6 µL de MgCl, em alguns casos especifícos adicionou-se 0,6 µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 1-5 µL de extração e água deionizada completando o volume final.

Os produtos amplificados foram purificados com AMPURE® (AGENCOURT® Inc.), seguindo o protocolo do fabricante. A qualificação e quantificação destas etapas, *i.e.*, extração, amplificação e purificação, foram efetuadas por eletroforese em gel de agarose 2% empregando-se GelRed™ Nucleic Acid Stein (Biotum) e, quando pertinente, por espectofotômetria em um Thermo Scientific NanoDrop 2000. Finalmente, as reações de sequenciamento foram realizadas com Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems®) em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems®) do serviço de sequenciamento do Instituto de Química/USP. Visando corrigir possíveis erros e ou ambiguidades, ambas as direções (5'-3' e 3'-5') foram sequênciadas para cada amostra.

Os cromatogramas foram analisados no programa PhredPhrap e Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998) para a correção de ambiguidades durante o sequenciamento e produção de "*contigs*". Os diversos *contigs* obtidos foram integrados em uma matriz e alinhados primariamente em Muscle (versão 4.0; Edgar, 2004a, 2004b) e edições das sequências foram feitas em BioEdit (versão 7.0.9; Hall, 1999).

Tabela 1: Iniciadores empregados no presente trabalho.

Marcador/Finalidade	Nome dos Iniciadores	Sequência 3'- 5'	Referências
28S rDNA 1400pb			
Amplificação e Sequenciamento	LSU 5F	TAGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGCA	Littlewood *et al.* (1997)
	LSU 1500R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Tkach *et al.* (1999)
Sequênciamento interno	LSU 330F	CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG	Williams & Ozawa (2006)
	CTO 28S 900F	GTTGGGTCTGATTGTCGTGTCGCC	Presente estudo, não publicado
COI 500pb			
Amplificação e Sequenciamento	Sean1	TTTACTTTGGATCATAAGCG	Turner (2006)
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer *et al.* (1994)
	nLCO	TTTACTYTRGAYCATAAGCGT	Reyda & Marques (2011)
	Sean2	AAGCAGAACCAAATTTACGAT	Turner (2006)
Calmodulina 350pb			
Amplificação e Sequenciamento	CalF	GARCARATTGCIGARTTYAARGARGC	Audzijonyte & Vrijenhoek (2010)
	Cal R1	TTCTTCRTARTTIACYTGICCRTC	Audzijonyte & Vrijenhoek (2010)
	Cal R2	CATYTCRTCIACYTCYTCRTC	Audzijonyte & Vrijenhoek (2010)
ITS I rDNA 700pb			
Amplificação e Sequenciamento	CAS 18S F1	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	Ieji *et al.* (2003)
	CAS 5,8S B1d	TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAACAS	Ieji *et al.* (2003)

2.3 Análises filogenéticas

Dos dados moleculares compilados para 213 terminais, 206 são membros de *Potamotrygonocestus* e os demais (7) são membros de 3 gêneros que servem de grupos externos para o enraizamento das topologias (Farris, 1982; Nixon & Carpenter, 1993). O grupo externo é composto pelas espécies *Acanthobothrium* spp., *Gangesia* cf. *oligonchis* e *Platybothrium auriculatum*. Caira *et al.* (2014) mostraram que esses táxons são proximamente relacionados com *Potamotrygonocestus*. Dado a presença de dados lacunares (*i.e.*, faltantes) para alguns terminais, os protocolos analíticos descritos abaixo foram aplicados a duas bases de dados distintas. A primeira delas, **completa**, contemplou todos os 213 terminais – que incluía terminais que continham no mínimo 2 das 4 regiões sequenciadas neste estudo. A segunda análise, **parcial**, contemplou somente os 146 terminais para os quais todas as regiões foram sequenciadas e que, portanto, não havia dados lacunares. A justificativa para essas duas análises reside na tentativa de verificar se dados lacunares influenciam o resultado final das análises, pois a exclusão de terminais incompletos diminui a representatividade taxonômica e biogeográfica da base de dados.

O critério de otimidade utilizado na busca e seleção de árvores filogenéticas sob as quais foram feitas inferências filogenéticas foi a parcimônia em análises de homologia dinâmica (*sensu* Wheeler, 2001). O protocolo analítico envolveu duas etapas. Na primeira delas, topologias candidatas ao refinamento foram compiladas pelo algoritmo de otimização direta (*direct optimization*, **DO**; Wheeler, 1996). Posteriormente, estas topologias foram submetidas ao refinamento pelo algoritmo de "*iterative pass*" (**IP**; Wheeler, 2003) e "*tree fusing*" (**FUSE**; Goloboff, 1999). Todas estas etapas envolveram a análise simultânea (*i.e.*, análise de evidência total *sensu* Kluge, 1989) dos dados moleculares implementadas no programa POY (versão 5.1, Varón *et al.*, 2010). Em cada busca, os comprimentos de ramos eram calculados pela soma dos custos de todas as substituições hipotéticas e INDELs por otimização de caracteres de Sankoff (Sankoff & Rousseau, 1975).

A justificativa para a escolha dessa metodologia reside na importância fundamental do alinhamento de sequências nucleotídicas em reconstrução filogenética. Segundo Wheeler (1996), a análise filogenética de sequências nucleotídicas apresenta problemas que não são encontrados em outros tipos de matrizes de dados. Isso porque, apesar de só haver quatro estados de caráter (A, C, G ou T), sequências nucleotídicas homólogas podem diferir em comprimento. Essa dificuldade pode ser maior ou menor de acordo com o tipo de sequência nucleotídica. Por exemplo, regiões codificadoras de proteínas tendem a conservar o número de pares de bases entre táxons, ao passo que regiões não codificantes estão mais suscetíveis a

eventos de inserção e deleção (*i.e.*, INDELs) resultando em sequências homólogas de tamanhos distintos. Para esses dados, conjecturas de homologia entre as bases dependem da inserção de *gaps*.

As buscas realizadas por otimização direta (**DO**) para a função de custo que atribuiu pesos idênticos para todas as transformações (*i.e.*, 0:1:1:1) foram executadas em 10 iterações com o comando interno de POY `search()`, sendo que cada iteração considerou 2 buscas com o tempo máximo de 2 horas (`search(max_time:0:2:00)`). Os demais parâmetros (9 no total) foram submetidos ao mesmo comando de busca, porém considerando apenas uma única iteração. Após cada iteração as topologias mais parcimoniosas foram salvas em um arquivo. Concluída esta primeira etapa, todas as topologias únicas compiladas durante a etapa de **DO** foram submetidas ao algoritmo de **FUSE** e rediagnosticadas via **IP**. O POY utiliza o **FUSE** para buscar novas topologias. Este algoritmo permite a recombinação dos componentes compatíveis entre topologias e tem a propriedade de explorar o espaço de forma mais eficiente à medida em que novas topologias são examinadas (Goloboff, 1999). O algoritmo de **IP** aplica otimização direta em três sequências de forma simultânea e tem a propriedade gerar hipóteses filogenéticas mais curtas que **DO** (Wheeler, 2003). Como o custo computacional é muito grande, tradicionalmente o **IP** é utilizado no refinamento do alinhamento implícito no final da análise filogenética (*e.g.,* Grant *et al.*, 2006; Jungfer *et al.*, 2012).

Na expectativa de explorar mais agressivamente o espaço de soluções durante a busca, diferentes parâmetros de alinhamento foram contemplados dentro do conceito de *sensitivity search* (*sensu*, Wheeler *et al.*, 2006). No total, foram considerados dez conjuntos de parâmetros de alinhamento. O primeiro conjunto considerou custos idênticos para todas as transformações e nenhuma penalidade para abertura de *gaps* (*i.e.*, 0:1:1:1). Os outros nove conjuntos de parâmetros consideraram custos de extensão de *gaps* de 1 a 8, custos de transformação de 1 a 4, e custo de abertura de *gaps* igual a 2x ao custo de extensão. Estas funções de custos são expressas pelas razões entre cada tipo de transformação obedecendo as seguintes notações: 0:1:1:1, 2:1:1:1, 2:1:1:2, 2:1:2:1, 2:2:1:1, 2:2:1:2, 2:2:2:1, 2:4:1:1, 2:4:1:2, e 2:4:2:1. Nesta notação, cada termo refere-se ao custo de abertura de *gaps*, custo de extensão de *gaps*, transversões e transições; respectivamente. Desta forma, para "2:4:2:1", o custo de transição seria 1, de transversão seria 2 (*i.e.*, 2x1), de extensão de *gaps* seria 8 (*i.e.*, 4x2) e o custo de abertura de *gaps* seria 16 (*i.e.*, 2x8).

O resultado final de todos os parâmetros de busca foi examinado no programa TNT (Goloboff *et al.*, 2000) com os comandos *xmu*= 100 réplicas, *ratchet* 50 e *fuse* 100. Adicionalmente, todas as topologias resultantes de **DO** foram comparadas com as topologias

encontradas pelo **FUSE**, para avaliar se este algoritmo de refinamento encontrou topologias. Os resultados da análise de sensibilidade foram comparadas pelo programa YBYRÁ (Machado, 2013). Todas as buscas de árvores foram implementadas em 25 processadores de 2.40GHz Intel® Xeon® E7- 8870 CPU, no cluster do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A árvore ótima encontrada por otimização direta e sua respectiva matriz estática foram carregadas em TNT para diagnose. As topologias igualmente parcimoniosas encontradas e seu consenso estrito foram salvos.

O suporte dos ramos teve estimativa pelo índice de Goodman-Bremer (**GB** Goodman *et al.*, 1982; Bremer, 1994; Grant & Kluge, 2008). Para obter esses índices, em TNT, as melhores árvores obtidas em POY/DO+IP+FUSE e o alinhamento implícito em formato Hennig86 (Farris, 1989) tiveram leitura em TNT. O cálculo do suporte em TNT foi realizado utilizando o macro Bremer.run, distribuído com o programa, com os parâmetros *default* do programa. A visualização e aveditoração de todos os cladogramas se realizaram com o auxílio do programa Figtree (versão 1.3.1; Rambaut, 2006-2009).

As distâncias médias entre as sequências foram calculadas com o programa Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando o modelo *Kimura two parameters* (Kimura, 1980) intra e entre clados selecionados. Estas distâncias foram calculadas para Citocromo Oxidase I e o alinhamento implícito dos genes nucleares 28S, ITS e Calmodulina gerado por **IP**. Os dois bancos de dados apresentam os mesmos grupos (*i.e.* clados) com exceção do grupo B3.2.2, cujo único haplótipo não possuia sequência para COI. As regiões de *gaps* foram excluídas utilizando o programa Gblocks (Castresana, 2000) no cálculo de distâncias baseado no alinhamento implícito. A remoção destas regiões visou minimizar o efeito de *gaps* neste cálculo, uma vez que alinhamentos implícitos tendem a gerar alinhamentos mais longos, principalmente quando inserções não-homólogas são postuladas durante a otimização direta (Wheeler, 2003). Embora reconhecendo que alinhamentos implícitos sejam baseados em hipóteses de sinapomorfias e, consequentemente, não são independentes das hipóteses de relação de parentesco entre os terminais, a exclusão destas regiões foi considerada a forma mais conservadora de estimar distâncias.

O programa CAOS (Sarkar *et al.*, 2000) foi usado para diagnosticar molecularmente clados de interesse. O CAOS é baseado no algoritmo "Characteristic Attributes Organization System" (CAOS), derivado de princípios fundamentais da biologia evolutiva. O CAOS é um algoritmo que descobre informações descritivas de um grupo de dados de sequências nucleotidícas. Este algoritmo gera regras, a partir de um conjunto de dados previamente disponível (*e.g.* análise filogenética), que permitem a classificação de grupos selecionados. Utilizando essas regras,

o programa assume informações descritivas na forma de atributos característicos "puros" e "privados". Os "atributos puros" são encontrados em todos membros de um determinado grupo, mas nunca no outro clado; e os "atributos privados" são encontrados em alguns membros de um clado, mas nunca no outro clado. O CAOS não executa buscas de topologias e sim é um sistema de classificação baseado em uma hipótese filogenética. O presente estudo utilizou este programa para descobrir atributos puros nas sequências de Citocromo Oxidase I em clados selecionados. O critério utilizado na seleção foi primeiramente coesão morfológica, seguido de padrão biogeográfico. A escolha deste marcador se apóia em sua tradicional utilização nos testes de Barcode (Hebert *et al.*, 2003), por ter uma boa variabilidade genética (Harrison, 1989; Sunnucks, 2000) e por ter a maior representatividade taxonômica. Este estudo também optou por utilizar apenas atributos puros para fins de conservadorismo.

2.4 Obtenção de imagens

As imagens dos espécimes de *Potamotrygonocestus* foram obtidas com o programa analySIS 5.0 Olympus Soft Images Solutions e uma câmera Olympus SC30 acoplada a um microscópio óptico Olympus BX51. As imagens dos ganchos foram analisadas em Fiji is Just Image J (Schindelin *et al.*, 2012).

A sobreposição de contornos de ganchos, baseada em suas imagens, foi realizada por dois programas. O programa TpsDig2 versão 2.17 (Rohlf, 2010) permite criar pontos digitalizados nas imagens (*i.e., landmarks*). Esse pontos devem ter o mesmo número e posição entre as imagens a serem comparadas. Em seguida, o programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) lê estes pontos e utilizando a ferramenta de ajuste *Procrustes*, alinha esses pontos, independente da dimensão da imagem. O que torna essa ferramenta muito útil na descrição de formas.

3 Resultados

3.1 Hipótese de trabalho

As análises de **DO** contemplando todos os terminais, análise completa, resultaram em 19 topologias, todas elas únicas. Durante as dez iterações sob o regime de custo 0:1:1:1 foram compiladas 10 topologias que apresentaram de 4878 a 4881 transformações (Tabela 2). Para os demais conjuntos de parâmetros, cada um deles forneceu uma única topologia cujos custos estão expressos na Tabela 2. Por outro lado, as análises que consideraram apenas os terminais para os quais todos os fragmentos foram sequenciados, análise parcial, resultaram em 31

topologias, todas elas únicas. Para esse conjunto de dados, dez iterações sob o regime de custo 0:1:1:1 foram compiladas 21 topologias que apresentaram custos que variavam de 3608 a 3613 transformações (Tabela 2). Para os demais conjuntos de parâmetros, exceto pelo parâmetro 2:2:1:1 que forneceu 2 topologias, cada um dos demais forneceram uma única topologia cujos custos estão expressos na Tabela 2. A rediagnose das topologias coletadas durante as análise de **DO** para os dois conjuntos de dados, completos e parciais, geraram duas topologias com custo de 4850 e uma topologia com custo de 3561 transformações, respectivamente. A rediagnose destas topologias via IP+FUSE resultou em duas topologias com custo de 4850 transformações para o primeiro banco de dados e uma topologia com 3561 transformações para o segundo; reduzindo o custo mínimo em 0,57–0,64% e 1,3–1,4%, respectivamente, como previsto para o uso deste algoritmo (Wheeler, 2003). No entanto, a rediagnose das topologias obtidas por POY/IP+FUSE em TNT apresentaram custos diferentes daqueles registrados pelo POY. Para o conjunto de dados que contemplou todos os terminais, TNT computou os custos de 4846 e 4852 para as duas topologias. A análise filogenética deste alinhamento implícito encontrou >200 topologias cujo consenso não difere das topologias encontradas por POY/IP+FUSE. A rediagnose em TNT para o conjunto de dados parciais computou o custo de 3561 para a topologia encontrada por POY/IP+FUSE, sendo que a análise filogenética deste alinhamento implícito gerou 144 topologias.

A topologia que será apresentada como hipótese filogenética é o resultado da análise do conjunto de dados completos (Figura 2). Esta topologia segue a mesma estrutura cladística resultante da análise do conjunto de dados parciais. Apenas uma diferença foi encontrada entre eles: a relação filogenética do Clado A2, que na primeira topologia resulta como grupo-irmão do Clado A3, e na segunda como grupo-irmão do Clado A1 (veja essas árvores consensos nas Figuras A.17 e A.18, Anexos). Como essa relação não interfere na delimitação de espécies do gênero, foco principal desse estudo, a hipótese filogenética de trabalho adotada aqui, refere-se ao conjunto de dados completos, que possui maior representatividade biogeográfica que a segunda.

As duas topologias obtidas em POY/IP+FUSE são iguais às duas topologias que já haviam sido encontradas em DO nas 6ª e 10ª iterações, com custo 4879 cada uma. Esse resultado indica que, após a implementação de **FUSE**, nenhuma topologia diferente das que já haviam sido obtidas em DO foi encontrada. Quando se compara as duas topologias de **IP**, observa-se que há 104 clados diferentes entre elas. As diferenças encontradas são resultantes de relações de grupos-irmãos distintos entre sequências de haplótipos muito semelhantes. Estas diferenças influenciaram 25% dos clados de A1.1, 2% dos clados A1.2 (desses, 1% A1.1.1 e 1% A1.1.2)

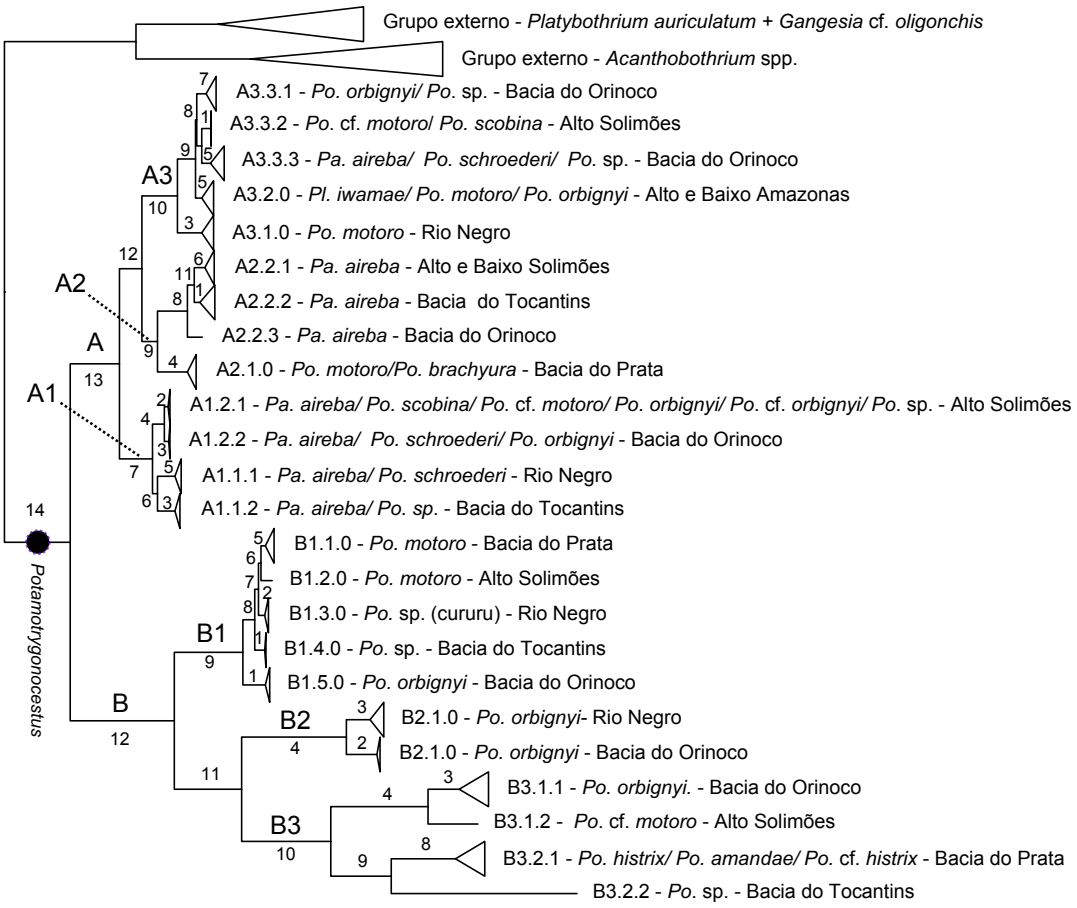
e 4,8% dos clados de A2.1 e 4,8% de A2.2 (Figura 2, Clados A1 e A2). Para os clados em A3, observou-se que 1% deles difere entre as topologias em A3.1, 9% em A3.2 e 18% em A3.3 (Figura 2). Na linhagem B (Figura 2), 3,8% dos clados em B1, 1,9% em B2, e 1,9% em B3.1 e 23% em B3.2 são distintos.

Tabela 2: Custos e número de topologias obtidas nas análises de otimização direta para dois conjuntos de dados, um contemplando todos os terminais (Completo) e outro com a seleção de terminais (Parcial) para os quais todas as regiões foram sequenciadas de acordo com cada parâmetro de alinhamento.

Parâmetro	**Custo DO** [Completo]	**Topologias** únicas	**Custo DO** [Parcial]	**Topologias** únicas
0:1:1:1	4878—4881	10	3608—3613	21
2:1:1:1	5754	1	4209	1
2:1:1:2	17198	1	9107	1
2:1:2:1	15770	1	8972	1
2:2:1:1	7335	1	5258	2
2:2:1:2	21258	1	11545	1
2:2:2:1	19997	1	11079	1
2:4:1:1	10150	1	7153	1
2:4:1:2	27572	1	14211	1
2:4:2:1	29046	1	16087	1

A análise de CAOS encontrou atributos em 15 linhagens ou grupo de linhagens em *Potamotrygonocestus* (Figura 3). A matriz de COI possui uma divergência média total de 19,7% enquanto a matriz nuclear apresentou 9,3% de divergência média total. A maior variabilidade observada em COI é um evento conhecido e já foi reportado por diversos autores (*e.g.*, Harrison, 1989; Sunnucks, 2000). As demais divergências médias e o número de atributos puros podem ser conferidos em cada clado expandido das árvores editadas da hipótese filogenética apresentadas durante a discussão. As matrizes de distâncias fenéticas dos dados mitoncondriais e nucleares podem ser verificadas nos Anexos (Tabelas A.7, A.8 e A.9).

Esta análise corrobora a monofilia do gênero *Potamotrygonocestus* e representa a primeira hipótese filogenética para o grupo baseada em dados moleculares (Figura 2). Dentro de *Potamotrygonocestus* há duas grandes linhagens que serão referenciadas no texto como Clado



.

Figura 2: Hipótese filogenética para *Potamotrygonocestus* baseada em dados moleculares resultante da análise filogenética de 213 terminais (análise completa). Os terminais representam os hospedeiros dos haplótipos de cada região estudada. Esta representação é um sumário da topologia obtida após otimização direta de sequências nucleotídicas e rediagnose por *iterative pass* assumindo custos idênticos para todas as transformações sem penalidades para abertura de *gaps*. Comprimento total 4846. Comprimento de ramos proporcional ao número de transformações absolutas. Os valores em cada ramo representam o suporte de Goodman-Bremer. A topologia com todos os haplótipos pode ser verificada na Figura A.16, Anexos

A e Clado B. Membros de *Potamotrygonocestus* inseridos em ambos clados representam pelo menos três espécies válidas, quatro espécies não descritas formalmente mas reconhecidas por Luchetti (2011), além de outras espécies putativamente novas reveladas pelos dados moleculares.

O Clado A1 é composto por parasitas de *Pa. aireba* e *Po. schroederi* do Rio Negro (Figuras 2, Clado A1.1.1), grupo-irmão do clado do Rio Tocantins parasitas de *Pa. aireba* e

Potamotrygon sp. (Figuras 2, Clado A1.1.2). Este grupo é irmão de haplótipos procedentes do Alto e Baixo Solimões, parasitas de *Pa. aireba*, *Po. scobina Potamotrygon* cf. *motoro*, *Po. orbignyi*, *Potamotrygon* cf. *orbignyi* e *Potamotrygon* sp.; mais os haplótipos da Bacia do Orinoco, parasitas de *Pa. aireba*, *Po. schroederi* e *Po. orbignyi* (Figura 2, Clado A1.2.1 e A1.2.2, respectivamente). O Clado A1 é grupo-irmão do clado formado pelos clados A2 e A3. O Clado A2 é representado por haplótipos procedentes do Alto Solimões, Rio Tocantins e Rio Orinoco (Figuras 2, Clados A2.2.1, A2.2.2 e A2.2.3, respectivamente), parasitas de *Pa. aireba*, e haplótipos da Bacia do Prata, parasitas de *Po. motoro* e *Po. brachyura* (Figuras 2, Clado A2.1.0). Finalmente, o Clado A3 é composto por cinco subclados. O Clado A3.1.0 é representado por haplótipos do Rio Negro, grupo-irmão de todos os outros do Clado A3, parasitas de *Po. motoro*. O Clado A3.2.0 é representado por haplótipos do Alto e Baixo Amazonas, grupo-irmão do Clado A3.3 e parasita de *Pl. iwamae*, *Po. motoro* e *Po. orbignyi*. O Clado A3.3 é composto pelos Clados A3.3.1, parasitas de *Po. orbignyi* e *Potamotrygon* sp.; e Clado A3.3.3, parasitas de *Pa. aireba*, *Po. schroederi* e *Potamotrygon* sp.; ambos provenientes da Bacia do Orinoco. O Clado A3.3.2, parasitas de *Po. scobina* e *Potamotrygon* cf. *motoro* do Alto Solimões.

Dentro do Clado B, o Clado B1 é composto por cinco linhagens encontradas na Bacia do Prata e Alto Solimões, *Po. motoro*; no Rio Negro, *Potamotrygon* sp. (cururu); na Bacia do Tocantins, *Potamotrygon* sp.; e na Bacia do Orinoco, *Po. orbignyi* (Figuras 2, Clado B1). O Clado B2 é representado por haplótipos provenientes do Rio Negro (Clado B2.1.0) e da Bacia do Orinoco (Clado B2.2.0), parasitas de *Po. orbignyi*. Finalmente, o Clado B3 é composto por quatro linhagens. O Clado B3.1.1 parasitas de *Po. orbignyi* da Bacia do Orinoco. O Clado B3.1.2, do Alto Solimões, parasita de *Potamotrygon* cf. *motoro*. O Clado B3.2.1 parasitas de *Po. histrix*, *Po. amandae* e *Potamotrygon* cf. *histrix* da Bacia do Prata. O Clado B3.2.2 possui um haplótipo proveniente do Tocantins-Araguaia, parasita de *Potamotrygon* sp..

Esta hipótese filogenética não contempla representantes de duas espécies válidas para o gênero, *Potamotrygonocestus magdalenensis* e *Potamotrygonocestus amazonensis*. A primeira é a espécie tipo de *Potamotrygonocestus* e é endêmica do Rio Magdalena, Colômbia (Brooks & Thorson, 1976; Caira & Orringer, 1995) – localidade não amostrada neste estudo. *Potamotrygonocestus amazonensis* ocorre em diversas localidades da Bacia Amazônica, porém com baixa prevalência em relação às demais espécies do gênero (Mayes *et al.*, 1981; Luchetti, 2011) e, embora as áreas de distribuição e os hospedeiros conhecidos para esta espécie terem sido amostrados, nenhum exemplar foi encontrado para estudos de sistemática molecular.

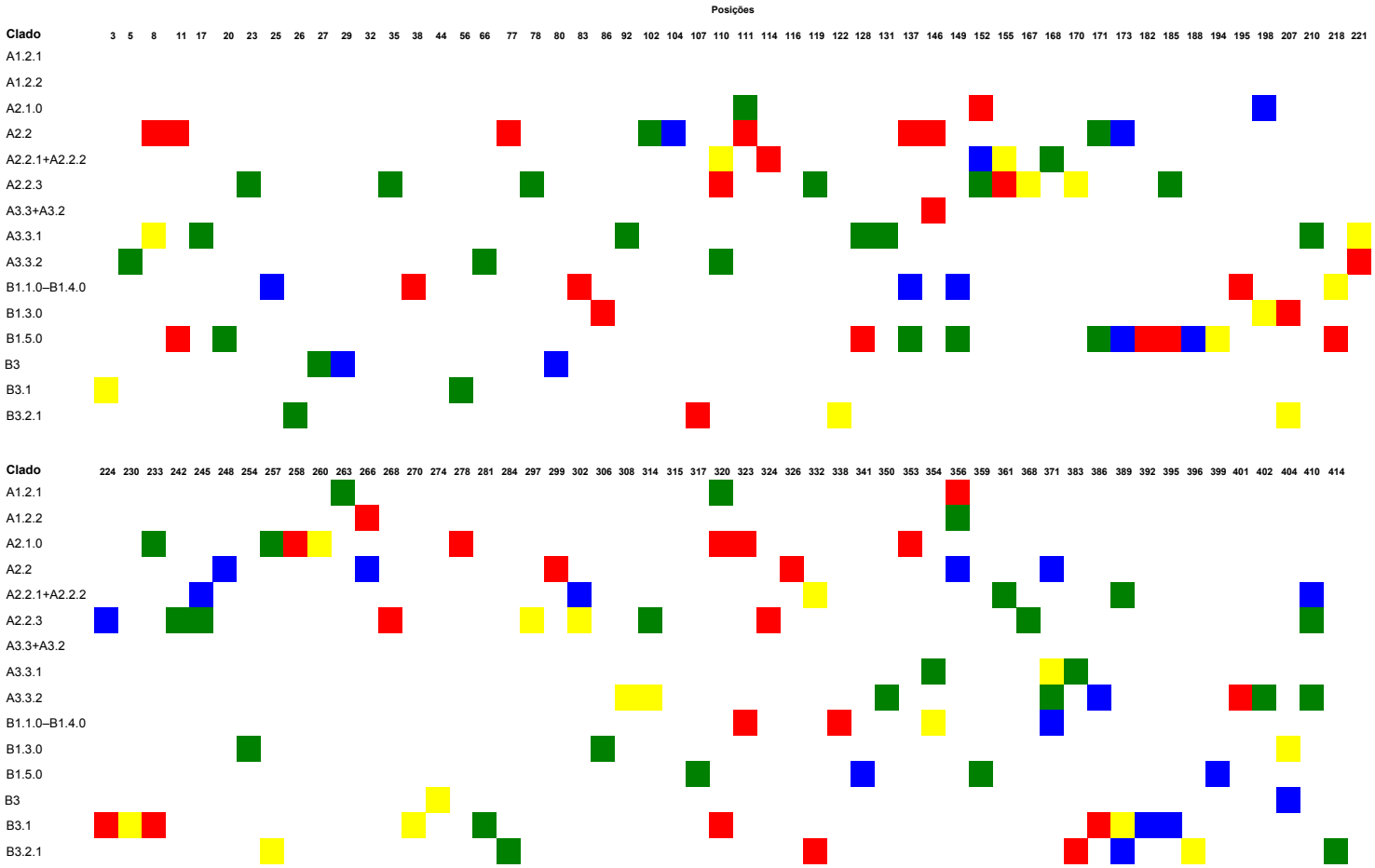


Figura 3: Sumário visual dos atributos puros encontrados pelo programa CAOS para linhagens de *Potamotrygonocestus*. As linhas correspondem as linhagens ou grupo de linhagens (*i.e.* clados), as colunas correspondem as posições dos caracteres de COI (3 a 414). As cores apresentadas correspondem aos estados: Vermelho - A; Azul - T; Amarelo - G; Verde - C. Os clados correspondem aos terminais identificados na Figura 2.

4 Discussão

4.1 Histórico taxonômico do gênero: exclusividade de dados morfológicos

A história taxônomica do gênero *Potamotrygonocestus* é relativamente recente comparada com outros membros de Onchoproteocephalidea (Caira *et al.*, 2014). Brooks & Thorson (1976) descreveram o gênero para receber *Potamotrygonocestus magdalenensis*, parasita de *Potamotrygon madalenae* Dumeril, 1865, endêmica do Rio Magdalena, Colômbia. Nas décadas seguintes outras espécies foram atribuídas ao gênero, resultado de várias excursões pelas bacias hidrográficas sulamericanas (Rego, 1979; Mayes *et al.*, 1981; Brooks *et al.*, 1981; Marques *et al.*, 2003; Luchetti *et al.*, 2008), dados estes, que foram adicionados em revisões recentes, reorganizando a composição do gênero (Marques *et al.*, 2003; Luchetti, 2011). Nestas revisões, fica evidente que a circunscrição do gênero é inequívoca, porém o mesmo não pode ser dito sobre suas espécies.

Após a criação do gênero, Brooks *et al.* (1981) foram os primeiros a apresentar uma revisão taxonômica do grupo. Neste artigo, os autores reconheceram *P. magdalenensis* e *P. amazonensis* como espécies válidas, descreveram uma nova espécie para o Orinoco, *P. oriconoensis*, e consideraram *P. travassosi* Rego, 1979 como *species inquirenda*. Adicionalmente, os autores propuseram a primeira hipótese filogenética para o grupo baseada em 4 caracteres morfológicos.

Duas décadas mais tarde, Marques *et al.* (2003) apresentaram uma revisão mais ampla de *Potamotrygonocestus*, resultado de novas amostragens para parasitas de potamotrigonídeos nas bacias do Prata e Amazônica. Neste estudo, Marques *et al.* (2003) descreveram três novas espécies (*P. chaoi*, *P. fitzgeraldae* e *P. maurae*), e revalidaram *P. travassosi* – cujo novo conceito considerava *P. oriconoensis* como sinônimo júnior dessa espécie. Adicionalmente, estes autores definiram 4 sinapomorfias putativas para o gênero e propondo uma nova hipótese filogenética para as 6 espécies consideradas válidas baseadas em 6 caracteres morfológicos.

A última revisão taxonômica do gênero foi proposta por Luchetti (2011) em sua dissertação de mestrado, cujos resultados ainda aguardam publicação. De posse de mais de 1000 exemplares de *Potamotrygonocestus* provenientes de 11 bacias hidrográficas da América do Sul, maioria dos pontos de amostragem ilustrados na Figura 1, a autora reconheceu 4 novas espécies para o gênero e manteve a sinonímia proposta por Marques *et al.* (2003). Atualmente, graças à contribuição destes autores, há 8 espécies nominais para *Potamotrygonocestus*, 7 das quais são consideradas válidas, além de evidências de que pelo menos 4 novas espécies devam ser descritas para o grupo (veja Tabela 3).

Tabela 3: Sumário das espécies nominais de *Potamotrygonocestus* com os respectivos autores, localidades, hospedeiros-tipos e *status* taxonômico atual.

Táxon	***Status* Taxonômico**
P. magdalenensis Brooks & Thorson, 1976 ex *Po. magdalenae*, Rio Magdalena, Colômbia	válida
P. travassosi Rego, 1979 ex *Po. orbignyi*, Rio Amazonas, Brasil	válida
P. amazonensis Mayes *et al.*, 1981 ex *Po. orbignyi*, Rio Itacuaí, Brasil	válida
P. oriconoensis Brooks *et al.*, 1981 ex *Po. orbignyi**, Rio Orinoco, Venezuela	sinônimo júnior de *P. travassosi*
P. chaoi Marques *et al.*, 2003 ex *Pl. iwamae*, Rio Solimões, Brasil	válida
P. fitzgeraldae Marques *et al.*, 2003 ex *Pa. aiereba*, Rio Negro, Brasil	válida
P. maurae Marques *et al.*, 2003 ex *Po. orbignyi*, Rio Negro, Brasil	válida
P. marajoara Luchetti *et al.*, 2008 ex *Pl. iwamae*, Baía de Marajó, Brasil	válida
Potamotrygonocestus sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Rio Salobra, Brasil	*sensu* Luchetti (2011)
Potamotrygonocestus sp. nov. 2 ex *Po. motoro*, Rio Paraguai, Brasil	*sensu* Luchetti (2011)
Potamotrygonocestus sp. nov. 3 ex *Po. brachyura*, Rio Mutum, Brasil	*sensu* Luchetti (2011)
Potamotrygonocestus sp. nov. 4 ex *Potamotrygon* sp. jam, Rio Jamari, Brasil	*sensu* Luchetti (2011)

* Originalmente atribuída à *P. reticulatus* por Brooks *et al.* (1981) (veja Marques *et al.*, 2003).

Membros de *Potamotrygonocestus* têm sido amplamente amostrados nos sistemas fluviais da América do Sul e relativamente bem estudados morfologicamente nas últimas décadas – embora desde o trabalho seminal de Brooks *et al.* (1981) a Bacia do Orinoco não tenha sido amostrada para parasitas de potamotrigonídeos. A presente taxonomia do grupo está fundamentada nos resultados provenientes do uso de caracteres merísticos e morfométricos de estruturas morfológicas, além de informações provenientes de cortes histológicos e microscopia eletrônica de varredura de estruturas tegumentares (veja Luchetti, 2011). A incorporação de dados moleculares na sistemática do gênero é, portanto, oportuna. Dados moleculares têm sido muito úteis para refinar a sistemática de diversos táxons (*e.g.,* Bray *et al.*, 2012; Carbayo *et al.*, 2013; Pimvichai *et al.*, 2014; entre outros), incluindo a descoberta de novas linhagens não identificadas por outras fontes de caracteres (*e.g.,* Bickford *et al.*, 2006; Rueckert *et al.*, 2011;

entre outros). Este estudo tem o potencial de ser mais um exemplo.

4.2 Implicações da hipótese filogenética na taxonomia de *Potamotrygonocestus*

A hipótese filogenética para *Potamotrygonocestus* apresenta padrões que estão de acordo com dados morfológicos conhecidos dentro do grupo. Os exemplares do gênero possuem ganchos simples, diferente do outro gênero encontrado em potamotrígonideos como *Acantobothrium*, que possui ganchos bifurcados. Os ganchos de *Potamotrygonocestus* são distribuídos em quatro pares, um par por botrídio, cada par possui um gancho medial (mais interno ao botrídio) e um gancho lateral (externo ao mesmo). Além disso, cada gancho individual é composto por duas partes: a "base", que é fixa ao botrídio e a "furca", que fixa o parasita ao intestino do hospedeiro. A furca pode estar inserida na parte central ou na parte posterior da base, dependendo do táxon. Portanto a posição da inserção da furca à base é um caráter diagnóstico importante para a identificação desses parasitas, como já observado por diversos autores ao longo da história taxonômica do gênero (*e.g.*, Brooks & Thorson, 1976; Brooks *et al.*, 1981; Marques *et al.*, 2003; Luchetti *et al.*, 2008; Luchetti, 2011).

A hipótese filogenética apresentada aqui é composta por dois clados principais, A e B, cujas linhagens são diferenciadas pela morfologia dos ganchos (Figura 2). O Clado A é composto por animais com furca inserida na parte postero-lateral da base e o Clado B é composto por animais cujo gancho possui a furca inserida na parte centro-lateral da base. Os resultados indicam, portanto, que essa diferenciação morfológica é congruente com os clados obtidos.

As análises recuperaram clados congruentes com algumas linhagens reconhecidas morfologicamente, no entanto as evidências moleculares sugerem que não há suporte para a monofilia recíproca de todas espécies reconhecidas (veja: Tabela 3, Luchetti, 2011). O termo "monofilia recíproca" é utilizado quando há evidências de que duas (ou mais) populações sofreram interrupção do fluxo gênico (*i.e.* cladogênese) e começaram a diferenciar-se geneticamente até que todos os alelos, dentro de cada população, coalesçam a um ancestral comum mais recente, independente dos alelos de outra população relacionada (Avise, 2000). Nesta seção serão discutidas as implicações da hipótese filogenética na taxonomia das espécies de *Potamotrygonocestus*.

Clado A

***Potamotrygonocestus fitzgeraldae* Marques *et al.*, 2003**

Potamotrygonocestus fitzgeraldae foi descrita para abrigar um conjunto de espécimes encontrados em *Paratrygon aireba* no Alto Rio Negro, região de Barcelos, Brasil (localidade tipo). Os espécimes apresentavam gancho com inserção postero-lateral da furca na base, diagnóstica do clado ao qual pertence, e diferenças morfológicas em relação à *P. travassosi* (*e.g.*, número de testículos e posição do poro genital; Luchetti, 2011).

Na concepção original de *P. fitzgeraldae*, Marques *et al.* (2003) consideraram que esta espécie também era encontrada em outras localidades da Bacia Amazônica, além de tributários da Bacia do Prata. Luchetti (2011) reavaliou o material utilizado por Marques *et al.* (2003) na descrição original de *P. fitzgeraldae* e notou que alguns exemplares provenientes de outras localidades, além da localidade tipo, possuíam caracteres morfológicos não compatíveis com o material proveniente do Rio Negro. Desta forma, parte do material utilizado por Marques *et al.* (2003) foi considerado como representantes de *P. travassosi*, ao passo que os exemplares provenientes da Bacia do Prata foram atribuídos à uma espécie nova (*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3; *sensu* Luchetti, 2011).

No novo conceito de *P. fitzgeraldae*, a espécie está restrita às várias sub-bacias hidrográficas da Amazônia, entre elas Rio Negro, Rio Javari, Rio Branco, e Rio Tapajós, e do Tocantins-Araguaia, e parasita principalmente *Paratrygon aiereba*. Quanto à morfologia, Luchetti (2011:45) indicou que *P. fitzgeraldae* pode ser facilmente diagnosticada pela presença de uma farpa na extremidade distal da furca e pela morfologia dos "... ganchos lateral e medial que apresentam furca com duas angulações, dando-lhes aspecto quadrado e a extremidade distal é voltada para o lado (...) e a largura da base da furca mantém-se constante pelo comprimento diminuindo a partir da angulação mais distal". A autora também indicou que os lobos ovarianos eram exclusivamente assimétricos – embora ela tenha reconhecido que este é um caráter plástico. Portanto, a autora além de restringir a distribuição geográfica da espécie, adicionou novos atributos morfológicos ao conceito de *P. fitzgeraldae*.

Os haplótipos compatíveis com a diagnose de *P. fitzgeraldae* de acordo com Luchetti (2011) resultaram em dois clados não relacionados (veja Figuras 2 e 4, Clados A1.1.1 e A2.2). Os haplótipos provenientes da localidade tipo, Rio Negro, formaram um clado que resultou em um grupo-irmão do clado formado por exemplares atribuídos à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 (*sensu* Luchetti, 2011) restritos ao Rio Tocantins (Figuras 4, Clado A1.1.2). Em contraste, aqueles indivíduos provenientes do Alto Solimões, Rio Tocantins e Rio Orinoco (Figuras 4, Clado A2.2) formaram um clado que é grupo-irmão do clado formado por exemplares atribuídos

à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 (*sensu* Luchetti, 2011) restritos à Bacia do Prata (Figuras 4, Clado A2.1.0). Desta forma, o clado formado por exemplares coletados na localidade tipo desta espécie nominal foram considerados *P. fitzgeraldae sensu stricto* e aqueles provenientes das demais bacias foram designados como Clado A2.2, dentro do qual foram reconhecidas 3 espécies putativamente novas (veja abaixo).

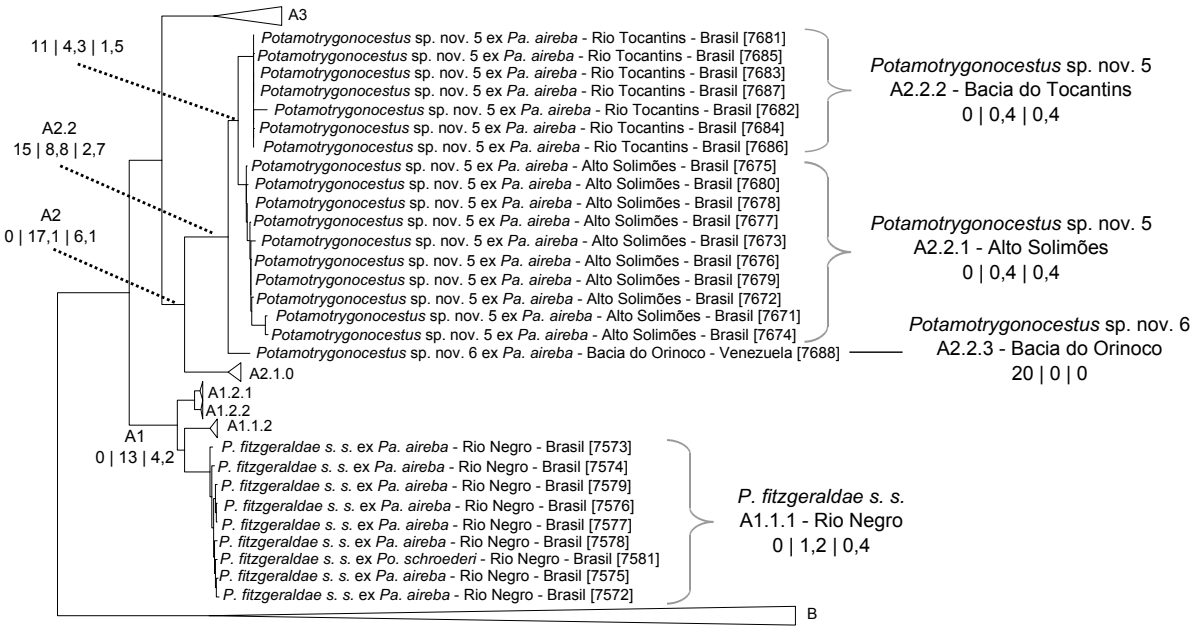


Figura 4: Relações filogenéticas das diferentes linhagens de *P. fitzgeraldae sensu lato*. O Clado A1.1 representa as relações haplotípicas de *P. fitzgeraldae sensu stricto* e Clado A2.2 as relações haplotípicas das outras linhagens. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

A diagnose morfológica dos haplótipos considerados como membros de *P. fitzgeraldae sensu lato* foi feita, principalmente, com base na morfologia do gancho. Em todos os exemplares com ganchos disponíveis, observou-se que a forma das furcas dos ganchos laterais e internos possuem duas angulações e que suas extremidades distais ultrapassam uma linha imaginária alinhada com suas respectivas bases (veja Figura 5). Este era um dos caracteres diagnósticos de *P. fitzgeraldae*. Não foi observado, em nenhum exemplar sequenciado, a presença de uma farpa na extremidade distal da furca, estrutura esta, que foi considerada como caráter diagnóstico por Luchetti (2011). Adicionalmente, todos os haplótipos sequenciados foram obtidos de *Paratrygon aiereba*, hospedeiro primário de *P. fitzgeraldae sensu* Luchetti

(2011). Por fim, esses haplótipos foram amostrados em regiões biogeográficas para as quais já havia encontrado *P. fitzgeraldae sensu lato* (Rio Negro e Rio Tocantins). Desta forma, todos os componentes utilizados para diagnosticar *P. fitzgeraldae sensu lato* estão em conformidade com a concepção desta espécie nominal, embora os dados indiquem que há duas linhagens com esses atributos.

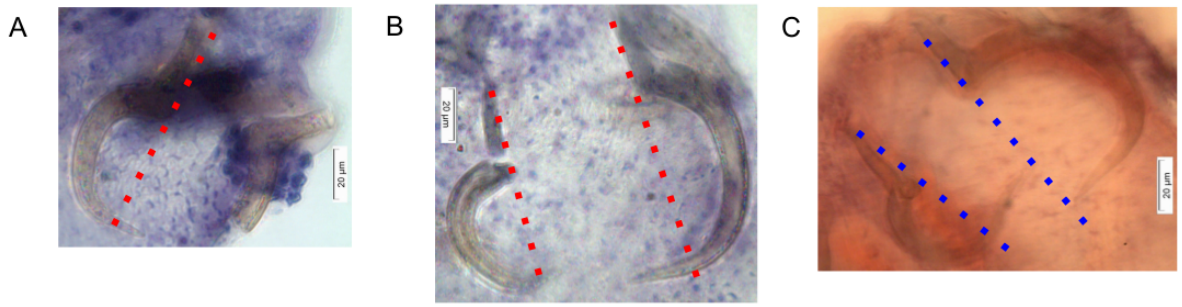


Figura 5: Morfologia do gancho dos indivíduos atribuídos a *P. fitzgeraldae sensu stricto* e de espécimes do Clado A2.2. **A**; Haplótipo atribuído a *P. fitzgeraldae sensu stricto*, MZUSP7580, Clado A1.1.1; **B**, Haplótipo do Clado A2.2.1, MZUSP 7684, ; e **C**, Exemplar de *P. fitzgeraldae* ex *Paratrygon aireba*, Baia de Marajó, Rio Tocantins, Colares/PA, MZUSP 7047 (modificado de Luchetti, 2011; Figura 11C, pag.38). A linha tracejada mostra o alcance da extremidade da furca em relação à base.

As populações identificadas no Clado A2.2 (Figura 4)constituem duas linhagens diferentes. O Clado A2.2 é formado pelos clados A2.2.1 com haplótipos provenientes do Alto e Baixo Solimões, A2.2.2 da Bacia do Tocantins e A2.2.3 da Bacia do Orinoco. O Clado A2.2.1 tem divergência média de A2.2.2 em 4,3% para COI e 1,5% para os genes nucleares, as divergências médias internas aos grupos, respectivamente, foram de 0.4% e 0.1% para COI e 0.29% e 0.04% para os genes nucleares. A análise do CAOS não encontrou nenhum atributo puro para esses grupos. No entanto, encontrou 11 atributos puros para o Clado A2.2.1 + A2.2.2 (Figuras 3 e 4). O Clado A2.2.3, formado por apenas um haplótipo, possui 20 atributos puros e divergência média de seu grupo-irmão é de 9% para COI e 2,7% para os genes nucleares (Figuras 3 e 4). Os haplótipos provenientes do Solimões e do Tocantins provavelmente constituem populações de uma mesma linhagem, diferente daquela encontrada na Bacia do Orinoco. Apesar de estarem intimamente relacionadas, os resultados apontam que as diferentes regiões biogeográficas constituem uma possível barreira ao fluxo gênico entre essas linhagens. Portanto, os haplótipos do Alto Solimões + da Bacia do Tocantins-Araguaia e Bacia do Orinoco

foram consideradas espécies putativamente novas, designados como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 6, respectivamente.

Os resultados apresentados sugerem ainda que é necessário estudar mais a fundo a morfologia das populações atribuídas à *P. fitzgeraldae*. Os resultados obtidos por Luchetti (2011) indicam grande variabilidade nos valores morfométricos e merísticos para as diversas populações de *P. fitzgeraldae sensu lato*. Porém, apesar da grande variabilidade, não foi observado nenhuma descontinuidade entre as variáveis morfológicas das populações. Estas variáveis poderiam ser reavaliadas estatísticamente considerando as três linhagens encontradas nesse estudo. Essa nova análise poderia indicar diferenças que estatisticamente permitissem a diferenciação morfológica das linhagens. No atual momento, no entanto, os dados moleculares das linhagens identificadas para o Clado A2.2 não corroboram com o conceito de espécie adotado para *P. fitzgeraldae sensu* Luchetti (2011).

***Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 *sensu* Luchetti (2011)**

O relacionamento filogenético entre os haplótipos atribuídos à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4, uma espécie putativamente nova segundo Luchetti (2011), indica que o conceito desta espécie também inclui mais de uma linhagem (Figuras 2 e 6). Os exemplares provenientes do Rio Tocantins, parasitas de *Potamotrygon* sp., resultaram como grupo-irmão de *P. fitzgeraldae sensu stricto* (Figura 6, Clado A1.1) e este clado é grupo-irmão de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4, cujos haplótipos são originais do Alto Solimões e Bacia do Orinoco (Figura 6, Clado A1.2).

Luchetti (2011), descreveu *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 para abrigar os indivíduos que apresentavam ganchos laterais com duas angulações e ganchos mediais arredondados. A forma do gancho de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 é distinta daquela encontrada em *P. fitzgeraldae sensu lato* porque esta possui ganchos mediais com ângulos (Figura 5). Adicionalmente, essa espécie não apresenta farpa na extremidade distal do gancho, caráter diagnóstico de *P. fitzgeraldae* (Luchetti, 2011).

Como já foi mencionado, não foi possível visualizar a presença ou não de farpas nos *vouchers* atribuídos às três linhagens referentes à *P. fitzgeraldae sensu lato*. A atribuição dos espécimes à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 deu-se pela presença de duas angulações nos ganchos laterais, e pela presença de arredondamento da furca dos ganchos mediais quando comparado à *P. fitzgeraldae sensu lato*. O programa MorphoJ foi usado para comparar os contornos dos ganchos mediais de vários indivíduos de ambos os táxons. A imagem resultante indica que não há sobreposição completa dos contornos entre os indivíduos determinados como

P. fitzgeraldae sensu lato e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 (Figura 7). Essas características foram observadas nos *vouchers* dos dois clados referentes à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4, indicando que a identificação dos mesmos é congruente com o conceito de Luchetti (2011).

Potamotrygonocestus sp. nov. 4 provenientes do Alto Solimões e Bacia do Orinoco compõem 2 linhagens distintas. Os haplótipos amazônicos constituem o Clado A1.2.1, que possuem 3 atributos puros e divergências médias internas de 0.2% para COI e 0,1% para os genes nucleares. Os haplótipos da Bacia do Orinoco, Clado A1.2.2 possuem 2 atributos

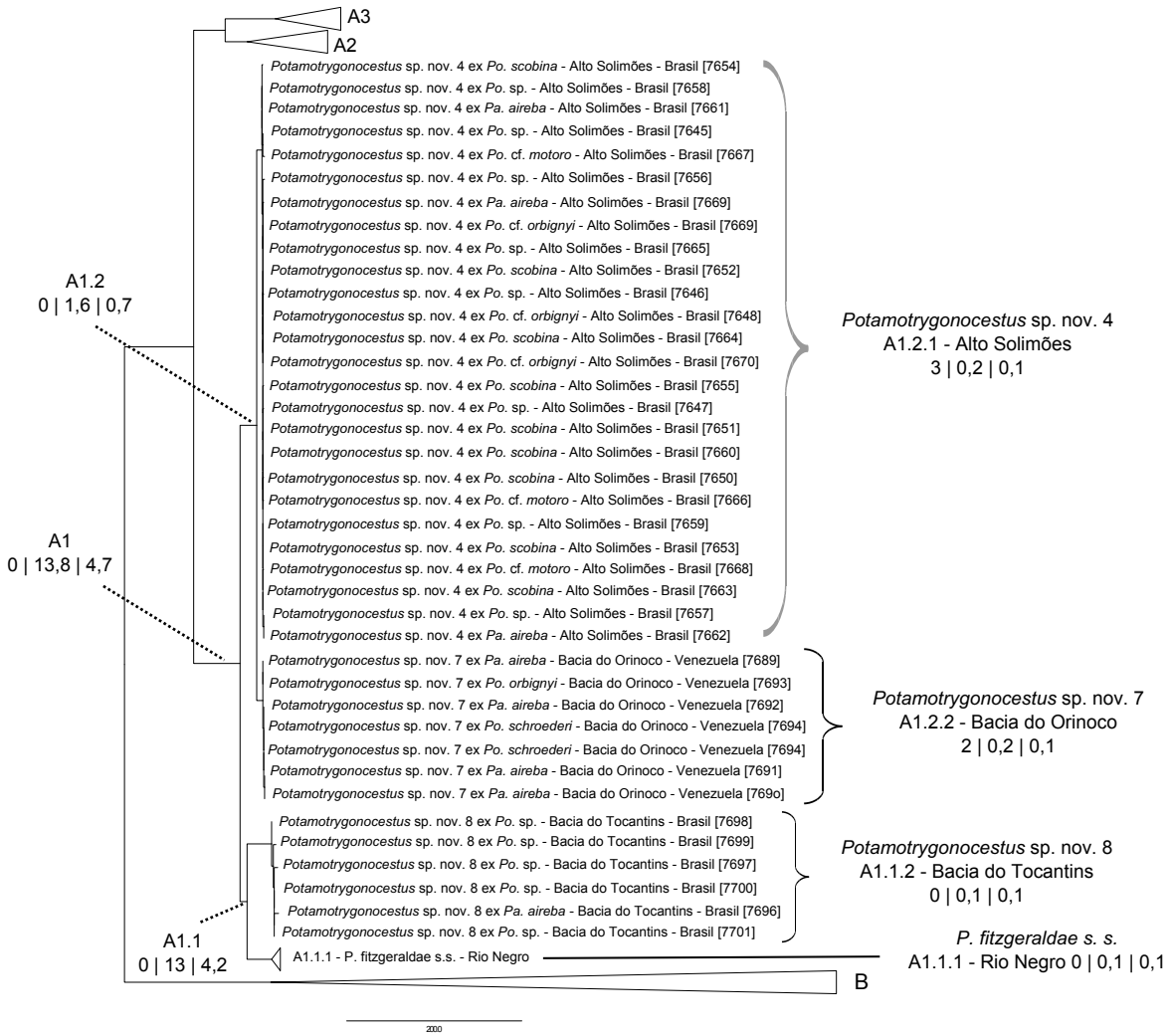


Figura 6: Relações haplotípicas das populações de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 e *P. fitzgeraldae sensu stricto*, Clado A1. Os valores em cada clado representa o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

puros e divergência de 0.1% nas duas matrizes de distâncias. O Clado A1.2.1 diverge de A1.2.2 em 1,6% e 0,7%, para COI e para genes nucleares, respectivamente. A hipótese filogenética apresenta os dois clados bem estruturados, de acordo com suas respectivas origens biogeográficas (Figuras 2 e 6). Esta estruturação biogeográfica somada à presença de atributos puros nas duas populações (veja Figura 3), indica tratar-se de espécies distintas, de acordo com o conceito de espécie considerada neste estudo. Apesar das pequenas divergências entre as sequências nucleotídicas das linhagens e a semelhante morfologia encontrada em todas as linhagens amostradas, as evidências apresentadas parecem ser suficientes para considerar as duas linhagens com espécies diferentes.

Por se tratar de uma espécie putativamente nova, será necessário reavaliar a morfologia das linhagens aqui testadas. Com as presentes evidências, deve-se reavaliar os espécimes buscando caracteres discretos, e dados morfométricos e merísticos estatisticamente significantes. Luchetti (2011) não examinou a morfologia das duas populações registradas nesse trabalho (*i.e.* Bacia do Orinoco e Bacia do Tocantins). Apesar de Luchetti (2011) ter estudado a morfologia de diversos indíviduos do Alto Solimões, este foi baseado em apenas um indíviduo imaturo da região do Rio Tocantins e nenhuma amostra da Bacia do Orinoco. Atualmente existem amostras dos mesmos hospedeiros fixadas em formalina provenientes do Rio Jutaí e de diversas localidades da Bacia do Orinoco que estão disponíveis para estudos morfológicos. Esses exemplares não

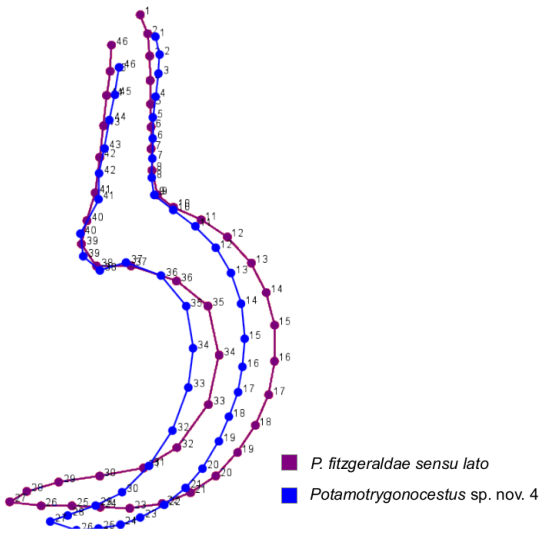


Figura 7: Sobreposição dos contornos dos ganchos mediais de *P. fitzgeraldae sensu lato* (holótipo MZUSP 5845; parátipo MZUSP 5846; *vouchers* MZUSP 7041, 7044, 7047 a,b, 7056 a,b, 7063 e 7064) e da morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 (*vouchers* MZUSP 7137, 7138 a,b, 7145 a,b, 7150 e 7154). Análise em MorphoJ sob o comando *Procrustes*

foram examinados por não fazerem parte do escopo desse trabalho. Devido ao baixo número amostral, uma outra coleta será necessária nos rios que drenam a Bacia Tocantins-Araguaia para obtenção de material fixado exclusivamente para estudos morfológicos. No momento, os únicos dados que existem sobre estas linhagens são moleculares, e os resultados obtidos nesta análise indicam que a morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 é constituída por três linhagens distintas. Assim, a linhagem do Alto Solimões provavelmente corresponde ao conceito *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 *sensu* Luchetti (2011) considerando ser a mesma região biogeográfica estudada pela autora. As duas outras linhagens, provenientes das Bacias do Orinoco e do Tocantins-Araguaia, deverão ser consideradas espécies putativamente novas, aqui designadas como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 8, respectivamente.

***Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 *sensu* Luchetti (2011)**

Potamotrygonocestus sp. nov. 3 é o único representante do gênero, endêmico da Bacia do Prata, que possui a furca do gancho inserida na região postero-lateral da base. Segundo Luchetti (2011), esta espécie é caracterizada por possuir o gancho lateral arredondado e apresentar assimetria entre os comprimentos das bases e das furcas entre os ganchos lateral e medial. Quanto à morfologia do gancho lateral, aproximadamente 60% de seu comprimento é composto pela furca. A base do gancho medial é mais longa do que a do gancho lateral. Esses atributos morfológicos permitem diferenciar os membros desta morfoespécie das demais espécies com ganchos nos quais as furcas estão inseridas na região postero-lateral da base. *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 tem ganchos laterais arredondados os quais diferem de *P. fitzgeraldae sensu lato* e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 que apresentam ganchos laterais com dois ângulos. As diferenças entre *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 e as espécies nominais *P. travassosi*, *P. chaoi*, *P. marajoara* são que nestes os comprimentos da base e furca são simétricos, enquanto que em *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 são assimétricos (mas veja a discussão de "Complexo *P. travassosi*" adiante).

Potamotrygonocestus sp. nov. 3 possui uma distribuição biogeográfica única dentre as linhagens do Clado A. Luchetti (2011) registrou *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 para várias localidades da Bacia do Prata, como Rio Mutum (localidade tipo), Rio Uruguai, Rio Paraguai e Rio Paraná, parasitando *Potamotrygon brachyura*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon* cf. *motoro*. Esses registros indicam que essa espécie é endêmica da Bacia do Prata.

A monofilia recíproca de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 não é surpresa já que a morfoespécie compartilha atributos morfológicos únicos para *Potamotrygonocestus* e está

restrita a uma única bacia (Figura 8, Clado A2.1.0). Esta linhagem apresentou divergência interna para COI de 0,7% e 0,3% para os genes nucleares e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 diverge das outras linhagens do Clado A2.2 de 17,3% e 6.1%, respectivamente. Ademais, o Clado A2.1.0 apresentou 12 atributos puros para COI (Figuras 3 e 8). Essas evidências apontam que essa morfoespécie é diferente das demais linhagens do Clado A2.2, tanto em caracteres morfológicos quanto moleculares.

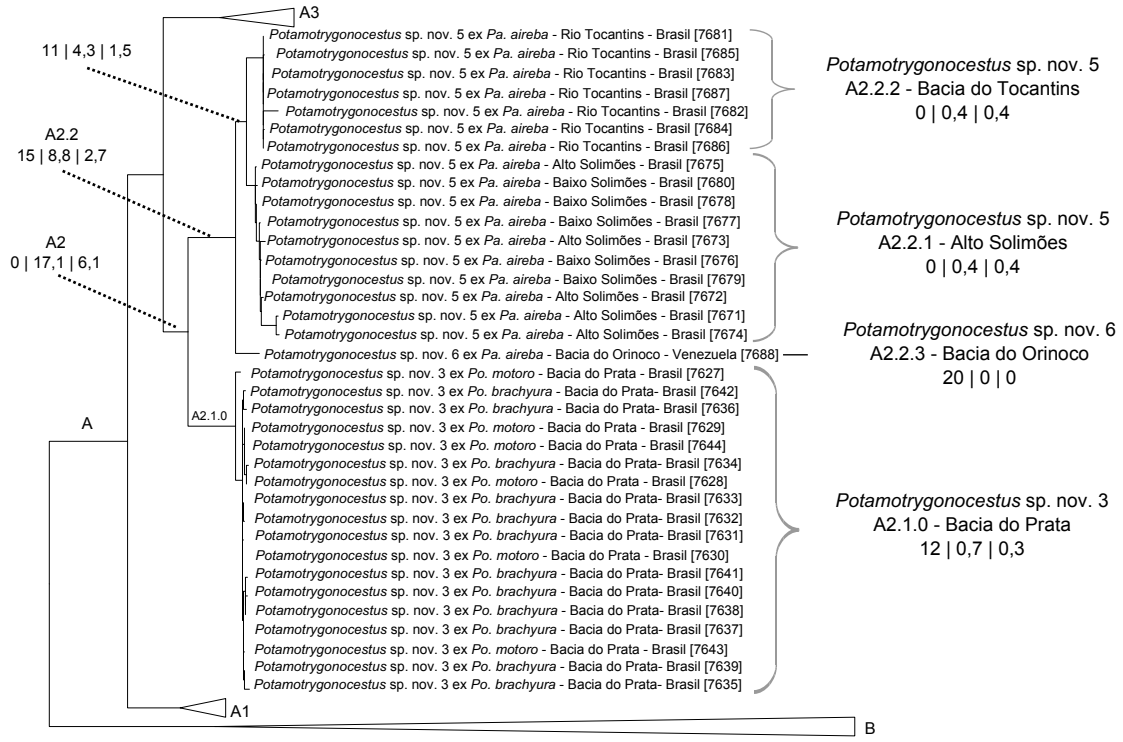


Figura 8: Detalhe da estrutura filogenética para os haplótipos do Clado A2. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

Apesar deste trabalho examinar apenas uma única localidade da Bacia do Prata (Rio Mutum/MT), a inclusão de populações de outros tributários desta bacia não deve quebrar a monofilia desta morfoespécie. Isso porque os resultados obtidos para os demais táxons dentro de *Potamotrygonocestus* indicam que quando há haplótipos de mais de uma localidade de uma mesma bacia, estes haplótipos tendem a formar um grupo monofilético (*e.g.*, *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1, Clado B1.1.0, veja discussão adiante). A ausência de monofilia recíproca foi observado apenas em táxons amostrados em mais de uma bacia.

A espécie *P. fitzgeraldae sensu lato*, por exemplo, possui uma linhagem no Rio Negro e outras duas linhagens uma no Alto/Baixo Solimões e Bacia do Tocantins outra na Bacia do Orinoco. Outro exemplo é *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 que possui duas linhagens no Alto Solimões e Bacia do Orinoco e outra linhagem na Bacia do Tocantins que não estão filogeneticamente relacionadas. Seria interessante amostrar novas localidades para aumentar a diversidade haplotípica de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 3, podendo trazer mais evidências que corroborem a monofilia desta espécie. Porém, não é esperado que esses dados possam alterar a relação filogenética apresentada para este táxon.

Complexo *Potamotrygonocestus travassosi*

Um dos resultados mais complexos deste estudo e, de certa forma, um dos mais relevantes para a taxonomia do gênero está associado aos padrões filogenéticos encontrados para clado nomeado como "Complexo *Potamotrygonocestus travassosi*" (Figura 2 e 10, Clado A3). Esse clado envolve as espécies válidas *P. chaoi* Marques *et al.*, 2003, *P. marajoara* Luchetti *et al.*, 2008 e *P. travassosi* Rego, 1979 – sendo que essa última foi considerada sinônimo sênior de *P. orinocoensis* Brooks *et al.*, 1981 nas últimas revisões do gênero (Marques *et al.*, 2003; Luchetti, 2011).

Rego (1979) descreveu a espécie *P. travassosi* para receber membros de *Potamotrygonocestus* encontrados em *Potamotrygon orbignyi*[1] do Rio Amazonas, Monte Alegre, Pará. Segundo Rego (1979:883), *P. travassosi* seria dignosticada por possuir ganchos "desproporcionais ao tamanho do estróbilo", além de outros atributos morfométricos, quando comparado à *Potamotrygonocestus magdalenensis* – a única espécie conhecida até então para o gênero. Brooks *et al.* (1981) consideraram *P. travassosi* como *species inquirenda*, porque Rego (1979) utilizou imagens de proglotides livres de *Paroncomegas araya* (Woodland, 1934), um Trypanorhyncha, em sua descrição original. Marques *et al.* (2003) reconheceram *P. travassosi* como válida, uma vez que o holótipo possuia um escólex de *Potamotrygonocestus* passível de identificação, e consideraram *P. orinocoensis* como seu sinônimo júnior. Esses autores, no entanto, reconheceram que as duas populações disjuntas – Amazônia e Orinoco – atribuídas à *P. travassosi sensu* Marques *et al.*, 2003 exibiam algumas diferenças morfométricas tais como, o tamanho das bases dos ganchos mediais e laterais (63-65 mm e 59-60 mm vs. 22-48 mm e 26-45 mm, respectivamente). Porém os autores não consideraram estes caracteres suficientes para justificar a manutenção dos dois nomes. Luchetti (2011) revisou os materiais examinados

[1] originalmente atribuida a *Paratrygon histrix* (=*Potamotrygon histrix*), uma espécie endêmica da Bacia do Prata (veja Marques *et al.*, 2003)

por Rego (1979) e Marques *et al.* (2003), além de uma vasta amostragem de exemplares do gênero, e manteve a sinonímia proposta por Marques *et al.* (2003). A autora ainda sugeriu que a presença de gancho lateral com furca arredondada, sem angulações, possuindo extremidade distal curva e voltada para a base, e gancho medial com furca arredondada, exibindo angulação na altura da inserção da furca na base e extremidade distal voltada para o lado, serviriam para diagnosticar *P. travassosi*. No entanto, Marques *et al.* (2003) e Luchetti (2011) não possuiam material adicional da localidade tipo de *P. orinocoensis*, Delta do Orinoco, Comunidade de Curiapo, Delta Amacuro, Venezuela e todas as ações taxonômicas foram baseadas na série tipo desta espécie nominal.

Potamotrygonocestus chaoi foi eregida por Marques *et al.* (2003) para abrigar, até então, os únicos membros de *Potamotrygonocestus* encontrados em *Plesiotrygon iwamae* do Baixo Solimões. Os autores compararam a morfologia de *P. chaoi* com *P. travassosi* e concluíram que a assimetria dos ganchos internos e laterais de *P. chaoi*, além de alguns atributos merísticos e morfométricos, justificariam a descrição da espécie. Anos mais tarde, Luchetti *et al.* (2008) examinaram novos exemplares desta espécie em *Plesiotrygon iwamae* proveniente do Alto Solimões. Este material adicional possibilitou aumentar a gama de atributos supostamente diagnósticos dessa espécie, tais como tamanho do estróbilo, número de proglótides, e características do aparelho reprodutor feminino e outros dados provenientes de microscopia eletrônica de varredura. Luchetti *et al.* (2008) concluíram que *P. chaoi* era distinto de *P. fitzgeraldae* e *P. travassosi* no número de proglótides e testículos, comprimento e largura do escólex (Luchetti *et al.*, 2008). Na última revisão do gênero, Luchetti (2011) analisou o mesmo material e sugeriu que *P. chaoi* era caracterizado por possuir ganchos lateral e medial com furca arredondada e extremidade distal voltada para baixo e a largura da furca constante que apenas diminui em sua parte 1/5 distal. Segundo a autora, este caráter distinguiria *P. chaoi* das espécies *P. fitzgeraldae* e *P. travassosi*. Porém esse mesmo caráter o aproxima da última espécie nominal atribuída ao gênero *Potamotrygonocestus marajoara*.

Luchetti *et al.* (2008) descreveram *P. marajoara* para receber espécimes coletados na Baía de Marajó, Baixo Amazonas em *Plesiotrygon iwamae*. Com relação às demais espécies do gênero, Luchetti *et al.* (2008) submeteram que *P. marajoara* podia ser distinguida de *P. travassosi*, *P. fitzgeraldae* e *P. chaoi* por descontinuidades merísticas e morfométricas (*e.g.* largura e comprimento do escólex e tamanho do estróbilo, número de proglótides, etc.). Luchetti (2011) analisou os ganchos de *P. marajoara* e propôs que esta espécie e *P. chaoi* possuem os ganchos mediais arredondados o que permite diferenciá-las de *P. travassosi* e *P. fitzgeraldae* – que possuem angulação no gancho medial; além da observação de que *P. fitzgeraldae* possui

uma farpa na extremidade distal da furca do gancho medial inexistente em *P. marajoara* e *P. chaoi*. No entanto, as diferenças entre *P. marajoara* e *P. chaoi* permaneceram fundamentadas em atributos merísticos e morfométricos, baseados em um número relativamente pequeno de exemplares da última espécie (6 índividuos completos de *P. chaoi* enquanto *P. marajoara* foram 104 espécimes analisadas).

As espécies nominais do complexo sofreram revisão e possuem atualmente seus conceitos baseados em atributos morfológicos contestáveis. Luchetti (2011) submeteu que as descontinuidades nos valores morfométricos e merísticos não eram informativos para distinguir espécies de *Potamotrygonocestus*. Entretanto, utilizou esses tipos de valores para diferenciar *P. marajoara* e *P. chaoi*. Considerando o baixo número amostral de *P. chaoi* (6), a autora julgou precipitado inferir que as descontinuidades desses valores não seriam informativas para estas espécies em especial. Desta forma considerou as duas espécies válidas.

O conceito da espécie *P. travassosi* sofreu alterações ao longo do seu histórico taxonômico. Esta espécie já foi distinguida das demais por atributos morfométricos e merísticos (Marques *et al.*, 2003; Luchetti *et al.*, 2008), porém o conceito atual utiliza a forma de seu gancho medial na sua diagnose (Luchetti, 2011). Segundo Luchetti (2011), *P. travassosi* difere das espécies amazônicas, *P. chaoi* e *P. marajoara*, porque estas possuem gancho medial arredondado e em *P. travassosi* ele possui angulosidade. A mesma autora considera que este mesmo caráter o aproxima fenotipicamente de *P. oriconoensis*, e por isso manteve essa espécie como sinônimo júnior de *P. travassosi*. Exceto pelo caráter "gancho medial anguloso", não há outro atributo que distingua *P. travassosi* (e, portanto, *P. oriconoensis*) de *P. chaoi* e *P. marajoara*, já que os caracteres morfométricos e merísticos não são informativos (Luchetti, 2011).

Luchetti (2011) considerou que as diferenças na forma dos ganchos seria o caráter mais diagnóstico para distinguir espécies dentro de *Potamotrygonocestus*. Para ela, estas formas dos ganchos seriam considerados caracteres "discretos" (Luchetti, 2011:77). Seguindo essa premissa, Luchetti (2011) propôs uma chave de identificação na qual contemplou todas as espécies e argumentou que, por tratar-se de estruturas esclerotizadas, o gancho não sofreria alteração na preparação permanente em lâmina e lamínula, podendo ser utilizado na obtenção de dados mais precisos. No entanto, um exame mais cuidadoso utilizando os contornos dos ganchos, demonstra que há uma sobreposição na forma do gancho entre as espécies nominais *P. travassosi*, *P. oriconoensis*, *P. chaoi* e *P. marajoara* (Figura 9). Essa sobreposição, com ajuste *Procrustes*, foi feita sem levar em consideração as dimensões dessas estruturas, apenas sua forma foi avaliada.

Esse exame com auxílio de MorphoJ demarcou os contornos de duas ou mais imagens de

cada espécie nominal, incluindo todos os holótipos. A única exceção foi *P. marajoara* cuja imagem do holótipo não apresentava a parte distal do gancho, portanto os parátipos foram submetidos a esta análise. Esta avaliação não necessita de um número amostral grande porque não se trata de testar estatisticamente se essas estruturam discriminam populações e/ou espécies e sim ilustrar como elas são semelhantes. Visto que apenas o exame dos holótipos e parátipos resulta em uma sobreposição praticamente completa dessas estruturas, não há justificativa para utilizá-lo como caráter diagnóstico para essas espécies nominais.

Como os caracteres morfológicos que distinguiam as espécies nominais não são válidos, a delimitação de espécies dentro desse grupo de *Potamotrygonocestus* considerará a hipótese filogenética obtida pela análise dos quatro genes sequenciados. Essa abordagem tem o potencial de distinguir inequivocamente mais espécies diferentes ao nível de sequências nucleotídicas (Rueckert *et al.*, 2011). A topologia apresenta cinco linhagens divergentes (Figura 2), algumas delas possuem atributos puros para COI. A divergência dos clados é congruente com sua distribuição biogeográfica (*i.e.* bacias hidrográficas), com exceção dos clados A3.3.1 e A3.3.3 que são provenientes da mesma localidade. A primeira linhagem é apresentada pelo Clado A3.1.0 do Rio Negro; a segunda A3.2.0 com exemplares do Baixo Solimões e Baixo Amazonas; a terceira A3.3.3 proveniente da Bacia do Orinoco; a quarta A3.3.2 do Alto Solimões e a última A3.3.1 procedente da Bacia do Orinoco. Todas essas linhagens estão bem delimitadas e têm possibilidade de serem consideradas espécies distintas, de acordo com o conceito utilizado nesse trabalho.

Os dados moleculares contestam o arranjo taxonômico proposto por Marques *et al.* (2003), Luchetti *et al.* (2008) e Luchetti (2011) (Figuras 10, Clado A3). A hipótese filogenética não recuperou a monofilia recíproca das espécies válidas *P. travassosi*, *P. chaoi* e *P. marajoara*. As populações referentes a *P. travassosi sensu* Luchetti (2011) estão distribuídas em três clados e em um deles os haplótipos das populações do Baixo Amazonas formavam grupos monofiléticos com haplótipos de *P. chaoi* e *P. marajoara*, impedindo a monofilia recíproca das três espécies relacionadas (Figura 10, Clado A3.2.0). Porém os outros haplótipos atribuídos a *P. travassosi* do Rio Negro e Bacia do Orinoco formaram grupos monofiléticos congruentes com seus respectivos padrões de distribuição.

Os clados recuperados na hipótese filogenética são bem estruturados apesar de não corroborarem os conceitos das espécies nominais do Complexo *P. travassosi*, Clado A3. A divergência média entre o Clado A3 e os outros clados da topologia é de 12% para COI e 4% para os genes nucleares. Dentro do complexo, os haplótipos do Rio Negro, Clado A3.1.0, grupo-irmão de todos os demais clados do complexo, são divergentes em 7,5% para COI e

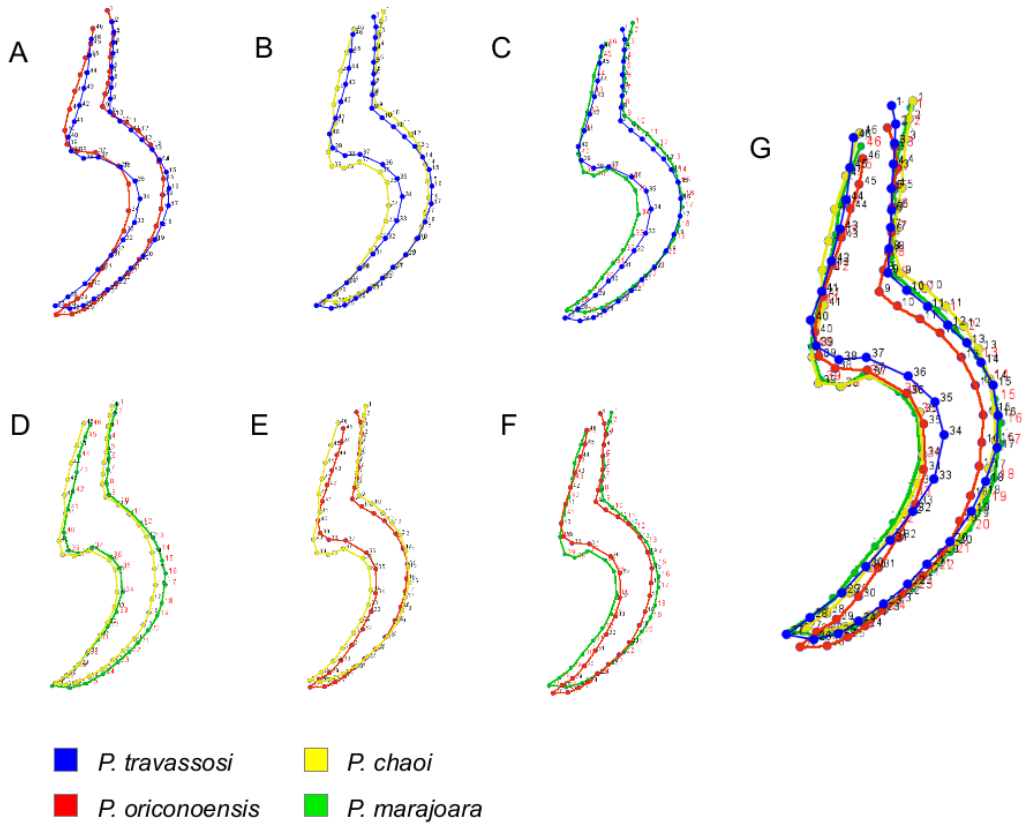


Figura 9: Sobreposição dos contornos dos ganchos mediais das espécies nominais *P. travassosi* (holótipo CHIOC 31487a, *vouchers* MZUSP 6985 e 7006); *P. oriconoensis* (holótipo USNM Helm. Coll.75713 e *voucher* MZUSP 7746); *P. chaoi* (holótipo MZUSP 5837 e parátipo MZUSP 5841) e *P. marajoara* (parátipo MZUSP 6388 e *voucher* MZUSP 7069). **A-F.** As figuras apresentam todas as combinações de sobreposições possíveis dois a dois. **G.** Sobreposição dos contornos dos ganchos das espécies *P. travassosi*, *P. oriconoensis*, *P. chaoi* e *P. marajoara* juntos. Análise em MorphoJ sob o comando *Procrustes*

3% para os genes nucleares dos demais (divergência interna de 1% e 0%, respectivamente). Estes haplótipos não possuem nenhum atributo puro. O grupo-irmão de A3.1.0, ou seja, clados A3.2.0 + A3.3, possui 1 atributo puro (Figuras 3 e 10). A análise de CAOS não encontrou nenhum atributo puro para Clado A3.2.0, sua divergência média para COI em relação ao Clado A3.3 é 7,5% e 3% para os genes nucleares (divergência média interna de A3.2.0 foi de 0% nas duas matrizes consideradas). O Clado A3.3 não possui qualquer atributo puro, porém os Clados A3.3.1 e A3.3.2 possuem 10 e 12 atributos puros, respectivamente. O único clado

em A3.3 que não possui atributos puros é o A3.3.3, grupo-irmão dos demais, que diverge deles em 8% e 3% (divergência interna de A3.3.3 é aproximadamente 0% nas duas matrizes consideradas). O Clado A3.3.1 diverge de A3.3.2 em 8% e 3% para COI e para os genes nucleares, respectivamente. As divergências médias internas de A3.3.1 é 1% e 0.5% para COI e para os genes nucleares, respectivamente, e em A3.3.2, 0% nas duas matrizes. Portanto, apesar desses valores não serem utilizados unicamente para a delimitação de espécies nesse trabalho, é notável que existe uma estruturação robusta nesses clados, não compatíveis com simples agrupamentos de populações de uma única espécie.

Um dos clados recuperados dentro do Complexo *P. travassosi* está representado por haplótipos coletados em *Potamotrygon motoro* do Rio Negro (Figura 10, Clado A3.1.0). A má conservação dos ganchos impediu uma identificação inequívoca dos indivíduos sequenciados. É possível observar, no entanto, que estes exemplares correspondem à morfologia do Clado A, pela inserção postero-lateral da furca à base. O trabalho de Luchetti (2011) analisou exaustivamente diversos hospedeiros na mesma região do Rio Negro, identificando cinco espécies/morfoespécies de *Potamotrygonocestus*: *P. amazonensis*, *P. maurae*, *P. fitzgeraldae*, *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 e *P. travassosi*. As espécies *P. amazonensis* e *P. maurae* possuem ganchos com inserção da furca centro-lateral, permitindo concluir que estes haplótipos não pertencem a estas espécies. O táxon *Potamotrygonocestus fitzgeraldae* foi atribuído para outros indivíduos desta análise, além disso esta espécie parasita primordialmente *Paratrygon aireba*, e não há registro desta espécie em *Potamotrygon motoro* (Figuras 2 e 4, discutida anteriormente). A morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 é conhecida para o Rio Negro, em um único hospedeiro não descrito (*Potamotrygon* sp. (RN04-02) Luchetti, 2011). Este hospedeiro foi coletado uma única vez e sua válvula foi fixada em formalina. Portanto, não é provável que os haplótipos sejam referentes a *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4. Luchetti (2011) examinou diversos exemplares de *P. travassosi* (MZUSP 6997-7008) todos provenientes de *Potamotrygon motoro*. As evidências que sugerem que os haplótipos sejam de uma população de *P. travassosi sensu* Luchetti (2011) estão na morfologia dos ganchos, tipo de hospedeiro e dados moleculares (o Clado A3.1.0 é grupo-irmão dos demais membros do Complexo *P. travassosi*).

O Rio Negro é uma área de endemismo segundo Hubert & Renno (2006). Vários autores já hipotetizaram que os padrões de migração ao norte dos rios da América do Sul ocorreria entre as Bacia do Orinoco e bacias amazônicas através do Rio Essequibo e não pelo sistema Canal de Casiquiare-Rio Negro (Lovejoy & Araújo, 2000; Turner *et al.*, 2004; Hubert & Renno, 2006). Os padrões filogenéticos e biogeográficos obtidos para *Potamotrygonocestus* confirmam essa

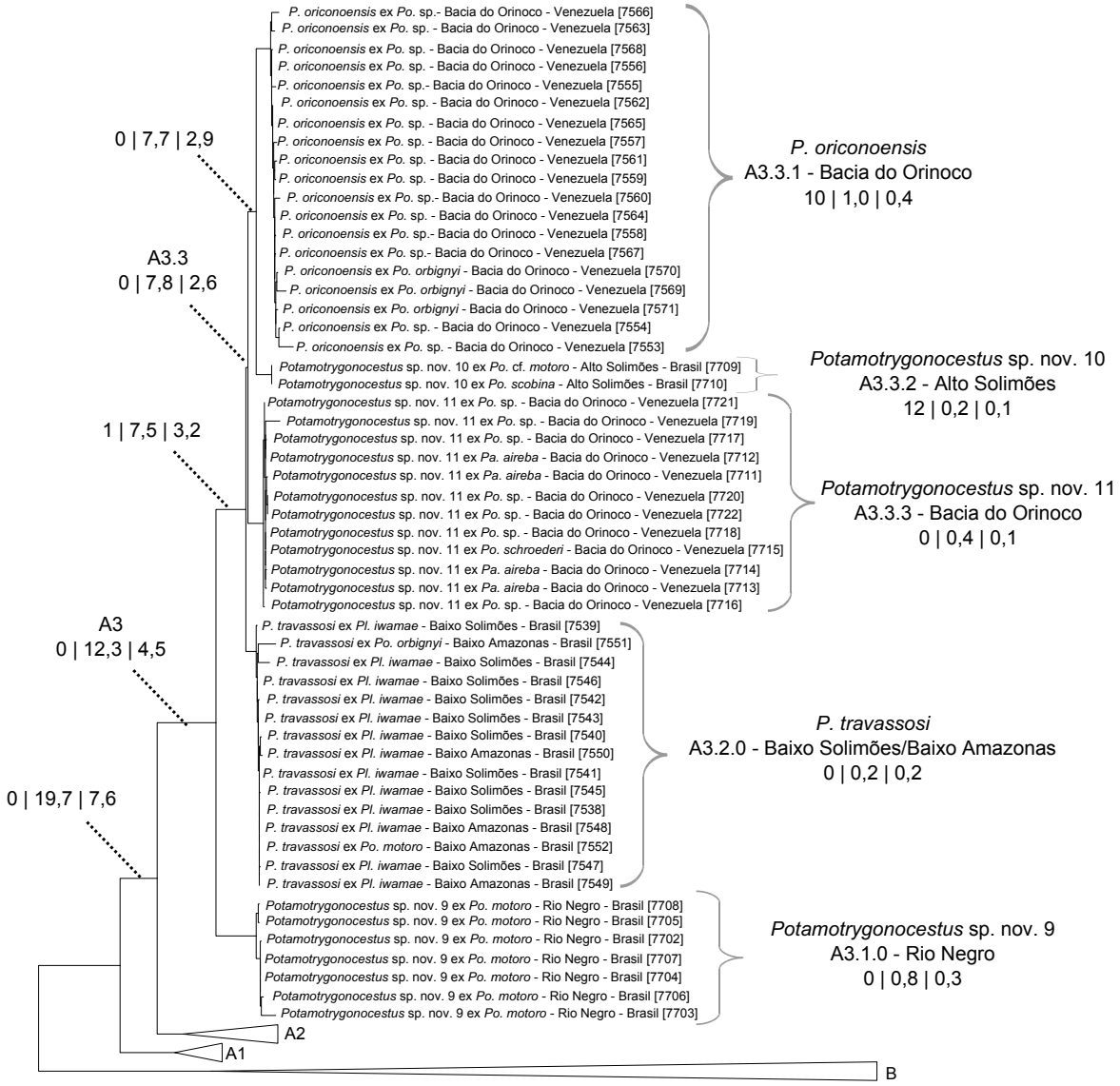


Figura 10: Detalhe da estrutura filogenética para os haplótipos e seus respectivos clados inseridos dentro do Complexo *P. travassosi*. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

hipótese pois o Clado A3.1.0 do Rio Negro é isolado das demais linhagens do Complexo *P. travassosi* de acordo com os dados moleculares. Apesar de não haver evidências morfológicas que possibilitem a delimitação de espécies dentro do complexo (Figura 9), é notável que a linhagem do Clado A3.1.0 é distinta das demais linhagens do Clado A3. Além da divergência

entre A3.1.0 e o Clado A3.2.0+A3.3 (7,5% para COI e 3% para os genes nucleares), o último clado possui 1 atributo puro enquanto que para Clado A3.1.0 nenhum foi encontrado. Baseado nos padrões biogeográficos encontrados e na hipótese filogenética, essa linhagem é considerada uma espécie putativamente nova, aqui designada como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 9.

Outro clado encontrado é formado por três espécies atualmente válidas: *P. travassosi*, *P. marajoara* e *P. chaoi* (Figura 10, Clado A3.2.0). Os haplótipos das duas primeiras espécies são provenientes da Baía de Marajó e da terceira do Baixo Solimões. Todos os *vouchers* foram examinados e identificados segundo a chave de identificação de Luchetti (2011). A identificação dos haplótipos de *P. travassosi* foi feita pela morfologia dos ganchos, localidade e hospedeiro que são semelhantes aos *vouchers* examinados em Luchetti (2011) (MZUSP 6978, 6980, 6984, 6987-6989, 6991-6996). Este estudo não conta com amostras de *P. travassosi* da localidade tipo (*i.e.* Rio Amazonas, Monte Alegre/PA). Porém como *Potamotrygonocestus* apresentam uma distribuição semelhante aos seus hospedeiros, e várias espécies de potamotrigonídeos ocorrem em toda a extensão do Rio Amazonas (Rosa *et al.*, 2010) é possível que as populações de parasitas estejam distribuídas desde o Baixo Solimões até o Baixo Amazonas. Além disso, como foi identificado haplótipos semelhantes no Baixo Solimões e Baixo Amazonas, e esta localidade tipo é posicionada intermediariamente entre os dois, provavelmente haverá uma semelhança entre os haplótipos sequenciados aos da localidade em que foi descrito *P. travassosi*. Dado os critérios já mencionados anteriormente, esses haplótipos do Baixo Amazonas serão considerados como membros de *P. travassosi sensu stricto*. A atribuição de alguns haplótipos às espécies nominais *P. marajoara* e *P. chaoi* foi baseada na morfologia, localidade e hospedeiro. Estas duas espécies são as únicas registradas para *Plesiotrygon iwamae* até o momento (Luchetti *et al.*, 2008; Luchetti, 2011). Portanto, todos estes haplótipos foram identificados *a priori* de acordo com os conceitos atribuídos às suas espécies nominais (*i.e. P. travassosi, P. chaoi* e *P. marajoara*) em trabalhos anteriores.

Os resultados apresentados (Figura 10) indicam que as espécies nominais *P. chaoi* e *P. marajoara* não estão de acordo com o conceito de espécie monofilética adotado por este trabalho, pois a monofilia recíproca dessas espécies não foi recuperada. A diferenciação morfológica dessas espécies nominais se dá por descontinuidades merísticas e morfométricas, obtidas de um baixo número de exemplares de *P. chaoi* (6) e *P. marajoara* (104). Este número amostral não é o bastante para possibilitar uma boa chance estatística de representar os valores mínimo e máximo (Marques *et. al., in prep.*) de um caráter para qualquer população (*e.g.* maior e menor comprimento do estróbilo em uma população). Adicionalmente, essas espécies não apresentaram atributos morfológicos ou moleculares que as distinguam de *P. travassosi* do

Baixo Amazonas (Figura 10, Clado A3.2.0 e Figura 9 B, C e G). Portanto, os dados moleculares indicam que as espécies *P. chaoi* e *P. marajoara* devem ser consideradas sinônimos júnior de *P. travassosi*.

A Bacia do Orinoco possuiu haplótipos que formam um grupo monofilético, juntamente com dois haplótipos do Alto Solimões (Figura 10, Clado A3.3). A identificação *a priori* dos *vouchers* destes haplótipos baseou-se na forma dos ganchos para atribuí-los a *P. travassosi*. Isso porque, como já mencionado anteriormente, Marques *et al.* (2003), baseados em dados morfológicos, considerou *P. oriconoensis* sinônimo júnior de *P. travassosi*. Além dos *vouchers*, examinou-se também outras preparações permanentes sob lâmina e lamínula a partir de material fixado em formalina dos espécimes da Bacia do Orinoco. Nesses exemplares, foi possível observar que os espécimes possuiam ganchos com forma semelhante ao holótipo de *P. oriconoensis*. Adicionalmente, tantos os exemplares fixados em álcool quanto em formalina foram coletados na localidade tipo de *P. oriconoensis* ou próximo à ela (*i.e.* Delta do Orinoco, Figura 1).

Os dados moleculares indicam que *P. oriconoensis* deve ser considerada como espécie válida apesar da identificação dessa espécie na topologia ainda ser ambígua. O Clado A3.3 é composto por três subclados: A3.3.1 da Bacia do Orinoco, grupo-irmão de A3.3.2 do Alto Solimões, este clado (A3.3.1 + A3.3.2) é grupo-irmão de A3.3.3 também da Bacia do Orinoco. O Clado A3.3.1 diverge de A3.3.2 em 8% para COI e 3% para os genes nucleares. O Clado A3.3.3 diverge de A3.3.1+ A3.3.2 em 8% para COI e 3% para os genes nucleares (Figura 10). Estas divergências entre os clados são relativamente altas considerando tratar-se de populações, pois métodos que utilizam Barcode indicam uma distância de 2% (K2P > 0.02) para determinar espécies (considerando que todos os membros dessa espécie possuem divergência interna < 2%, veja Hebert *et al.*, 2003). Ademais, o Clado A3.3.1 possui 10 atributos puros enquanto que para o Clado A3.3.3 (outro clado proveniente da Bacia do Orinoco) nenhum foi encontrado. Apesar da ausência de atributos puros nesta última, essas evidências sugerem que essas linhagens são diferentes.

Essa ditribuição geográfica comum das duas linhagens na Bacia do Orinoco as tornam linhagens simpátricas. Ambas são encontradas no Rio Orinoco na região de Curiapo. Curiosamente neste local alguns haplótipos de ambas linhagens foram coletadas nos mesmos exemplares de hospedeiros (VZ13-59 e VZ13-63), *Potamotrygon* sp.. É possível notar também que alguns espécimes de A3.3.3 parasitam *Paratrygon aireba*, hospedeiro que possui hábitos marcadamente distintos dos demais Potamotrygonidae (Shibuya *et al.*, 2009; Lasso *et al.*, 1996; Rincon-Filho, 2006). Esses dados são muito interessantes porque mostram que duas linhagens

distintas, com morfologia muito semelhantes, podem ocorrer na mesma localidade e infectando o mesmo indíviduo.

Brooks *et al.* (1981) descreveram a espécie *P. oriconoenis* coletada em *Po. orbignyi* no Rio Orinoco, Curiapo. Não é possível afirmar, sem reexaminar a série tipo e o material recentemente coletado, qual das duas linhagens representadas na hipótese filogenética corresponde ao conceito *P. oriconoenis* Brooks *et al.*, 1981. No entanto, a linhagem do Clado A3.3.1 possuiu haplótipos coletados em *Po. orbignyi* enquanto o Clado A3.3.3 não possuiu nenhum exemplar parasitando este hospedeiro. Essa observação pode indicar que a espécie *P. oriconoenis* corresponde à linhagem A3.3.1.

A linhagem do Clado A3.3.2 deve ser considerada uma espécie putativamente nova. O Clado A3.3.2 possui 12 atributos puros, e apesar de contar com apenas 2 haplótipos, é possível identificá-los molecularmente como uma linhagem distinta daquelas da Bacia do Orinoco. O que não é supreendente pois esses encontram-se em outra região biogeográfica (Alto Solimões). Portanto, este trabalho apresenta o primeiro registro de uma linhagem com a morfologia semelhante aos outros espécimes do Clado A3 na região do Alto Solimões.

A hipótese filogenética identificou, portanto, que existem cinco linhagens diferentes no Complexo *P. travassosi*. No entanto, essas linhagens não estão totalmente em conformidade com os conceitos atribuídos às espécies nominais discutidas acima. O novo conceito de *P. travassosi* implicará na redução de sua distribuição biogeográfica registrada para a espécie, retirando-se as localidades do Rio Negro, Bacia do Orinoco e Alto Solimões. A linhagem ficaria restrita aos domínios de águas brancas da Bacia do Amazonas. *P. oriconoenis* deverá ser considerada espécie válida, e assinalada a uma das duas linhagens reconhecidas do Orinoco, pelos dados moleculares. No entanto, o conceito de *P. travassosi* receberá outras duas sinonímias júniors: *P. chaoi* e *P. marajoara*, aumentando as espécies de hospedeiros para esse parasita.

Três linhagens serão consideradas espécies putativamente novas. A linhagem do Rio Negro, *Potamotrygonocestus* sp. nov. 9, a linhagem do Alto Solimões *Potamotrygonocestus* sp. nov. 10 e uma das linhagens provenientes da Bacia do Orinoco *Potamotrygonocestus* sp. nov. 11. Embora haja caracteres moleculares para diagnosticar essas linhagens, seria prudente revisitar a morfologia destes clados na busca de caracteres morfológicos que se apresentem congruentes com os padrões filogenéticos encontrados. Luchetti (2011) sugeriu que o uso dos padrões morfológicos das microtríquias poderia ser uma caminho interessante para a taxonomia de *Potamotrygonocestus*. Infelizmente a autora não possuia amostras suficientes para o estudo dessas estruturas. Talvez o exame dessas estruturas possa trazer resultados que ajudem a

diferenciar morfologicamente essas linhagens que são distintas filogeneticamente.

Clado B

O Clado B é formado por linhagens que estão distribuídas por todas as bacias hidrográficas neotropicais (Figura 2) e é composto por espécies de *Potamotrygonocestus* que possuem a furca do gancho inserido na região central da base. Atualmente, para este grupo morfológico apenas três espécies estão formalmente descritas (*i.e.*, *P. amazonensis*, *P. magdalenensis* e *P. maurae*) e duas morfoespécies aguardam descrição (*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, *sensu* Luchetti, 2011). Destas cinco linhagens reconhecidas, três estão representadas neste estudo, além de algumas linhagens putativamente novas. Para todas elas, os dados moleculares corroboram sua monofilia e indicam que para alguns clados há evidência de estruturação biogeográfica de espécies com ampla distribuição.

Potamotrygonocestus sp. nov. 1 *sensu* Luchetti (2011)

Haplótipos atribuídos à espécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 resultaram em um grupo monofilético grupo-irmão de todas as demais linhagens inseridas no Clado B (Figuras 2 e 11, Clado B1). Luchetti (2011) concebeu esta morfoespécie para receber indivíduos de *Potamotrygonocestus* que possuiam ganchos simétricos no qual a largura da furca diminui imediatamente após sua inserção à base do gancho o que contrapõe as demais espécies atribuídas ao grupo em que a diminuição da largura da furca só ocorre na parte distal da mesma. Adicionalmente, o poro genital encontra-se na altura do ovário, nunca ultrapassando o limite posterior dos lobos ovarianos, além da presença de microtríquias conspícuas na região de crescimento do estróbilo. A autora atribuiu como localidade tipo o Rio Salobra/MS na Bacia do Prata para abrigar os *vouchers* examinados por Marques *et al.* (2003). Estes autores haviam considerado esses exemplares representantes de *P. amazonensis*, mesmo reconhecendo que esta espécie poderia representar um complexo de espécies.

Potamotrygonocestus sp. nov. 1 é a única morfoespécie de *Potamotrygonocestus* encontrada em todas as bacias amostradas, ou seja, Bacias do Prata, Amazônica, Tocantins-Araguaia e do Orinoco. Luchetti (2011) havia estudado os espécimes provenientes apenas das Bacias do Prata e Amazônica e não encontrou qualquer atributo morfológico correlacionado com os padrões de distribuição. Os dados moleculares, no entanto, mostram estruturação genética entre as populações amostradas (Figura 11, Clado B1). Como pode ser observado, os haplótipos coletados em *P. motoro* da Bacia do Prata – Rio Mutum e Salobra, tributários do Paraguai – (9), em *Potamotrygon* sp. do Rio Negro (6), em *Potamotrygon* sp. do Rio Tocantins (2)

e em *Potamotrygon orbignyi* do Rio Apure – tributário do Orinoco – (2) formaram clados independentes, embora sustentados por ramos relativamente curtos.

Representantes desse táxon apresentam características morfológicas únicas dentro de *Potamotrygonocestus*. Os *vouchers* que compõe esse clado possuem microtríquias conspícuas na região de crescimento do estróbilo e o poro genital na altura do ovário, já seus ganchos nem sempre estavam passíveis de análise. Por esses atributos, os haplótipos de todas as bacias amostradas foram considerados *a priori* membros de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1.

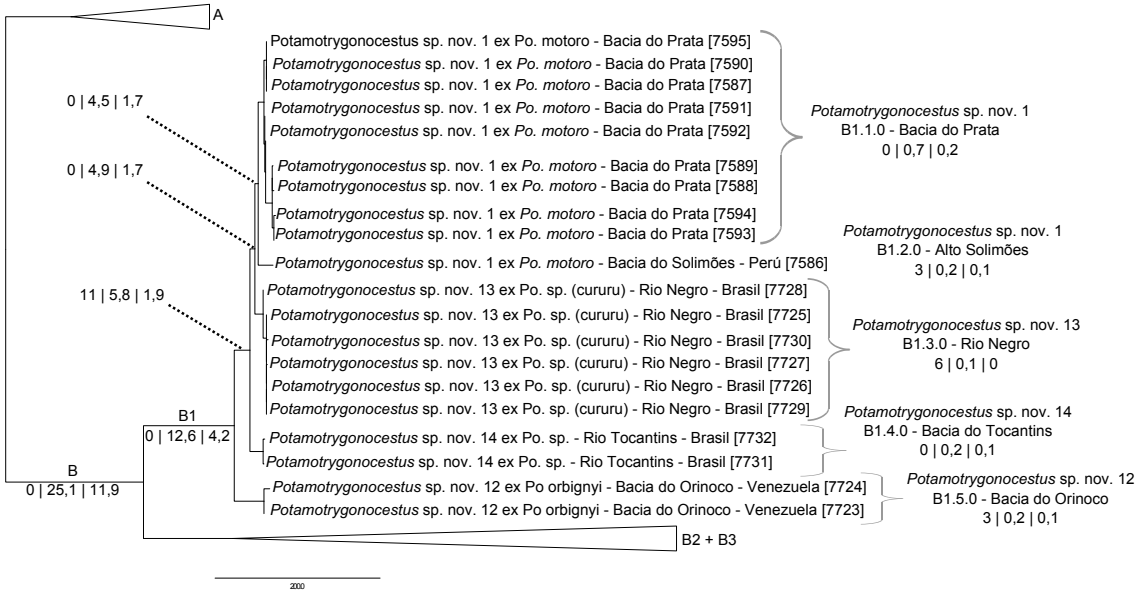


Figura 11: Detalhe da estrutura filogenética para os haplótipos das diferentes linhagens do Clado B1. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

Para fins de análise, o Clado B1 foi subdividido em subclados de acordo com sua distribuição. O Clado B1.5.0 pertence aos haplótipos da Bacia do Orinoco, esse clado apresenta 16 atributos puros em COI e divergência interna de 1% para COI e 0% para os genes nucleares (Figuras 3 e 11). Este clado é grupo-irmão de todo o restante e divergente em 12% para COI e 4% para os genes nucleares. Seu grupo-irmão é composto pelos demais haplótipos de B1 e possui 11 atributos puros. A demarcação feita pelos atributos puros que suportam cada um dos clados, a divergência que ocorre entre os grupos somado à distribuição geográfica, permitem sugerir que os haplótipos B1.5.0 da Bacia do Orinco pertencem a uma linhagem distinta das demais de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1. Portanto, foi considerada uma espécie

putativamente nova e designada como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 12.

O clado restante é formado por haplótipos da Bacia do Prata, Alto Solimões, Bacia do Tocantins e Rio Negro (Figura 11). O Clado B1.4.0, grupo-irmão dos demais, é representado por haplótipos da Bacia do Tocantins. Este clado não apresentou atributo puro e nenhuma divergência interna genética. A divergência entre B1.4.0 e o outro clado foi de 6% para COI e 2% para os genes nucleares. Os haplótipos do Rio Negro formam o Clado B1.3.0, grupo-irmão dos haplótipos da Prata + Alto Solimões. O grupo do Rio Negro apresentou 6 atributos puros e nenhuma divergência interna aproximadamente nula, porém divergiu dos demais haplótipos em 4,5% para COI e 1,5% para os genes nucleares. A presença de atributos puros neste clado indica que essa linhagem pode ser diagnosticada molecularmente. Este resultado permite conjecturar que o Clado B1.3.0 é uma linhagem à parte de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1. Além disso, o Rio Negro constitui uma área de endemismo e essa informação deve ser considerada para indicar essa linhagem como uma espécie putativamente nova, *Potamotrygonocestus* sp. nov. 13. Consequentemente, o Clado B1.4.0 do Tocantins também representa outra espécie putativamente nova, de acordo com o conceito de espécies monofiléticas aplicado nesse trabalho, identificada como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 14.

A última linhagem desse Clado B1 é a formada pelos haplótipos provenientes da Bacia do Prata (Clado B1.1.0) e um haplótipo do Alto Solimões (Clado B1.2.0). Esse clado não possui nenhum atributo puro e o subclado B1.1.0 diverge de B1.2.0 em 4,5% para COI e 2% para os genes nucleares. A divergência interna de B1.1.0 é de 1% para COI e 0% para os genes nucleares, em B1.2.0 só há um haplótipo. Como Luchetti (2011), esse trabalho encontrou uma estreita relação entre essas populações. Todas as análises feita neste estudo corroboraram a relação filogenética entre esses clados (veja Figuras A.17 e A.18, consensos estritos em Anexo). As evidências apresentadas não permitem diferenciar as duas linhagens como espécies diferentes. Essa observação não é nova para grupos parasitas de Potamotrygonidae. Cardoso (2010); Bueno (2010) e Machado (2012) já haviam encontrado padrões similares para *Acanthobothrium quinonesi* e *Rhinebothroides*. Domingues & Marques (2010) também reportaram essa distribuição para espécies de *Potamotrygonocotyle* monogenóides parasitas de arraias da mesma família. As evidências até o momento sugerem que os dois clados fazem parte do mesmo conceito da espécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 *sensu* Luchetti (2011).

O Clado B1 possui portanto quatro espécies putativamente novas, antes identificadas como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1. A estruturação biogeográfica evidenciada na hipótese filogenética permitu delimitar populações dentro do Clado B1. No final, chegou-se à três espécies putativamente novas: *Potamotrygonocestus* sp. nov. 12 da Bacia do Orinoco,

Potamotrygonocestus sp. nov. 13 do Rio Negro e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 14 da Bacia do Tocantins-Araguaia. Além disso, os resultados indicam que a morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 esta distribuída na Bacia do Prata (localidade tipo) e em parte da Bacia Amazônica, como havia sugerido Luchetti (2011).

***Potamotrygonocestus maurae* Marques *et al.*, 2003**

O Clado B2 é formado por haplótipos que possuem o mesmo morfotipo da espécie válida *Potamotrygonocestus maurae* (Figura 12). Marques *et al.* (2003) descreveram *P. maurae* para abrigar espécimes coletados em *Potamotrygon orbignyi* do Rio Negro nos quais a vitelária ultrapassa os limites posteriores dos lobos ovarianos, em contraste com as demais espécies do gênero nas quais a vitelária se estende até no máximo o nível do istmo ovariano. Luchetti (2011) adicionou à diagnose desta espécie atributos relacionados à morfologia dos ganchos, pois os espécimes analisados por Marques *et al.* (2003) possuiam ganchos quebrados e estavam mal posicionados nas lâminas. Segundo a autora, *P. maurae* possui os ganchos lateral e medial com furcas simétricas e com angulações, tornando-se retas logo após essas angulações. A espécie, portanto, possui pelo menos dois caracteres conspícuos que a distingue das demais.

O presente trabalho analisou haplótipos identificados como *P. maurae* do Rio Negro (Clado B2.1.0) e Delta do Rio Orinoco (Clado B2.2.0). A hipótese filogenética para esses haplótipos indica que cada uma das populações forma um grupo monofilético. O caráter "extensão da vitelária ultrapassando o nível dos lobos ovarianos" possibilitou a identificação desses haplótipos.

Apesar da morfologia singular, o Clado B2 e seus subclados não possuem qualquer atributo puro para COI. Apesar disso, o clado está isolado filogeneticamente das outras linhagens de *Potamotrygonocestus* com uma divergência em relação ao Clado B3 de 25% para COI e 12% para os genes nucleares (Figura 2). Não resta dúvidas de que o Clado B2 é bem sustentado por dados morfológicos e moleculares.

Dentro desse clado há duas linhagens de bacias distintas e divergentes entre si. O Clados B2.1.0 do Rio Negro diverge de B2.2.0 da Bacia do Orinoco em 12% para COI e 3,5% para os genes nucleares, e os dois possuem divergências internas de 0,5% para COI e 0% para os genes nucleares. Considerando que outras linhagens dentro de *Potamotrygonocestus* que foram elevadas à nível de espécie possuíam divergência média menor ou próxima a esses valores (como *P. oriconoensis* que diverge das demais linhagens em 7,7% e 2,9% ou ainda *P. fitzgeraldae s.s.* que divergem da linhagem nova do Tocantins em 13% e 4,2%, para COI e para os genes nucleares, respectivamente), essas distâncias são relativamente altas. O

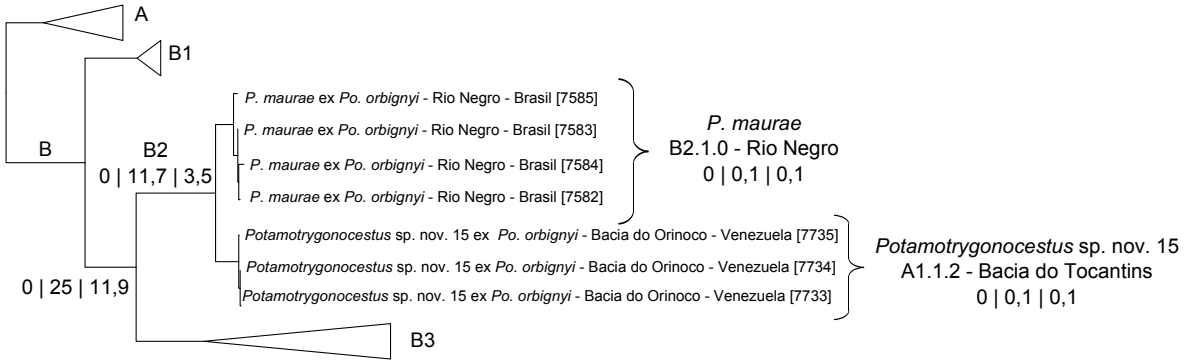


Figura 12: Detalhe da estrutura filogenética para os haplótipos das linhagens do Clado B2. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

fato de que uma das populações é proveniente do Rio Negro poderia explicar a divergência encontrada. Sendo essa área uma região de endemismo, as espécies ali presentes tendem a ser molecularmenre distintas das outras linhagens residentes em outras localidades. Este foi o caso de várias linhagens identificadas neste estudo: *P. fitzgeraldae s.s.* (Clado A1.1.1), *Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 (Clado A3.1.0) e do *Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 (Clado B1.3.0). O que indica que estas linhagens provenientes das águas negras são distintas das demais. A Bacia do Orinoco também é considerada área de endemismo (Lima & Ribeiro, 2011). À semelhança das linhagens do Rio Negro, todas as linhagens de *Potamotrygonocestus* obtidas da Bacia do Orinoco também foram consideradas distintas molecularmente das demais populações que estão relacionadas filogeneticamente como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 6 (Clado A2.2.3) e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 12 (Clado B1.5.0), entre outros. Esses exemplos ilustram que a diferença molecular encontrada entre as linhagens do Clado B2 também foi encontrada em outras linhagens do mesmo gênero.

Nenhum outro clado dentro de *Potamotrygonocestus* possui uma sinapomorfia morfológica putativa tão evidente quanto o Clado B2. Porém os espécimes da Bacia do Orinoco não foram exaustivamente examinados, apenas os *vouchers*, identificando o caráter já mencionado acima. É possível que haja diferenças morfológicas entre a linhagem da Bacia do Orinoco e linhagem do Rio Negro mas que não foram observadas no presente estudo. A Bacia do Orinoco foi amostrada há pouco tempo e não houve a oportunidade de montar lâminas permanentes

de todos morfotipos encontrados em formalina. O exame da morfologia dos exemplares, recentemente coletados no Rio Orinoco, foge do escopo deste trabalho. Somente o estudo detalhado deste material poderá revelar a existência de atributos discretos ou mesmo de algum dado morfométrico e merístico que possa ser útil na diferenciação destas populações. No momento, a hipótese filogenética indica que existem duas linhagens diferentes: uma que está coerente com o conceito de *Potamotrygonocestus maurae* Marques *et al.*, 2003 e outra que deve ser atribuída a uma nova espécie, *Potamotrygonocestus* sp. nov. 15.

***Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 *sensu* Luchetti, 2011 e *Potamotrygonocestus* spp.**

O último clado abordado aqui é composto por linhagens cujos haplótipos são provenientes de quatro bacias distintas (Figura 13, Clados B3.1 e B3.2). Haplótipos provenientes da Bacia do Orinoco e Alto Solimões formam o Clado B3.1 (B3.1.1 e B3.1.2, respectivamente) e haplótipos da Bacia do Prata e do Tocantins-Araguaia o Clado B3.2 (B3.2.1 e B3.2.2, respectivamente). Esse grupo é formado por três linhagens cujas espécies são putativamente novas e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 que aguarda descrição formal (Luchetti, 2011).

O Clado B3.1.1 é formado por um morfotipo que não foi recuperado em válvulas da mesma espécie hospedeira fixadas em formalina da mesma região. Todo o trabalho de identificação baseou-se nos espécimes destinados à análise de sequências nucleotídicas. Separou-se um único indíviduo, MZUSP 7744, para identificação dos haplótipos obtidos para este clado (Figura 13, Clado B3.1.1 e Figura 14 A, E, G). Todos os demais foram segmentados para extração de DNA e preparação dos *vouchers*. O exemplar possui comprimento total 6,28 mm, 27 segmentos, 3 proglótides maduras, estróbilo acráspedoto e apolítico. O poro genital está situado na região da extremidade distal (Figura 14 G). O morfotipo possui ganchos com a morfologia semelhante às demais linhagens do Clado B, ou seja, furcas inseridas centro-lateralmente à base. Todos os ganchos dos espécimes montados estão quebrados. A fixação em etanol 100% desidrata os ganchos, deixando-os frágeis, quando comparados aos exemplares fixados em formalina. Apenas um gancho medial do exemplar MZUSP 7736 está inteiro e paralelo à lamínula (Figura 14 B). A furca desse gancho possui uma angulação e sua largura não diminui imediatamente após sua inserção.

O morfotipo possui características semelhantes à *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 *sensu* Luchetti (2011). Consequentemente, distanciando-o das demais espécies/morfoespécies que também possuem a inserção da furca centro-lateralmente à base do gancho. Até o momento, além de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, mais quatro espécies que possuem esse caráter são conhecidas: *P. magdalenensis*, *P. amazonensis*, *P. maurae* e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1

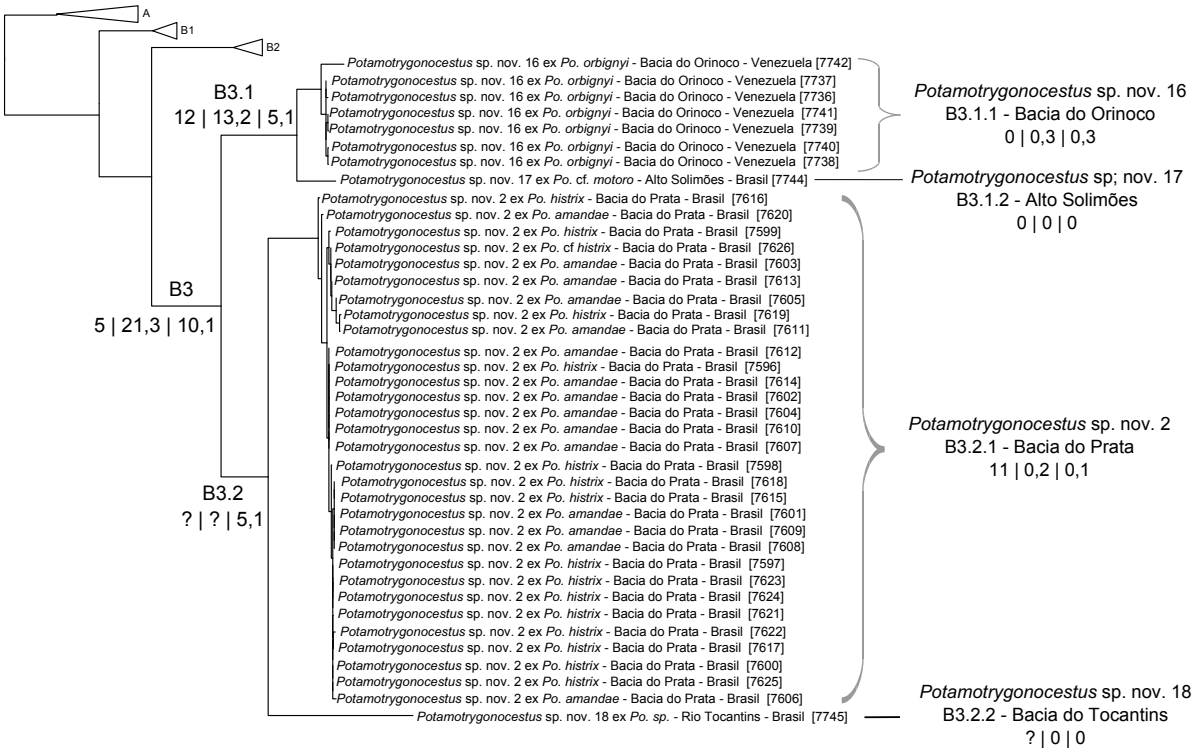


Figura 13: Detalhe da estrutura filogenética para os haplótipos das linhagens do Clado B3. Os valores em cada clado representam o número de atributos puros, divergência média para COI e divergência média para os genes nucleares, respectivamente (divergências em porcentagem). Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

(Luchetti, 2011). Nenhuma dessas quatro correspondem a morfologia do exemplar.

O exemplar não deve ser *P. magdalenensis* porque esta espécie é endêmica da região do Rio Magdalena, Colômbia (Brooks *et al.*, 1981), e esta região não foi amostrada neste estudo. O exemplar diferencia-se de *P. amazonensis* porque esta espécie possui ganchos com furcas simétricas e arredondados (Figura 14 C; Luchetti, 2011) e o exemplar amostrado na topologia possui ganchos com ângulos na furca. O espécime diferencia-se também de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 pela ausência de microtríquias conspícuas na região de crescimento do estróbilo (Figura 14 E, F) e a largura da furca não diminuiu imediatamente após inserção à base, e porque esta morfoespécie é euapolítica enquanto o morfotipo encontrado possui proglólites maduras. Este último caráter não costuma ser usado para identificação, porém entre os diversos espécimes de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 examinados, nunca foi encontrada uma proglólide madura fixa ao estróbilo (Luchetti, 2011). Finalmente, esse exemplar não pode ser atribuído a *P. maurae*, porque a vitelária do espécime não ultrapassa o nível do

istmo do ovário (Marques *et al.*, 2003), diagnóstico para a espécie.

No entanto, o exemplar é semelhante a *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 pela morfologia dos ganchos, posição do poro genital, atributos merísticos e por caracteres moleculares. Observando a morfologia do gancho do morfotipo encontrado, é possível notar que a furca é arredondada logo após a angulação, assim como ocorre em *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 (Figura 14 B, D). Nos dois morfotipos, o poro genital está situado na extremidade distal (Figura 14 G, H). Os dois também se assemelham quanto ao número de proglótides 9-27 (17 ± 5, n=47) e número de testículos 9-37 (24 ± 4, n=235) em *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 (Luchetti, 2011) vs 27 (n=1) e 23 (n=1) no exemplar da Bacia do Orinoco, respectivamente. No entanto o exemplar é maior em comprimento, 6,28 mm (n=1) em relação a *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, 1,27-4,39 mm (2,75 ± 0,79, n=50) (Luchetti, 2011). Adicionalmente, evidências obtidas pela análise cladística das sequências nucleotídicas de haplótipos de ambas localidades sugerem que as duas linhagens formam um grupo monofilético.

O Clado B3.1 é distinto molecularmente de B3.2. Evidências nucleotídicas sugerem que o Clado B3.1 diverge de B3.2 em 20% para COI e 10% para os genes nucleares. Além disso, a análise de CAOS identificou 12 atributos puros para B3.1 e 11 para B3.2.1 (o haplótipo da Bacia do Tocantins não possui sequência em COI, portanto não foi analisado por este programa). Dado que essas linhagens são provenientes de regiões biogeográficas distintas e as evidências sugerem que essas linhagens são molecularmente distintas, possivelmente essas linhagens não correspondem a simples distribuição de populações de uma mesma espécie.

Há duas linhagens que compõe do Clado B3.1. Os haplótipos da Bacia do Orinoco, Clado B3.1.1, não possui divergência genética relevante. O Clado B3.1.1 diverge de B3.1.2 do Alto Solimões em 13% para COI e 5% para os genes nucleares. Apesar desse estudo só ter amostrado um haplótipo dessa linhagem no Alto Solimões, a hipótese filogenética sugere que esta linhagem é diferente geneticamente dos haplótipos da Bacia do Orinoco. Esses haplótipos são provenientes de regiões biogeográficas distintas e a divergência encontrada indica que teve seu fluxo gênico interrompido com o isolamento dessas bacias há 9 Ma (Albert *et al.*, 2006). Portanto, as duas linhagens devem ser consideradas como espécies putativamente novas, aqui designadas como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 16, haplótipos da Bacia do Orinoco e *Potamotrygonocestus* sp. nov. 17, o haplótipo do Alto Solimões.

A morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 proveniente da Bacia do Prata compõe o Clado B3.2.1 (Figura 13). Estes helmintos foram considerados uma nova espécie por Luchetti (2011) por possuirem ganchos simétricos com pequena angulação na região central da furca, na altura da inserção da base e forma arredondada até a região distal. Além disso,

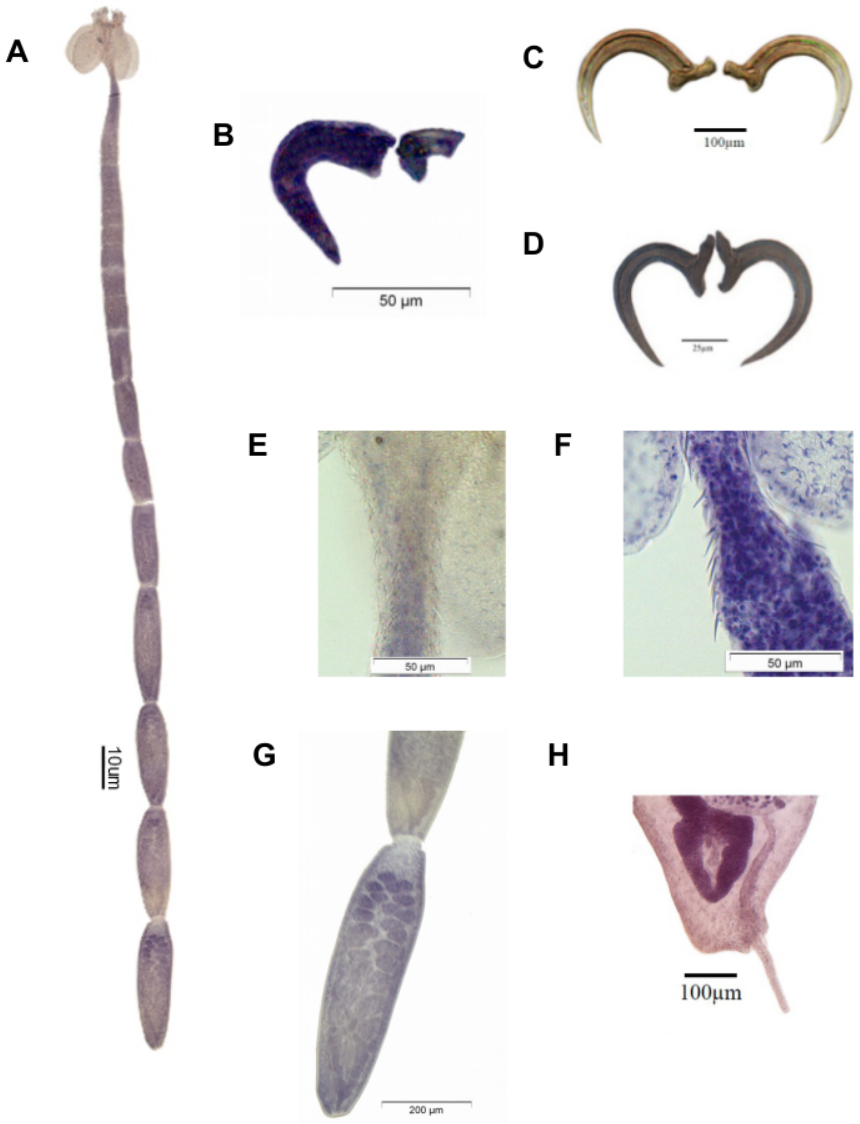


Figura 14: Comparação morfológica entre o espécime identificado como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 coletado na Bacia do Orinoco e as outras espécies do Clado B. **A.** Indivíduo completo de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 16, MZUSP 7743; **B.** Detalhe do gancho medial (MZUSP 7736); **C.** Detalhe do gancho de *Potamotrygonocestus amazonensis*, modificada de Luchetti (2011:27); **D.** Detalhe do gancho de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, MZUSP 7098, modificada de Luchetti (2011:60); **E.** Detalhes das microtríquias do espécime MZUSP 7743; **F.** Detalhes das microtríquias de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1, MZUSP 7592; **G.** Detalhe da proglótide terminal, evidenciando o poro genital na extremidade distal do exemplar MZUSP 7743. **H.** Detalhe da proglótide terminal, evidenciando o poro genital na extremidade distal de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, MZUSP 7103, modificada de Luchetti (2011:60)

em *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 o poro genital está na altura do limite posterior dos lobos ovarianos. Os atributos acima podem ser usados para diferenciar *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 de *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 porque nesta a largura da furca diminui imediatamente após sua inserção à base do gancho e o poro genital encontra-se na altura do ovário. *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1, assim como *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, é encontrado na Bacia do Prata.

Os resultados de CAOS revelaram que essa linhagem possui 11 atributos puros em COI. A divergência interna foi de 0,2% para COI e 0,1% para os genes nucleares. Essa morfoespécie foi a única que possui gancho com a furca inserida na região centro-lateral da base registrada por Luchetti (2011) que é endêmica da Bacia do Prata. A linhagem forma um clado isolado das demais linhagens de B3. O Clado B3.2.1 diverge de B3.2.2 em 5% nos genes genes nucleares, este último clado não possui sequência nucleotídica de COI. A divergência encontrada nessa matriz de dados genes nucleares entre os haplótipos de bacias diferentes corrobora que a linhagem *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 está restrita à Bacia do Prata.

Apenas um exemplar foi encontrado na Bacia do Tocantins-Araguaia, Clado B3.2.2. A baixa representatividade desta linhagem é evidenciada pelo fato de que nem o trabalho mais exaustivo em relação à amostragem de Luchetti (2011) registrou esse morfotipo para esta bacia. Infelizmente, o estado de fixação do exemplar não permitiu a identificação do terminal pois não foi possível examinar com precisão a morfologia dos ganchos. Soma-se a isso o fato de que não foi possível obter cromatogramas de COI passíveis de análise. No entanto, as sequências dos outros marcadores nucleares são boas e bem variadas, apresentado divergência entre o Clado B3.2.2 e o Clado B3.2.1 de 5%, mesmo diante do fato de que esses marcadores apresentam menor variação quando comparado aos genes mitocondriais. A maior variabilidade dos marcadores mitocondriais acontecem porque eles possuem um *Ne* (tamanho da população efetiva) menor do que os marcadores nucleares (Sunnucks, 2000). Outra evidência é a presença de 11 atributos puros no Clado B3.2.1, seu grupo-irmão, indicando que é uma linhagem isolada desse haplótipo do Clado B3.2.2. Essas evidências moleculares somadas às diferentes distribuições biogeográficas das linhagens parecem ser suficientes para considerar essa população da Bacia do Tocantins como uma espécie putativamente nova, considerada aqui *Potamotrygonocestus* sp. nov. 18.

O Clado B3 é suportado morfologicamente e molecularmente. O clado possui uma característica morfológica única dentre os membros de *Potamotrygonocestus*. Trata-se da angulação da furca e arredondamento logo em seguida, que sugere uma forma de "coração" ao par de ganchos completos (semelhantes ao da morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov.

2, veja a Figura 14 D). Isso sugere que o caráter em questão possa ser uma sinapomorfia para o grupo que inclui todas essas linhagens. Outra característica interessante é a presença de 5 atributos puros em COI, o que possibilita dizer que esse grupo tem suporte molecular. Independente das linhagens serem consideradas espécies diferentes, o clado que as contém é bastante estruturado.

4.3 Biogeografia

A Bacia Amazônica é subdividida em Amazônia Ocidental e Oriental devido às suas origens (Kullander, 1986; Albert *et al.*, 2006). A justificativa para essa divisão é que o Baixo Amazonas, ou Amazonas Oriental, possui uma história geológica recente que difere do resto da Amazônia. Sua indexação à parte centro-ocidental do ecossistema Amazônico só ocorreu depois do rompimento do arco Purus, que teria ocorrido entre o final do Mioceno ou mesmo no final do Plioceno (Lundberg *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2006). Albert *et al.* (2011) consideraram que a Bacia Amazônia Ocidental é representada por toda extensão de terras baixas desde o início do Rio Solimões até a parte média do Rio Amazonas. A Bacia Amazônica Oriental, para eles "Estuário Amazônico", estaria limitada pelos sistemas fluviais existentes desde o Médio Amazonas até o Baixo Amazonas, onde deságua no Oceano Atlântico.

Apesar da proximidade geográfica entre estes dois componentes amazônicos, muitos autores apontam uma estreita relação entre a parte ocidental e a Bacia do Orinoco. Por exemplo, Kullander (1986) foi o primeiro a registrar a relação da fauna de ciclídios entre a Bacia do Orinoco e da Amazônia Ocidental. Albert *et al.* (2006) notaram que os gimnotiformes da Bacia do Orinoco são mais similares aos da Amazônia Ocidental do que os gimnotiformes da Amazônia Oriental. Montoya-Burgos (2006) , que estudou as relações filogeográficas entre membros do gênero de cascudo *Hypostomus* distribuídos por toda a extensão do sistema hidrográfico da América do Sul, concluiu que existe uma relação de parentesco entre animais provenientes do Lago Maracaibo e Rio Magdalena com animais originários da Bacia do Orinoco e Alto Amazonas. A explicação para todos esses dados, segundo Albert *et al.* (2006), é que a distribuição encontrada deve-se à antiga união da Bacia do Orinoco e Amazônia Ocidental, a que chamou "Proto-Orinoco" (ou "Proto-Orinoco/Amazonas" *sensu* Lundberg *et al.*, 1998).

No presente trabalho, as observações acima são corroboradas por padrões filogenéticos e biogeográficos nos clados dos haplótipos procedentes da Amazônia Ocidental e a Bacia do Orinoco. Este trabalho considerou como Amazônia Ocidental as regiões de drenagens do Alto Solimões, relativas às coletas do Perú e do Rio Jutaí (AM/Brasil). Os clados que servem de

exemplo representam três linhagens do Complexo *P. travassosi*, Clado A3; duas linhagens do Clado A2.2; duas linhagens no Clado A2.1 e, finalmente, duas linhagens do Clado B3.2. O Clado A2.2 possuiu um subclado com haplótipos provenientes da Bacia do Tocantins, mas como esta linhagem foi considerada da mesma espécie da linhagem do Alto Solimões, a relação deste clado com a Bacia do Orinoco também foi considerada nessa discussão. Em todos casos, os grupos monofiléticos são compostos por haplótipos do Alto Solimões + Bacia do Orinoco (veja clados destacados com estrelas na Figura 15). A divergência entre as populações desses grupos pode ter ocorrido com o isolamento das duas bacias a cerca de 9 Ma (Albert *et al.*, 2006).

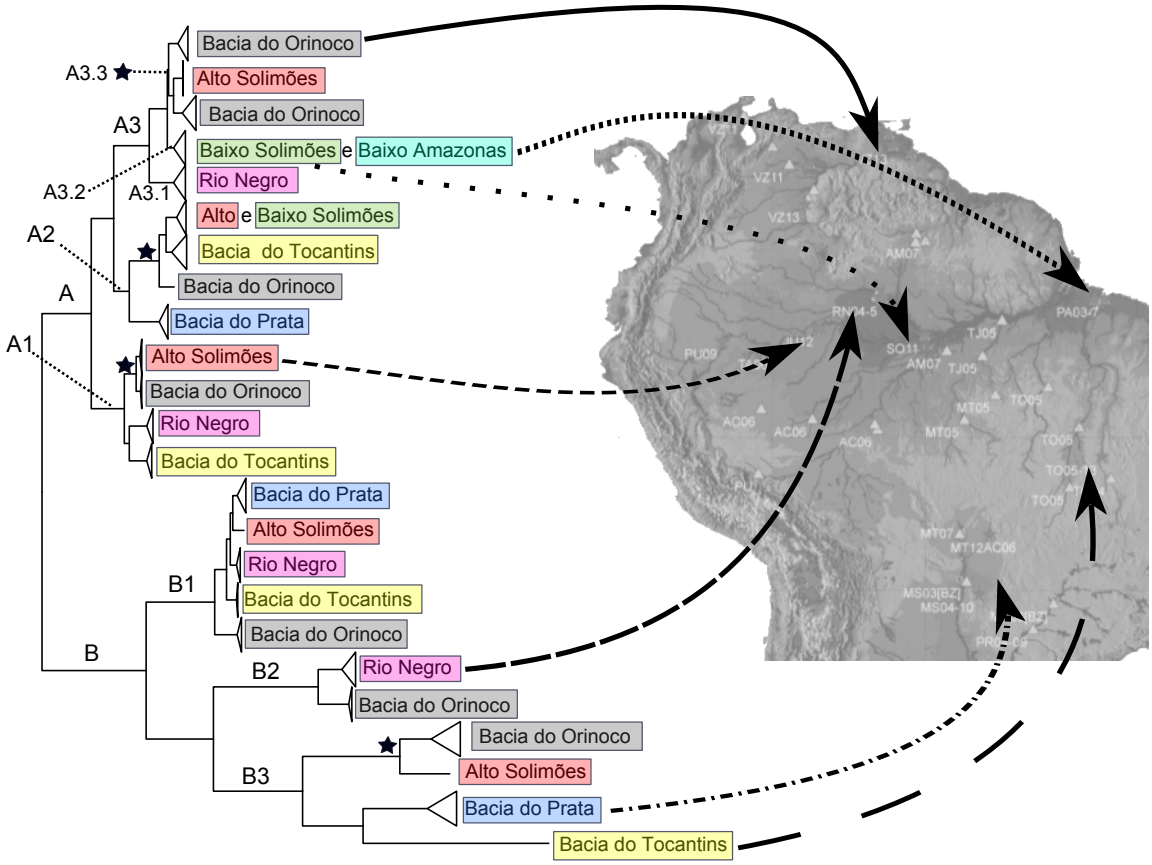


Figura 15: Cladograma por áreas amostradas. Cada terminal representa uma bacia e as setas apontam para a região correspondente no mapa. As cores correspondem às mesmas bacias. Os clados destacados com estrelas representam as relações filogenéticas entre Alto Solimões e Bacia do Orinoco.

O Clado A3.2 (Figura 15) nota-se uma relação extremamente próxima entre espécimes do Baixo Solimões e Baixo Amazonas (*i.e.* Amazônia Oriental). Segundo Lima & Ribeiro (2011),

peixes de grande porte com pouca fecundidade e ovos grandes possuem distribuição ao longo de todo o Rio Amazonas, inclusive em sua parte baixa. Enquanto que diversas espécies de peixe de pequeno porte e com alta fecundidade apresentam alta prevalência na Amazônia Média-Ocidental em relação ao Baixo Amazonas (Goulding *et al.*, 2003). Os potamotrigonídeos são peixes cartiloginosos de grande porte e ocorrem em quase toda a extensão fluvial sul-americana, com exceção apenas do Rio São Francisco e bacias costeiras, exceto Rio Parnaíba (Rosa, 1985). Assim, não é de se estranhar que os parasitas desses hospedeiros de grande porte possam estar distribuídos em toda essa extensão das águas brancas do Rio Amazonas. O Clado A3.2 é grupo-irmão das linhagens procedentes da Bacia do Orinoco e Alto Solimões (Figura 15, Clado A3.3). A conexão entre estas bacias já havia sido documentada em outros trabalhos como Lovejoy & Araújo (2000) e Turner *et al.* (2004), que propuseram que o Rio Essequibo seria uma via de migração que explicaria a diversidade genética encontrada em alguns peixes como peixe-agulha e caraciformes.

Alguns autores ainda sugerem que as relações de parentesco entre diversos membros da Bacia do Orinoco e da Amazônia Ocidental não incluem o Rio Negro. Segundo eles, o Rio Negro apresenta barreiras químicas para diversas espécies. Estas seriam diferenças do pH, temperatura e condutividade entre as águas negras do Rio Negro e o do Canal de Casiquiare e as águas brancas dos rios Orinoco e Amazonas. Além da barreira física na região de Porto Ayapucho e São Gabriel da Cachoeira, tornando a conexão entre as duas bacias por meio do sistema Rio Negro/Casiquiare impeditiva para várias espécies (Vari, 1988; Winemiller *et al.*, 2008). Segundo Lima & Ribeiro (2011), a porção média e baixa do Rio Negro drenam por áreas baixas possibilitando que muitas espécies de peixes que ocorrem na parte mais ao oeste da Amazônia também ocorram nessa área. Porém, apesar disso, muitas dessas espécies não são encontradas no Rio Negro, inclusive há espécies de peixes que ocorrem nos tributários do Rio Negro, mas são escassas ou mesmo ausentes neste rio (*e.g. Pygocentrus nattereri* e *Colomesus asellus*; Lima & Ribeiro, 2011). Por essas razões a hipótese de barreiras químicas encontra suporte nos padrões de distribuição da ictiofauna neotropical.

Dentro do clado Complexo *P. travassosi*, há um clado isolado pertencente aos haplótipos do Rio Negro (Figuras 2 e 15, Clado A3.1.0) que é grupo-irmão do clado formado por haplótipos da Bacia do Rio Amazonas e Bacia do Orinoco e Alto Solimões. Atualmente, o Canal de Casiquiare conecta o Alto Orinoco à Bacia Amazônica através do Rio Negro. Porém essa conexão não parece ser a via de fluxo gênico dessas populações pelas relações filogenéticas apresentadas nesse complexo. Segundo Turner *et al.* (2004), se o Canal de Casiquiare fornecesse uma via para o fluxo entre os genes, esperaria-se que as linhagens do Orinoco

compartilhassem dados haplotípicos com o Rio Negro e não com os haplótipos da Amazônia Oriental, como foi observado por diversos autores. Os padrões filogenéticos de *Paratrygon aireba* também indicam que há um clado do Rio Negro que é grupo-irmão do clado encontrado para espécimes do Alto e Baixo Solimões e Baixo Amazonas (Frederico *et al.*, 2012). As evidências apresentadas na hipótese filogenética para *Potamotrygonocestus* corroboram as observações desses autores, pois esses haplótipos do Rio Negro não compartilham ancestrais comuns e exclusivos com os haplótipos da Bacia do Orinoco.

As águas negras do Rio Negro/Casiquiare não são barreiras químicas para todas as espécies. Várias delas são capazes de transpassar as Bacias Amazônicas e Orinoco através deles. Isso é o que sugere o estudo de Hubert & Renno (2006), cuja topologia do cladograma de área das bacias Neotropicais hipotetiza que o Rio Negro e a Bacia do Orinoco são áreas-irmãs. Os autores justificaram essa relação através da conexão do Canal do Casiquiare. A hipótese filogenética para *Potamotrygonocestus* apresentou uma estreita relação entre as linhagens do Rio Negro e Bacia do Orinoco (Figura 15, Clado B2). Apesar de já haver sido discutido que essas linhagens constituem espécies distintas, os haplótipos em questão formam um grupo monofilético. Luchetti (2011) registrou *P. maurae* para o Rio Abacaxis/AM, um tributário do Rio Madeira. Como o presente trabalho não conta com exemplares desta localidade, não foi possível contextualizá-lo dentro da hipótese filogenética apresentada aqui, nem testar se pertencem ao mesmo conceito de *Potamotrygonocestus maurae* aplicado. No entanto, é possível ao menos saber que existe uma linhagem dotada dos mesmos atributos morfológicos nas águas brancas da Bacia Amazônica. A inclusão de haplótipos da Bacia Amazônica deve alterar essa relação existente entre haplótipos do Rio Negro + Bacia do Orinoco. Isso baseado nas demais observações deste estudo em que os haplótipos da Bacia Amazônica, mais precisamente do Alto Solimões, formam grupo monofilético com haplótipos da Bacia do Orinoco. Todas as populações do Rio Negro e da Bacia do Orinoco foram consideradas linhagens distintas das demais. Portanto, a relação filogenética encontrada entre as bacias do Rio Negro e do Orinoco, apesar de ter sido encontrada por alguns autores (*e.g.* Hubert & Renno, 2006), deve ser consequência de uma baixa amostragem geográfica.

O isolamento entre os sistemas Amazonia/Orinoco e Paraná ocorreu a aproximadamente 30 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). Porém várias espécies conhecidas possuem distribuição por todas estas bacias. Esse é o caso da morfoespécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 1, encontrada na Bacia do Prata e Alto Solimões. Assim como este trabalho, Luchetti (2011) também havia encontrado diversos exemplares distribuídos pela Bacia Amazônica e Bacia do Prata. Apesar de não identificar nenhum atributo morfológico que diagnosticasse as duas

populações foi a única linhagem de *Potamotrygonocestus* para a qual isso foi observado. Independentemente, esta observação é semelhante ao documentado para *Acanthobothrium quinonesi* e algumas morfoespécies de *Rhinebothroides* que ocorrem em ambas bacias (Cardoso, 2010; Bueno, 2010; Machado, 2012). Para monogenóides, encontrou-se um padrão similar para as espécies de *Potamotrygonocotyle* (i.e. *P. tsalickisi*, *P. chisholmae*, *P. dromedarius* and *P. rionegrense*), caso raro, segundo Domingues & Marques (2010). Todos esses parasitas citados, ou seja, *Acanthobothrium quinonesi*, *Rhinebothroides*, e *Potamotrygonocotyle*, são parasitas de Potamotrygonidae, assim como os membros de *Potamotrygonocestus*. Assim, esse padrão de distribuição é congruente com as demais linhagens de parasitas de potamotrigonídeos.

Além da ampla distribuição observada nas bacias do Prata e Alto Solimões, os resultados indicam que existe uma estruturação genética no Clado B1 correlacionado com a distribuição biogeográfica (Figura 15). Os ramos curtos, a presença de atributos puros para alguns clados isolados, mas não todos, e a semelhança morfológica, sugerem que esses eventos cladogenéticos são recentes. Esse conjunto de relações filogenéticas entre membros de diversas bacias é único para *Potamotrygonocestus*. O fluxo gênico que ocorre entre as diversas populações deve estar associados à captura de nascentes de bacias vizinhas, ver discussão abaixo (Ribeiro, 2006).

Outro padrão filogenético e biogeográfico que merece atenção é o clado formado por duas morfoespécies ainda não descritas; uma proveniente da Bacia do Prata e outra do Rio Tocantins. O padrão filogenético e biogeográfico desses clados é similar ao documentado para o lambari *Jupiaba acanthogaster*, que está amplamente distribuído pelos rios que drenam o escudo brasileiro do lado ocidental do Rio Tocantins, até o alto do Rio Madeira e alto da Bacia do Paraguai (Lima & Ribeiro, 2011). Montoya-Burgos (2006) também encontrou a mesma relação entre essas bacias, apesar de que em seu estudo o clado correspondente também havia espécimes provenientes do Rio São Francisco. Segundo Ribeiro (2006), diversas espécies ultrapassam os limites de suas bacias originais, provavelmente devido às constantes capturas de nascentes de bacias vizinhas associadas às atividades neotectônicas. O mesmo autor indica que o Alinhamento Transbrasiliano seria o responsável pela atual dinâmica fluvial e também pela evolução das depressões do Pantanal e Tocantins-Araguaia (Ribeiro, 2006).

As relações filogenéticas do Clado B3 incluem representantes das bacias do Orinoco, Alto Solimões, do Prata e do Tocantins-Araguaia. A nova espécie proposta por Luchetti (2011), *Potamotrygonocestus* sp. nov. 2, e um terminal proveniente do Tocantins são grupos-irmãos de haplótipos procedentes da Bacia do Orinoco e do Alto Solimões. Os comprimentos de ramos relativamente expressivos que suportam estes clados sugerem que o evento que interrompeu o fluxo gênico entre essas populações pode ser antigo. É possível que a

separação dessas linhagens representem o deslocamento das fronteiras entre os sistemas paleo-Orinoco/Amazonas e Paraná, ocorrido há cerca de 11,8 a 10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). Outra possibilidade seria a existência de membros de *Potamotrygonocestus* nestas áreas que ainda não foram amostrados.

Estudos filogenéticos que consideram a ictiofauna neotropical incluem representantes do Rio Madalegna e Lago Maracaibo (*e.g.* Montoya-Burgos, 2006; Hubert & Renno, 2006). No entanto, não foi possível obter representantes dessas localidades. A primeira região não foi amostrada, e a segunda, apesar de amostrada recentemente, não revelou qualquer espécime de *Potamotrygonocestus*. Porém, Brooks (1992) amostrou a espécie *Potamotrygonocestus amazonensis* em tributários do Lago Maracaibo. A ausência deste gênero em nossas amostras pode significar que os hospedeiros infectados não foram coletados ou mesmo a microregião amostrada não era propícia ecologicamente à presença do parasita (alimentação das arraias, presença de um hospedeiro intermediário, etc.). Por isso, mais esforços devem ser feitos para amostrar a localidade haja vista que a obtenção de exemplares de *Potamotrygonocestus* para essa região tem várias implicações, que vão desde o posicionamento de seus membros na filogenia até interpretações biogeográficas.

4.4 Relação Hospedeiro/Parasita

Caira & Jensen (2001) impuseram alguns critérios para utilizar parasitas e seus hospedeiros em estudo de co-evolução. Os critérios são: 1. ambos hospedeiros e parasitas são monofiléticos; 2. ambos devem ser corretamente identificados; 3. estimativas razoáveis das filogenias de ambos os grupos devem estar disponíveis; 4. os hospedeiros são infestados de forma abrangente pelos parasitas e 5. os parasitas exibem um considerável grau de especificidade. Considerando todos esses atributos como válidos seria impossível fazer qualquer análise de co-evolução entre *Potamotrygonocestus* e seus hospedeiros potamotrigonídeos. Essa impossibilidade é causada pelo fato de não se conhecer a filogenia das espécies hospedeiras e de muitas morfoespécies ainda carecerem de descrição, apesar dos últimos esforços de refinar a taxonomia e a sistemática dos hospedeiros (Toffoli *et al.*, 2008; de Carvalho & Lovejoy, 2011; de Carvalho *et al.*, 2011; de Carvalho & Ragno, 2011; Stepanek & Kriwet, 2012; Loboda & de Carvalho, 2013; entre outros). Em relação aos *Potamotrygonocestus*, diversas descrições ainda necessitam ser feitas. Outro problema que dificultaria essa análise é a falta de especificidade de grande parte desses parasitas.

Estudos que refinaram a sistemática e a taxonomia de cestoídeos de potamotrigonídeos

indicaram que a maioria das espécies não parasitam exclusivamente um hospedeiro. Esse padrão foi observado em *Acanthobothrium*, *Rhinebothroides* e *Rhinebothrium* (Cardoso, 2010; Bueno, 2010; Reyda & Marques, 2011; Machado, 2012) e também em *Potamotrygonocestus* (Marques, 2000; Luchetti, 2011). Estas observações contrariam o padrão observado para as espécies de cestóideos de elasmobrânquios marinhos que costumam ser considerados como especialistas (Caira & Jensen, 2001; Healy, 2006; Caira & Jensen, 2009; Fyler, 2011; etc.).

Três possibilidades podem explicar as discrepâncias entre os padrões de associação entre cestóideos marinhos de de água doce. A primeira seria que a diferença existe porque os ambientes e sistemas são diferentes; a segunda porque a taxonomia e a sistemática das espécies de água doce não refletem a diversidade real das linhagens; enquanto a terceira seria que o mesmo ocorre com as espécies marinhas. A última hipótese, no entanto, não será avaliada pois foge do escopo deste trabalho.

Reyda & Marques (2011) identificaram inespecifidade nas espécies de água doce de *Rhinebothrium* em comparação aos seus representantes marinhos. Para eles, a diferença observada entre a especificidade das linhagens marinhas e ausência dela em sistemas de água doce deve ter sido influenciada por fatores ecológicos e históricos exclusivos para este sistema de água doce. Poulin (2007) sugeriu que o baixo grau de especificidade pode ser resultado de uma diversificação da linhagem hospedeira sem a correspondente diversificação da fauna parasitária associada. Outra possibilidade é que a baixa especificidade pode estar relacionada à idade recente do sistema de água doce neotropical em comparação com os sistemas marinhos (Reyda & Marques, 2011), pois a colonização da América do Sul pelos ancestrais potamotrigonídeos deve ter acontecido durante o Mioceno (Lovejoy *et al.*, 1998).

Este trabalho refinou a sistemática de *Potamotrygonocestus* e incluiu uma ampla representação de bacias e hospedeiros, até então desconhecida. Os resultados mostram que a maioria das espécies, ou morfoespécies, de *Potamotrygonocestus* não são específicas em relação ao hospedeiro (veja Tabela 4). De acordo com a Tabela 4, das 22 linhagens estudadas nesse trabalho, 12 linhagens são generalistas, isso representa 54,5% das linhagens. Entre as linhagens que foram amostradas em apenas uma espécie hospedeira, 18% foram encontradas em mais de um exemplar. Os haplótipos das demais linhagens foram obtidos em apenas um exemplar de hospedeiro. Apesar da aparente predominância de espécies generalistas sobre as especialistas (considerando apenas as linhagens com mais de um exemplar hospedeiro), essas percentagem já foi bem menor.

Até o momento, onze linhagens eram reconhecidas para Luchetti (2011), veja Tabela 3. Este estudo duplicou o número de linhagens reconhecidas como espécies. Luchetti (2011)

havia sugerido que das onze linhagens, apenas uma poderia ser considerada especialista (*Potamotrygonocestus fitzgeraldae sensu lato*), 9% das espécies até então conhecidas. Considerando apenas as linhagens coletadas em mais de um exemplar hospedeiro, percentagem daquelas consideradas especialistas encontradas nesse trabalho aumenta para 18%. O aumento do número de linhagens alterou a proporção que havia entre generalistas/especialistas, ou seja a proporção foi duplicada. Isso significa que o refinamento taxonômico pode alterar nosso conhecimento sobre os padrões de associação parasita/hospedeiros dos sistemas de água doce neotropicais, embora linhagens especialistas ainda sejam a minoria dentre as espécies de *Potamotrygonocestus*.

Esse número de espécies especialistas para o gênero pode crescer em consequência de um acúmulo de conhecimentos adquiridos sobre seus membros ao longo da história taxonômica de *Potamotrygonocestus*. Por exemplo, Luchetti (2011) amostrou diversos hospedeiros da espécie *Po. motoro* do Rio Negro, encontrando uma número relativamente grande de parasitas de uma mesma linhagem. Esses parasitas, foram designados aqui como uma nova espécie, porém todos seus haplótipos foram obtidos de um único exemplar de *Po. motoro*. Considerando que essa linhagem é a mesma estudada por Luchetti (2011), esses dados podem ser extrapolados para este trabalho e considerar, ao menos por enquanto, que a nova espécie *Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 é parasita exclusivo de *Po. motoro*. Outro exemplo é a espécie *P. maurae* que neste trabalho foi encontrada parasitando *Potamotrygon orbignyi*, seu hospedeiro-tipo (Marques *et al.*, 2003). Luchetti (2011) registrou essa espécie para o Rio Abacaxis em *Potamotrygon humerosa*, porém esta linhagem possivelmente é distinta de *P. maurae sensu stricto* provenientes do Rio Negro. Assim, se esses argumentos são válidos, o número de membros que parasitam exclusivamente um hospedeiro aumentaria para outras duas espécies do gênero: *Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 e *Potamotrygonocestus maurae sensu stricto*.

Além de *P. fitzgeraldae sensu stricto*, há duas linhagens que parasitam exclusivamente *Paratrygon aireba* (Tabela 4). Esta preferência por é interessante porque *Pa. aireba* possui alimentação e hábitos de vida muito característicos. Shibuya *et al.* (2009), trabalhando com conteúdo estomacal de diversos potamotrígonideos do Rio Negro, constataram que *Pa. aireba* consome preferencialmente peixes teleósteos, comumente encontrados no canal do rio (famílias Cetopsidae e Doradidae) e em praias de areia (famílias Engraulididae e Loricariinae), onde ocorrem adultos e jovens destas arraias. Os mesmos autores estudaram outras espécies como *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon* sp. (cururu), mas concluíram que a alimentação deles é basicamente de larvas e adultos de diversos artrópodos, diferentemente de *Pa. aireba*.

Tabela 4: Sumário da relação dos táxons de parasitas com seus respectivos hospedeiros, o valor entre parênteses corresponde ao número de exemplares examinados no presente estudo.

Táxon	**Hospedeiros**
P. magdalenensis	#*Potamotrygon magdalenae*
P. amazonensis	#*Po. orbignyi*, *Po. humerosa*, *Potamotrygon* sp. (cururu), *Potamotrygon* sp. toc3
P. travassosi	#*Po. orbignyi* (1), *Pl. iwamae* (4), *Po. motoro* (1), *Po. scobina*, *Potamotrygon* cf. *motoro*, *Potamotrygon* sp mar1, *Potamotrygon* cf. *orbigny*
P. oriconoensis	#*Po. orbignyi* (1), *Potamotrygon* sp.(7)
P. fitzgeraldae	#*Pa. aireba* (2), *Po. schroederi* (1)
P. maurae	#*Po. orbignyi* (1), *Po. humerosa*
Potamotrygonocestus sp. nov. 1	#*Po. motoro* (7), *Po. falkneri*, *Potamotrygon* cf. *motoro*, *Po. orbignyi*
Potamotrygonocestus sp. nov. 2	*Po. histrix* (5), *Po. amandae* (6), *Po.* cf. *histrix* (1), #*Po. motoro*, *Po. falkneri*
Potamotrygonocestus sp. nov. 3	#*Po. brachyura* (4), *Po. motoro* (3), *Potamotrygon* cf. *motoro*
Potamotrygonocestus sp. nov. 4	*Pa. aireba* (2), *Po. scobina* (3), *Po.* cf. *motoro* (1), *Po. orbignyi* (1), *Potamotrygon* cf. *orbignyi* (1), *Potamotrygon* sp. (3), #*Potamotrygon* sp. jam, *Potamotrygon* sp. 1 e 2, *Po. tatianae*
Potamotrygonocestus sp. nov. 5	*Pa. aireba* (8)
Potamotrygonocestus sp. nov. 6	*Pa. aireba*(1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 7	*Pa. aireba* (3), *Po. schroederi* (1), *Po. orbignyi* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 8	*Pa. aireba* (1), *Potamotrygon* sp. (2)
Potamotrygonocestus sp. nov. 9	*Po. motoro* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 10	*Po.* cf. *motoro* (1), *Po. scobina* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 11	*Pa. aireba* (1), *Po. schroederi* (1), *Potamotrygon* sp. (4)
Potamotrygonocestus sp. nov. 12	*Po. orbignyi* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 13	*Potamotrygon* sp. (cururu) (4)
Potamotrygonocestus sp. nov. 14	*Potamotrygon* sp. (2)
Potamotrygonocestus sp. nov. 15	*Po. orbignyi* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 16	*Po. orbignyi* (2)
Potamotrygonocestus sp. nov. 17	*Po.* cf. *motoro* (1)
Potamotrygonocestus sp. nov. 18	*Potamotrygon* sp. (1)

Hospedeiros-tipos das espécies contempladas * Outros hospedeiros identificados por Luchetti (2011)

P. fitzgeraldae sensu stricto também foi coletada em *Potamotrygon schroederi*, assim como outras duas linhagens. Esse é o primeiro trabalho que encontrou espécimes inteiros de *Potamotrygonocestus* neste hospedeiro. Marques *et al.* (2003) haviam encontrado apenas proglótides soltas na confluência dos Rios Negro e Solimões *Po. schroederi*. Curiosamente, essas três linhagens também foram encontradas parasitando *Pa. aireba*. A espécie *Po. schroederi* é endêmica das drenagens dos rios Orinoco e Negro (Rosa *et al.*, 2010), onde ocorre em simpatria com *Pa. aireba*. A biologia dessa espécie é pouco conhecida, mas pelo fato de ter infestações parecidas com *Pa. aireba* deve haver fatores ecológicos/comportamentais semelhantes entre as duas espécies que expliquem essas ocorrências. Independentemente disso, o espécime encontrado de *P. fitzgeraldae* era imaturo, e pelo fato de ter sido um caso isolado no Rio Negro, pode ser uma infestação recente ou oportunista (Luchetti, 2011). Assim, como a espécie *P. fitzgeraldae* apresenta preferência por *Pa. aireba*, pode ser considerada semi especialista.

A detecção de linhagens crípticas de *Potamotrygonocestus* pela hipótese filogenética possibitou identificar um padrão especialista que até então era desconhecido para os gêneros de parasitas de potamotrigonídeos. A ampliação do número de espécies especialistas sugere que a hipótese do desconhecimento da taxonomia e sistemática de grupos de água doce neotropicais pode ser válida, pelo menos para *Potamotrygonocestus*. É possível que a mesma observação ocorra para os demais gêneros cestóideos quando suas taxonomias forem refinadas no mesmo nível deste trabalho. Como os padrões de associação são totalmente dependentes do reconhecimento de linhagens, tanto de parasitas quanto de hospedeiros, um refinamento na taxonomia dos potamotrigonídeos também pode alterar os padrões de especialização observados.

5 Conclusão

- Os quatro fragmentos nucleotídicos parecem ter sido suficientes para a busca de uma hipótese filogenética robusta para membros de *Potamotrygonocestus*.
- O uso do programa CAOS possibilitou atribuir caracteres diagnósticos para algumas linhagens potencialmente distintas dentro do gênero.
- A hipótese filogenética corroborou a monofilia de *Potamotrygonocestus* e apresentou

duas linhagens principais que correspondem a agrupamentos morfologicamente diagnosticados com base na morfologia do gancho.

- Identificou-se 14 linhagens que podem ser consideradas espécies putativamente novas.
- A espécie *Potamotrygonocestus travassosi* está restrita à bacia sedimentar do Amazonas e recebeu duas espécies nominais como sinônimos (*P. chaoi* e *P. marajoara*).
- A espécie *Potamotrygonocestus orinoensis*, que antes era considerada sinônimo júnior de *P. travassosi*, foi validada no presente estudo.
- Entre as quatro morfoespécies ainda não descritas, apenas a *Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 não é monofilética. Este trabalho restringiu sua distribuição ao que se acredita ser sua localidade tipo (Alto Solimões).
- A hipótese filogenética revelou padrões biogeográficos semelhantes à diversos membros da ictiofauna neotropical. As relações históricas entre Amazônia Ocidental (Alto Solimões) e Bacia do Orinoco foram evidenciadas em diversos clados. Outras relações biogeográficas conhecidas na literatura para os sistemas fluviais Neotropicais, tais como entre Baixo Solimões e Baixo Amazonas, Bacias do Prata e Alto Solimões e entre Bacia do Prata e Bacia do Tocantins-Araguaia são espelhadas pelos padrões filogenéticos de *Potamotrygonocestus*.
- As bacias do Orinoco e Rio Negro foram consideradas áreas de endemismo para as espécies de *Potamotrygonocestus*.
- Após o refinamento taxonômico, os membros de *Potamotrygonocestus* apresentaram ser mais especialistas do que se acreditava antigamente.

6 Referências

Albert, J. S.; N. R. Lovejoy & W. G. Crampton. 2006. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences* 21: 14–27.

Albert, J. S.; P. Petry & R. E. Reis. 2011. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. Em: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Albert, J. S. & R. E. Reis (eds.). California: University of California Press, pp. 21–57.

Audzijonyte, A. & R. C. Vrijenhoek. 2010. Three nuclear genes for phylogenetic, SNP and population genetic studies of molluscs and other invertebrates. *Molecular Ecology Resources* 10: 200–204.

Avise, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. MA.: Harvard University Press, Cambridge. 447.

Baum, D. & K. Shaw. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Em: *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics.* Hoch, P. C. & A. G. Stephenson (eds.). St. Louis: Missouri Botanical Garden, pp. 289–303.

Bickford, D.; D. J. Lohman; N. S. Sodhi; P. Ng; R. Meier; K. Winker; K. K. Ingram & I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.

Bray, R.; G. Foster; A. Waeschenbach & D. Littlewood. 2012. The discovery of progenetic *Allocreadium neotenicum* Peters, 1957 (Digenea: Allocreadiidae) in water beetles (Coleoptera: Dytiscidae) in Great Britain. *Zootaxa* 3577: 58–70.

Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295–304.

Brock, T. D. & H. Freeze. 1969. *Thermus Aquaticus* gen n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriolgy* 98: 98–289.

Brooks, D. R. & J. F. R. Amato. 1992. Cestode parasites in *Potamotrygon motoro* (Natterer) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Southwestern Brazil, including *Rhinebothroides mclennanae* n. sp. (Tetraphyllidea: Phyllobothriidae), and a revised host-parasite checklist for helminths inhabiting Neotropical freshwater stingrays. *The Journal of Parasitology* 78: 393–398.

Brooks, D. R.; M. A. Mayes & T. B. Thorson. 1981. Systematic review of cestodes infecting freshwater stingrays (Chondricthyes: Potamotrygonidae) including four new species from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 48: 43–64.

Brooks, D. 1992. Origins, diversification, and historical structure of the helminth fauna inhabiting neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae). *Journal of Parasitology* 78: 588–595.

Brooks, D. & T. Thorson. 1976. Two tetraphyllidean cestodes from the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* Duméril, 1852 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Colombia. *Journal of Parasitology* 62: 943–947.

Bueno, V. M. 2010. Delimitação de especies em *Rhinebothroides* Mayes, Brooks Thorson, 1981 (Cestoda: Tetraphyllidea) com ênfase no complexo *Rhinebothroides freitasi* (Rego, 1979). Diss. de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 121 pp.

Caira, J. N. & K. Jensen. 2001. An investigation of the co-evolutionary relationships between onchobothriid tapeworms and their elasmobranch hosts. *International Journal of Parasitology* 31: 960–975.

Caira, J. N. & D. J. Orringer. 1995. Additional information on the morphology of *Potamotrygonocestus magdalenensis* (TetraphyIlidea : Onchobothriidae) from the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* in Colombia. *Journal of Helminthology* 62: 22–26.

Caira, J. N. & F. B. Reyda. 2005. Eucestoda (true Tapeworms). Em: *Marine Parasitogy*. Rohde, K. (ed.). Collingwood: Commonwealth Scientific e Industrial Research Organization, pp. 92–104.

Caira, J. & K. Jensen. 2009. Erection of a new onchobothriid genus (Cestoda: Tetraphyllidea) and the description of five new species from whaller sharks (Carcharhinidae). *J. Parasitol.* 95: 924–940.

Caira, J.; K.Jensen; A. Waeschenbach; P. D. Olson & D. T. J. Littlewood. 2014. Orders out of chaos – molecular phylogenetics reveals the complexity of shark and stingray tapeworm relationships. *International Journal for Parasitology* 44: 55–73.

Campbell, K. E.; C. D. Frailey & L. Romero-Pittman. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon river system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 239: 166–219.

Campbell, R. A. & I. Beveridge. 2002. The genus *Acanthobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea: Onchobothriidae) parasitic in Australian elasmobranch fishes. *Invertebrate Systematics* 16: 237–344.

Carbayo, F.; M. Álvarez Presas; C. T. Olivares; F. P. L. Marques; E. M. Froehlich & M. Riutort. 2013. Molecular phylogeny of Geoplaninae (Platyhelminthes) challenges current classification: proposal of taxonomic actions. *Zoologica Scripta* 42: 508–528.

Cardoso Jr., M. 2010. Taxonomia das linhagens de *Acanthobothrium* van Beneden, 1850 (Eucestoda: Tetraphyllidea) parasitas de Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes). Diss. de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 69 pp.

Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.

Costa, J. B. S.; R. L. Bemerguy; Y. Hasui & M. S. Borges. 2001. Tectonics and paleogeography along the Amazon river. *Journal of South American Earth Sciences* 14: 335–247.

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. Em: *Current Ornithology*. Johnston, R. F. (ed.). Kansas: Springer US, pp. 159–187.

Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. Em: *Speciation and its Consequences*. Otte, D. & J. Endler (eds.). Sunderland: Sinauer Associates Inc., pp. 28–59.

Cracraft, J. & M. J. Donoghue. 2004. Assembling the tree of life. New York: Oxford University Press. 576.

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

de Carvalho, M. R. & N. R. Lovejoy. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 2776: 13–48.

de Carvalho, M. R. & M. P. Ragno. 2011. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana sp. nov.*, from the upper and mid Amazon river basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 51: 101–138.

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

de Carvalho, M. R.; M. H. S. Perez & N. R. Lovejoy. 2011. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 2827: 1–30.

Domingues, M. V. & F. P. L. Marques. 2010. Phylogeny and taxonomy of Potamotrygonocotyle Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Monogenoidea: Monocotylidae) with a description of four new species. *Journal of Helminthology* 85: 353–380.

Edgar, R. 2004a. Muscle: Multiple Sequence Alignment With High Accuracy And High Throughput. *Nuclei Acids Research* 32: 1792–1797.

Edgar, R. 2004b. Muscle: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 5–113.

Ewing, B. & P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186–194.

Ewing, B.; L. Hillier; M. C. Wendl & P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175–185.

Farris, J. S. 1989. The retention index and rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417–419.

Farris, J. 1982. Outgroups and parsimony. *Systematic Zoology* 31: 328–334.

Folmer, O.; M. Black; W. Hoeh; R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–297.

Frederico, R.; I. Farias; M. Araujo; P. Charvet-Almeida & J. Alves-Gomes. 2012. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray Paratrygon aiereba Muller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 10: 71–80.

Fyler, C. A. 2009. Systematics, biogeography and character evolution in the tapeworm genus *Acanthobothrium* van Beneden, 1850. Tese de doutorado. Storrs: University of Connecticut. 168 pp.

Fyler, C. A. 2011. An extremely hyperapolytic *Acanthobothrium* species (Cestoda: Tetraphyllidea) from the Japanese Wobbegong, *Orectolobus japonicus* (Elasmobranchii: Orectolobiformes) in Taiwan. *Comparative Parasitology* 78: 4–14.

Goloboff, P.; S. Farris & K. Nixon. 2000. TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA). Acesso em: 2 jul. 2014. URL: http://www.cladistics.com/aboutTNT.html.

Goloboff, P. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415–428.

Goodman, M.; C. B. Olson; J. E. Beeber & J. Czelusniak. 1982. New perspectives in the molecular biological analysis of mammalian phylogeny. *Acta Zoologica Fennica* 169: 19–35.

Gordon, D.; C. Abajian & P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195–202.

Goulding, M.; R. Barthem & E. Ferreira. 2003. Smithsonian Atlas of the Amazon. London: Princeton Editorial Associates. 256.

Grant, T. & A. G. Kluge. 2008. Clade support measures and their adequacy. *Cladistics* 24: 1051–1064.

Grant, T.; D. R. Frost; J. P. Caldwell; R. Gagliardo; C. F. B. Haddad; P. J. R. Kok; D. B. Means; B. P. Noonan; W. E. Schargel & W. C. Wheeler. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia:Athesphatanura:Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299: 1–262.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium* 41: 95–98.

Harrison, R. G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in ecology & evolution* 4: 6–11.

Healy, C. J. 2006. A revision of selected Tetraphyllidea (Cestoda): *Caulobothrium*, *Rhabdotobothrium*, *Rhinebothrium*, *Scalithrium*, and *Spongiobothrium*. Tese de doutorado. Storrs: University of Connecticut. 234 pp.

Hebert, P.; A. Cywinska; S. Ball & J. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Trends in Ecology & Evolution* 270: 313–321.

Hey, J.; M. L. Waples R. S.and Arnold; R. K. Butlin & R. G. Harrison. 2003. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends In Ecology And Evolution* 18: 597–603.

Hillis, D. M. 1995. Approaches for assessing phylogenetic. *Systematics Biology* 44: 3–16.

Hillis, D. M.; C. Moritiz & B. K. Mable. 1996. Molecular Systematics. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 656.

Hubert, N. & J. Renno. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33: 1414–1436.

Ieji, Y. J.; D. X. Zhang & L Junhe. 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585.

Ivanov, V. A. 2005. A new species of *Acanthobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea: Onchobotriidae) from the ocellate river stigray, *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), in Argentina. *Journal of Parasitology* 91: 390–396.

Jungfer, K.; J. Faivovich; J. M. Padial; S. Castroviejo-Fisher; M. Lyra; B. Berneck; P. Iglesias; J. Philippe; R. Kok; R. MacCulloch; M. Rodrigues; V. Verdade; C.Gastello; J. Chaparro; P. Valdujo; S. Reichle; J. Moravec; V. Gvoždík; G. Gagliardi-Urrutia; R. Ernst; I. D. la Riva; D. Means; A. Lima; J. Señaris; W. Wheeler & C. Haddad. 2012. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae:Osteocephalus): an Amazonian puzzle. *Zoologica Scripta* 42: 351–380.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.) *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.

Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Acesso em: 2 jul. 2014. URL: http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm.

Kluge, A. G. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* 38: 7–25.

Kullander, S. O. 1986. Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Stockholm, Sweden: Department of Vertebrate Zoology, Research Division, Swedish Museum of Natural History. 428.

Lasso, C. A.; A. B. Rial & O. Lasso-Alcalá. 1996. Notes on the biology of the freshwater stingrays *Paratrygon aiereba* (Müller and Henle, 1841) and *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology* 2: 39–52.

Lima, F. C. T. & A. C. Ribeiro. 2011. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. Em: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Albert, J. S. & R. E. Reis (eds.). California: University of California Press, pp. 145–164.

Littlewood, D. T. J.; K. Rohde & K. A. Clough. 1997. Parasite speciation within or between host species? - Phylogenetic evidence from site-specific polystome monogeneans. *International Journal for Parasitology* 27: 1289–1297.

Litvaitis, M. & K. Rohde. 1999. A molecular test of plathyhelminthes phylogeny: inferences from partial 28s rDNA sequences. *Invertebrate Biology* 118: 42–256.

Loboda, T. S. & M. R. de Carvalho. 2013. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 11: 693–737.

Lovejoy, N. R. 1997. Stingrays, parasites, and neotropical biogeography: a closer look at Brooks et al.'s hypothesis concerning the origins of neotropical freshwater rays (Potamotrygonidae). *Systematic Biology* 46: 218–230.

Lovejoy, N. R. & M. L. G. D. Araújo. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorrhaphis*. *Molecular Ecology* 9: 259–268.

Lovejoy, N. R.; E. Bermingham & A. P. Martin. 1998. Marine incursion into South America. *Nature* 396: 421–422.

Luchetti, N. M. 2011. Revisão taxonômica do gênero *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Tetraphyllidea). Diss. de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 105 pp.

Luchetti, N. M.; F. P. L. Marques & P. Charvet-Almeida. 2008. A new species of *Potamotrygonocestus* Brooks and Thorson, 1976 (Eucestoda: Tetraphyllidea) from *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello and Thorson, 1987 (Myliobatoidea: Potamotrygonidae)

and redescription of *Potamotrygonocestus chaoi* Marques, Brooks, and Araujo, 2003. *Systematic Parasitology* 70: 131–145.

Lundberg, J.; L. Marshall; J. Guerrero; M. M. B. Horton & F. Wesseling. 1998. The Stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical south american rivers. Em: *Phylogeny and Classification of Neotropica Fishes*. Malabarba, M.; R. E. Reis; R. P. Vari & C. Lucena (eds.). Porto Alegre: Edipucrs, pp. 13–36.

Mace, G. M. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* 359: 711–719.

Machado, D. J. 2012. *Acanthobothrium* Blanchard, 1848: diversidade filogenética das linhagens parasitas de arraias de água doce. Diss. de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 55 pp.

Machado, D. J. 2013. YBYRÁ - a fast and resourceful tool for examining clade prevalences in large sets of trees. Acesso em: 2 jul. 2014. URL: http://www.zoologie.uni-rostock.de/fileadmin/MathNat_Bio_Zoologie/Abstractband_WHS2013.pdf.

Marques, F. P. L. 2000. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. Tese de doutorado. Toronto: University of Toronto. 325 pp.

Marques, F. P. L.; D. R. Brooks & M. L. G. Araújo. 2003. Systematics and phylogeny of *Potamotrygonocestus* (Platyhelminthes, Tetraphyllidea, Onchobothriidae) with descriptions of three new species from freshwater potamotrygonids (Myliobatoidei, Potamotrygonidae). *Zoologica Scripta* 32: 367–396.

Mayes, M.; D. Brooks & T. Thorson. 1981. Two new tetraphyllidean cestodes from *Potamotrygon circularis* Garman (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Itacuai river, Brazil. *Proc Helminthol Soc Wash* 48: 38–42.

Mayr, E. 1996. What is a species and what is not? *Philosophy of Science* 63: 262–277.

Montoya-Burgos, J. I. 2006. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12: 1855–1867.

Nichol, S. T.; C. F. Spiropoulou; S. Morzunov; P. E. Rollinand; T. G. Ksiazek; H. Feldmann; A. Sanchez; J. Childs; S. Zaki & J.Peters. 1993. Genetic identification of hantavirus associate with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914–917.

Nixon, K. & J. Carpenter. 1993. On Outgroups. *Cladistics* 9: 413–426.

Oliver M. J.and Tuba, Z. & Mishler. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Jounal of Plant Ecology* 151: 85–100.

Olson, P.; J. Caira; K. Jensen; R. Overstreet; H. Palm & I. Beveridge. 2010. Evolution of the trypanorhynch tapeworms: parasite phylogeny supports independent lineages of sharks and rays. *International Journal for Parasitology* 40: 223–242.

Pimvichai, P.; H. Enghoff & S. Panha. 2014. Molecular phylogeny of the *Thyropygus allevatus* group of giant millipedes and some closely related groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 170–183.

Pleijel, F.; U. Jondelius; E. Norlinder; A. Nygren; B. Oxelman; C Schander; P. Sundberg & M. Thollesson. 2008. Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics Evolution* 48: 369–371.

Poulin, R. 2007. Evolutionary ecology of parasites. New Jersey: Princeton University Press. 332.

Queiroz, K de. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. Em: *Endless Forms: Species And Speciation*. Howard, D. & S. Berlocher (eds.). New York: Oxford University Press, pp. 57–75.

Queiroz, K. de. 2011. Branches in the lines of descent: Charles Darwin and the evolution of the species concept. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 19–35.

Rambaut, A. 2006-2009. Tree Figure Drawing Tool Version 1.3.1. Acesso em: 2 jul. 2014. URL: http://tree.bio.ed.ac.uk/.

Rego, A. A. 1979. Contribuição ao conhecimento dos helmintos das arraias fluviais Paratrygonidae. *Revista Brasileira de Biologia* 39: 879–890.

Reyda, F. B. 2008. Intestinal helminths of freswater stingrays in southeastern Peru, and a new genus and two new species of cestode. *Journal of Parasitology* 94: 684–699.

Reyda, F. B. & F. P. L. Marques. 2011. Diversification and species boundaries of *Rhinebothrium* (Cestoda; Rhinebothriidea) in South American freshwater stingrays (Batoidea; Potamotrygonidae). *PLoS ONE* 6: e22604.

Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4: 225–246.

Rincon-Filho, G. 2006. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no Rio Paraná-Tocantins. Diss. de mestrado. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. 132 pp.

Rohlf, F. J. 2010. Digitize coordinates of landmarks and capture outlines. Acesso em: 2 jul. 2014. URL: http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html.

Rosa, R. S. 1985. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrigonidae). Tese de doutorado. Williamsburg: The College of Willian e Mary. 542 pp.

Rosa, R. S.; P. E. Charvet-Almeida & C. C. D. Quijada. 2010. Biology of the South American potamotrygonid stingrays. Em: *Sharks and their Relatives Li : Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation.* Carrier J.C.; Musick, J. H. M. (ed.). New York: Crc Press, p. 736.

Rueckert, S.; P. M. A. H. Villette & B. S. Leander. 2011. Species boundaries in gregarine apicomplexan parasites: a case study-comparison of morphometric and molecular variability in *Lecudina* cf. *tuzetae* (Eugregarinorida, Lecudinidae). *The Journal of eukaryotic microbiology* 58: 275–283.

Sankoff, D. & P. Rousseau. 1975. Locating the vertices of a steiner tree in an arbitrary metric space. *Mathematical Programming* 9: 240–246.

Sarkar, I.; P. Planet; T. Bael; S. Stanley; M. Siddall; R. DeSalle & D. Figurski. 2000. Characteristic attributes in cancer microarrays. *Journal of Biomedical Informatics* 35: 111–122.

Schindelin, J.; I. Arganda-Carreras; E. Frise; V. Kaynig; M. Longair; T. Pietzsch; S. Preibisch; C. Rueden; S. Saalfeld; B. Schmid; J. Tinevez; D. J. White; V. Hartenstein; K. Eliceiri; P. Tomancak & A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676–682.

Shibuya, A.; M. L. G. Araujo & J. A. S. Zuanon. 2009. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4: 466–475.

Sites, J. W. J. & J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 462–470.

Sites, J. W. J. & J. C. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 35: 199–227.

Stepanek, R. & J. Kriwet. 2012. Contributions to the skeletal anatomy of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Myliobatiformes): 1. Morphology of male *Potamotrygon motoro* from South America. *Zoosystematics and Evolution* 88: 145–158.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 199–203.

Tamura, K.; G. Stecher; D. Peterson; A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

Tkach, V.; B. Grabda-Kazubska; J. Pawlowski & Z. Swiderski. 1999. Molecular and morphological evidence for close phylogenetic affinities of the genera *Macrodera*, *Leptophallus*, *Metaleptophallus* and *Paralepoderma* (Digenea, Plagiorchiata). *Acta Parasitologica* 44: 170–179.

Toffoli, D.; T. Hrbek; M. Araujo; M. P. Almeida; P. Charvet-Almeida & I.P.Farias. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31: 324–336.

Turner, R. L. 2006. Sequence variation in the mitochondrial cytochrome oxidase c 1 and the ribosomal 2nd internal transcribed spacer region from geographic diverse samples of *Paraorygmatobothrium* (Tetraphyllidea: Phyllobothriidae), collected from the Blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*. Diss. de mestrado. Virginia: West Virginia State University. 48 pp.

Turner, T.; M.V.McPhee; P. Campbell & K. Winemiller. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology* 64: 186–201.

Vari, R. 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. Em: *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Vanzolini, P. E. & W. R. Heyer (eds.). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, pp. 343–377.

Varón, A.; L. S. Vinh & W. C. Wheeler. 2010. POY version 4: phylogenetic analysis using dynamic homologies. *Cladistics* 26: 72–85.

Wang, Q.; I. W. B. Thornton & T. New. 1999. A cladistic analisys of the phoracanthine genus *Phoracantha* Newman (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae), with discussion of biogeographic distribution and pests status. *Annals of the Entomological Society of America* 92: 631–638.

Wheeler, W. C. 1996. Optimization Alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1–9.

Wheeler, W. C. 2001. Homology and the optimization of DNA sequence data. *Cladistics* 17: 3–11.

Wheeler, W. C. 2003. Iterative pass optimization. *Cladistics* 19: 254–260.

Wheeler, W. C.; L. Aagesen; C. P. Arango; J. Faivovich; T. Grant; C D'Haese; D. Janies; W. L. Smith; A. Varón & G. Giribet. 2006. Dynamic homology and phylogenetic systematics: a unified approach using POY. New York: American Museum of Natural History. 365 pp.

Williams, S. T. & T. Ozawa. 2006. Molecular phylogeny suggests polyphyly of both the turban shells (family Turbinidae) and the superfamily Trochoidea (Mollusca: Vetigastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 33–51.

Winemiller, K. O.; H. López-Fernández; D. C. Taphorn; L. G. Nico & A. B. Duque. 2008. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography* 35: 1551–1563.

Woodland, W. N. E. 1934. On six new cestodes from Amazon fishes. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1: 33–44.

Resumo

Arraias da família Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Myliobatoidei) são elasmobrânquios endêmicos dos sistemas fluviais da região Neotropical. Nestes hospedeiros residem uma diversa fauna parasitária que inclui vários gêneros de cestóideos. Tanto as arraias como seus cestóideos são derivados de ancestrais marinhos. A taxonomia e sistemática do sistema hospedeiro/parasita, no entanto, é pouco conhecida. Neste contexto, este estudo documenta, pela primeira vez a diversidade molecular das linhagens de *Potamotrygonocestus* empregando a otimização direta do genes 28S rDNA, ITS1 rDNA, Calmodulina e Citocromo Oxidase I. Objetiva-se avaliar o posicionamento filogenético de seus membros dentro de uma análise cladística. Os resultados corroboram a monofilia do gênero *Potamotrygonocestus* e recuperaram dois clados principais que correspondem a agrupamentos morfologicamente diagnosticados com base na morfologia do gancho. A hipótese filogenética apresentou indícios que *P. chaoi* e *P. marajoara* são sinônimos júnior de *P. travassosi*, e que *P. orinoconoensis* é uma espécie válida. Adicionalmente, os resultados indicam a existência de 14 novas linhagens que podem ser elevadas ao nível de espécie. Os membros *Potamotrygonocestus* revelaram ser mais especialistas aos seus hospedeiros do que se acreditava e, em relação à biogeografia, a hipótese filogenética apresentou padrões biogeográficos semelhantes a diversos membros da ictiofauna neotropical. A ampliação da representatividade biogeográfica bem como a inclusão de dados moleculares à sistemática do gênero possibilitou reconhecer padrões de distribuição e de infestação que antes eram desconhecidos. Esse refinamento pode contribuir de forma interessante para os outros gêneros parasitas de potamotrigonídeos.

Palavras-chave: *Potamotrygonocestus*, sistemática, otimização direta.

Abstract

Stingrays of the Potamotrygonidae family (Chondrichthyes: Myliobatoidei) are endemic elasmobranchs of river systems in the Neotropics. In these hosts a reside diverse fauna of parasite which includes many genera of tapeworms (Cestoda). Both stingrays and their cestodes are derived from marine ancestors. However, the taxonomy and systematics of this host/parasite system is poorly known. This study documents, for the first time, the molecular diversity of *Potamotrygonocestus* lineages by employing the direct optimization of 28S rDNA, ITS1 rDNA, Calmodulin and Cytochrome Oxidase I genes. The goal of this study is to understand the phylogenetic position of its members within a cladistic analysis. The results support the monophyly of the genus *Potamotrygonocestus* and recovered two main clades morphologically diagnosed based on hook morphology hook. The phylogenetic hypothesis presented supports the contention that *P. chaoi* and *P. marajoara* are junior synonyms of *P. travassosi*, and *P. orinoconoensis* should be considered a valid specie. Additionally, the results suggest that there are 14 new lineages that can be raised to the level of species. Members of *Potamotrygonocestus* proved to be more host specific than previously thought and, in relation to its biogeography, the phylogenetic hypothesis presented mirrors similar patterns of area association reported for many members of the Neotropical ichthyofauna. The expansion of biogeographical representativeness and inclusion of the molecular data in systematics of the genus allowed the recognition of distribution and infestation patterns that were previously unknown. This refinement could be interesting for other potamotrigonids genus parasites.

Keywords: *Potamotrygonocestus*, systematics, direct optimization.

Anexos

1 Material de hospedeiros disponíveis para o estudo

Tabela A.5: Representatividade taxonômica e biogeográfica dos hospedeitos amostrados.

Código*	Hospedeiro	Localidade de Coleta	LAT.	LONG.	Data
		Bacia Amazônica			
JU12-02	*Potamotrygon* cf. *motoro*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,8494	-66,9299	21/09/2012
JU12-04	*Paratrygon aiereba*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,8494	-66,9299	22/09/2012
JU12-05	*Potamotrygon scobina*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	24/09/2012
JU12-06	*Potamotrygon* cf. *motoro*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	24/09/2012
JU12-10	*Potamotrygon* sp.	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	25/09/2012
JU12-11	*Potamotrygon* cf. *orbignyi*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	25/09/2012
JU12-12	*Potamotrygon scobina*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	25/09/2012
JU12-13	*Potamotrygon scobina*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	26/09/2012
JU12-16	*Potamotrygon* sp.	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	27/09/2012
JU12-17	*Potamotrygon* sp.	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	27/09/2012
JU12-18	*Paratrygon aiereba*	Rio Jutaí, Jutaí, AM/Brasil	-2,9235	-66,9521	27/09/2012
PA07-15	*Potamotrygon scobina*	Baia de Marajó, Colares, PA/Brasil	-0,9263	-48,2904	18/08/2007
PA07-31	*Plesiotrygon iwamae*	Baia de Marajó, Colares, PA/Brasil	-0,9263	-48,2904	20/08/2007
PA07-38	*Plesiotrygon iwamae*	Baia de Marajó, Colares, PA/Brasil	-0,9263	-48,2904	21/08/2007
PA07-41	*Potamotrygon orbignyi*	Baia de Marajó, Colares, PA/Brasil	-0,9263	-48,2904	22/08/2012
PA07-55	*Potamotrygon motoro*	Igarapé do Urubu, Cachoeira do Arari, PA/Brasil	-0,9995	-48,9646	28/08/2012
RN11-05	*Potamotrygon* sp. (cururu)	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	09/01/2011
RN11-08	*Potamotrygon* sp. (cururu)	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	09/01/2011
RN11-01	*Potamotrygon* sp. (cururu)	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	09/01/2011

– continua na próxima página

Tabela A.5 – Continuação.

Código*	Hospedeiro	Localidade de Coleta	LAT.	LONG.	Data
RN11-15	*Potamotrygon* sp. (cururu)	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	09/01/2011
RN11-28	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	10/01/2011
RN11-37	*Paratrygon aiereba*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,83308	-63,0427	12/01/211
RN11-39	*Paratrygon aiereba*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,83308	-63,0427	12/01/211
RN11-55	*Potamotrygon motoro*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,6635	-63,01689	14/01/2011
RN11-57	*Potamotrygon motoro*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,6635	-63,01689	16/01/2011
RN11-61	*Potamotrygon schroederi*	Rio Negro, Barcelos, AM/Brasil	-0,95844	-62,93742	16/01/2011
SO11-01	*Plesiotrygon iwamae*	Rio Solimões, Careiro da Varzea, AM/Brasil	-3,299167	-60,053055	29/10/2011
SO11-02	*Paratrygon aiereba*	Rio Solimões, Careiro da Varzea, AM/Brasil	-3,299167	-60,053055	29/10/2011
SO11-03	*Paratrygon aiereba*	Rio Solimões, Careiro da Varzea, AM/Brasil	-3,299167	-60,053055	29/10/2011
SO11-05	*Plesiotrygon iwamae*	Rio Solimões, Careiro da Varzea, AM/Brasil	-3,299167	-60,053055	29/10/2011
SO11-07	*Plesiotrygon iwamae*	Rio Solimões, Careiro da Varzea, AM/Brasil	-3,299167	-60,053055	29/10/2011
PU09-04	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Amazonas, Iquitos, Peru	-3,74805	-73,2472	17/10/2009
PU09-10	*Potamotrygon motoro*	Rio Puinahua, Iquitos, Peru	-3,74805	-73,2472	16/10/2009
PU09-27	*Paratrygon* sp.	Rio Navay, Iquitos, Peru	-3,64277	-73,2138	18/10/2009
		Bacia do Tocantins-Araguaia			
TO13-02	*Potamotrygon* sp.	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	06/10/2013
TO13-03	*Potamotrygon* sp.	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	06/10/2013
TO13-05	*Potamotrygon* sp.	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	06/10/2013
TO13-09	*Paratrygon aiereba*	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	08/10/2013
TO13-11	*Paratrygon aiereba*	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	08/10/2013
TO13-13	*Paratrygon aiereba*	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	08/10/2013
TO13-15	*Potamotrygon* sp.	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	08/10/2013
TO13-19	*Potamotrygon* sp.	Rio Tocantins, Ipueras, TO/Brasil	-11,230097	-48,460878	08/10/2013

– continua na próxima página

Tabela A.5 – Continuação.

Código*	Hospedeiro	Localidade de Coleta	LAT.	LONG.	Data
		Bacia do Prata			
MS10-11	*Potamotrygon histrix*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-12	*Potamotrygon motoro*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-13	*Potamotrygon histrix*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-14	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-15	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-16	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	11/07/2010
MS10-20	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	07/07/2010
MS10-21	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	12/07/2010
MS10-23	*Potamotrygon* cf. *schuhmacheri*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	12/07/2010
MS10-24	*Potamotrygon motoro*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	12/07/2010
MS10-27	*Potamotrygon motoro*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	12/07/2010
MS10-29	*Potamotrygon amandae*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	13/07/2010
MS10-30	*Potamotrygon motoro*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	13/07/2010
MS10-34	*Potamotrygon histrix*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	13/07/2010
MS10-40	*Potamotrygon histrix*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	13/07/2010
MS10-41	*Potamotrygon* cf. *histrix*	Rio Salobrinha, Miranda, MS/Brasil	-20,21706	-56,49527	13/07/2010
MT12-06	*Potamotrygon motoro*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012
MT12-10	*Potamotrygon motoro*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012
MT12-13	*Potamotrygon motoro*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	18/07/2012
MT12-17	*Potamotrygon brachyura*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012
MT12-18	*Potamotrygon brachyura*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012
MT12-20	*Potamotrygon brachyura*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012
MT12-21	*Potamotrygon brachyura*	Rio Mutum, Barão de Melgaço, MT/Brasil	-16,2988	-55,8037	17/07/2012

– continua na próxima página

Tabela A.5 – Continuação.

Código*	Hospedeiro	Localidade de Coleta	LAT.	LONG.	Data
		Bacia do Orinoco			
VZ13-21	*Paratrygon aiereba*	Río Tomo, Puerto Ayacucho, Venezuela	5,278083	-67,836389	23/01/2013
VZ13-22	*Paratrygon aiereba*	Río Tomo, Puerto Ayacucho, Venezuela	5,278083	-67,836389	23/01/2013
VZ13-25	*Potamotrygon schroederi*	Río Tomo, Puerto Ayacucho, Venezuela	5,278083	-67,836389	28/01/2013
VZ13-27	*Potamotrygon orbignyi*	San Fernando de Apure, Apure, Venezuela	7,90925	-67,5385	30/01/2013
VZ13-28	*Potamotrygon orbignyi*	San Fernando de Apure, Apure, Venezuela	7,90925	-67,5385	30/01/2013
VZ13-35	*Potamotrygon* sp.	Tucupita, Delta Amacuro, Venezuela	9,07575	-62,0955	07/02/2013
VZ13-37	*Potamotrygon* sp.	Tucupita, Delta Amacuro, Venezuela	9,07575	-62,0955	10/02/2013
VZ13-39	*Potamotrygon* sp.	Pedernales, Delta Amacuro, Venezuela	9,870611	-62,361222	13/02/2013
VZ13-40	*Potamotrygon* sp.	Pedernales, Delta Amacuro, Venezuela	9,870611	-62,361222	13/02/2013
VZ13-57	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	15/02/2013
VZ13-58	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	15/02/2013
VZ13-59	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-60	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-61	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-62	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-63	*Potamotrygon* sp.	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-71	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	16/02/2013
VZ13-85	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	17/02/2013
VZ13-86	*Paratrygon aiereba*	Rio Orinoco, Curiapo, Venezuela	8,597222	-60,934611	17/02/2013
		Bacia do Maracaibo			
VZ11-26	*Potamotrygon orbignyi*	Rio Apure/Guaritico, Muñoz, Venezuela	7,892361	-68,8805	28/02/2011
		Oceano Atlântico			
EH-1	*Prionace glauca*	Oceano Atlântico, Star Island, EUA	41,071388	-71,935277	

– continua na próxima página

Tabela A.5 – Continuação.

Código*	Hospedeiro	Localidade de Coleta	LAT.	LONG.	Data
		Rio Ilistaya			
RUS32	*Trachysurus fulvidraco*	Rio Ilistaya, Chernigovka, Russia	44,44638	132,42222	20/06/2011

* Dados sobre localidades e hospedeiros estão disponíveis em
http://tapewormdb.uconn.edu/index.php/hosts/specimen_search/elasmobranch.

2 Material de cestóideos disponíveis para o estudo

Tabela A.6: Lista de indivíduos utilizados com seus respectivos números moleculares, de campo e de tombo (MZUSP), seguido de suas identificações, hospedeiros e procedências e os quatros fragmentos genômicos sequenciados. Informações adicionais podem ser obtidas na Tabela A.5. Linha horizontal no final da tabela representa delimitação dos terminais utilizados como grupos externos na análise filogenética.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P038	SO11-1.1	7538	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P039	SO11-5-1	7539	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•		•	•
P049	SO11-7.1	7540	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P041	SO11-7.2	7541	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P042	SO11-7.3	7542	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P043	SO11-7.4	7543	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P044	SO11-7.5	7544	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P045	SO11-7.6	7545	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P046	SO11-7.7	7546	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P047	SO11-7.8	7547	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P027	PA07-38.2	7548	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Delta do Amazonas/PA, Brasil	•	•	•	•
P028	PA07-38.3	7549	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Delta do Amazonas/PA, Brasil	•	•	•	•
P029	PA07-38.5	7550	*P. travassosi* ex *Pl. iwamae*, Delta do Amazonas/PA, Brasil	•	•	•	•
P061	PA07-41.9	7551	*P. travassosi* ex *Po. orbignyi*, Delta do Amazonas/PA, Brasil	•	•		•
P063	PA07-55.2.3	7552	*P. travassosi* ex *Po. motoro*, Delta do Amazonas/PA, Brasil	•		•	
P222	VZ13-39.1	7553	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P223	VZ13-39.2	7554	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P149	VZ13-58.1	7555	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P150	VZ13-59.2	7556	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P151	VZ13-59.3	7557	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P153	VZ13-60.1	7558	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P154	VZ13-60.2	7559	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P155	VZ13-60.3	7560	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P156	VZ13-61.1	7561	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P157	VZ13-61.2	7562	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela			•	•
P158	VZ13-61.3	7563	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P159	VZ13-62.1	7564	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P161	VZ13-62.3	7565	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P162	VZ13-62.4	7566	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P163	VZ13-62.5	7567	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P164	VZ13-63.1	7568	*P.* oriconoensis ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P167	VZ13-71.2	7569	*P.* oriconoensis ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P168	VZ13-71.3	7570	*P.* oriconoensis ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P169	VZ13-71.4	7571	*P.* oriconoensis ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P018	RN11-37.11	7572	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P019	RN11-37.12	7573	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P020	RN11-37.13	7574	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P021	RN11-37.14	7575	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P022	RN11-37.15	7576	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•		•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P013	RN11-39.21	7577	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P015	RN11-39.23	7578	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P016	RN11-39.24	7579	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•		•
**	RN11-39	7580	*P. fitzgeraldae* ex *Pa. aiereba*, Rio Negro/AM, Brasil				
P023	RN11-61.1	7581	*P. fitzgeraldae* ex *Po. schroederi*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P001	RN11-28.2	7582	*P. maurae* ex *Po. orbignyi*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•		•
P002	RN11-28.3	7583	*P. maurae* ex *Po. orbignyi*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•		•
P003	RN11-28.4	7584	*P. maurae* ex *Po. orbignyi*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P004	RN11-28.5	7585	*P. maurae* ex *Po. orbignyi*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P188	PU09-10.1	7586	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Alto Solimões, Peru	•	•	•	
P086	MS10-12.4	7587	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P087	MS10-12.5	7588	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P103	MS10-24.2	7589	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	
P104	MS10-27.1	7590	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P106	MS10-30.1	7591	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P053	MT12-13.1	7592	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P055	MT12-13.3	7593	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•		•
P058	MT12-6.4	7594	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P059	MT12-6.5	7595	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 1 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P081	MS10-11.1	7596	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P083	MS10-11.3	7597	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P084	MS10-11.4	7598	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P088	MS10-13.1	7599	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P089	MS10-13.2	7600	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P090	MS10-14.4	7601	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P091	MS10-14.5	7602	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P092	MS10-15.1	7603	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P093	MS10-15.5	7604	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P094	MS10-15.6	7605	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P095	MS10-16.1	7606	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P096	MS10-16.3	7607	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P182	MS10-16.4	7608	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P183	MS10-16.5	7609	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P184	MS10-16.6	7610	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P185	MS10-20.1	7611	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P097	MS10-21.4	7612	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P098	MS10-21.5	7613	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P099	MS10-21.6	7614	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P100	MS10-23.1	7615	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P101	MS10-23.2	7616	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P102	MS10-23.3	7617	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P189	MS10-23.4	7618	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P190	MS10-23.5	7619	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P105	MS10-29.1	7620	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. amandae*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P192	MS10-34.2	7621	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P193	MS10-34.3	7622	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P195	MS10-34.5	7623	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•			•
P107	MS10-40.1	7624	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P108	MS10-40.2	7625	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po. histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•		•
P109	MS10-41.3	7626	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 2 ex *Po.* cf *histrix*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P050	MT12-10.1	7627	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•		•
P051	MT12-10.2	7628	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P052	MT12-10.3	7629	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P054	MT12-13.2	7630	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P069	MT12-17.1	7631	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•		•
P070	MT12-17.2	7632	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P071	MT12-17.3	7633	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•		•
P072	MT12-18.1	7634	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P073	MT12-18.2	7635	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P074	MT12-18.3	7636	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P075	MT12-20.1	7637	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P076	MT12-20.2	7638	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P077	MT12-20.3	7639	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P078	MT12-21.1	7640	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P079	MT12-21.2	7641	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P080	MT12-21.3	7642	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po.* brachyura, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P056	MT12-6.2	7643	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•	•	•
P057	MT12-6.3	7644	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 3 ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MT, Brasil	•	•		•
P127	JU12-10.1	7645	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P128	JU12-10.2	7646	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P129	JU12-10.3	7647	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P130	JU12-11.3	7648	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *orbignyi*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P132	JU12-11.5	7649	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *orbignyi*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P133	JU12-12.1	7650	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P134	JU12-12.2	7651	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P135	JU12-12.3	7652	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P136	JU12-13.1	7653	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P137	JU12-13.2	7654	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P138	JU12-13.3	7655	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil		•	•	•
P139	JU12-16.1	7656	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P140	JU12-16.2	7657	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•		•
P141	JU12-17.1	7658	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil			•	•
P142	JU12-17.2	7659	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P143	JU12-17.3	7660	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* sp, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P117	JU12-4.1	7661	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P120	JU12-4.4	7662	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P122	JU12-5.2	7663	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P230	JU12-5.3	7664	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•		•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P123	JU12-6.1	7665	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil			•	•
P124	JU12-6.2	7666	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P125	JU12-6.3	7667	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P229	JU12-6.5	7668	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P186	PU09-27.1	7669	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões, Peru	•	•	•	•
P187	PU09-4.1	7670	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 4 ex *Po. orbignyi*, Alto Solimões, Peru	•	•	•	
P144	JU12-18.1	7671	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P145	JU12-18.2	7672	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P146	JU12-18.3	7673	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P118	JU12-4.2	7674	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P119	JU12-4.3	7675	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P113	SO11-2.1	7676	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P114	SO11-2.2	7677	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•		•
P115	SO11-2.3	7678	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P111	SO11-3.2	7679	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•		•
P112	SO11-3.3	7680	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Baixo Solimões/AM, Brasil	•	•	•	•
P240	TO13-11.1	7681	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P242	TO13-13.1	7682	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P243	TO13-13.2	7683	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P244	TO13-13.3	7684	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil		•	•	•
P246	TO13-13.5	7685	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P238	TO13-9.1	7686	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P239	TO13-9.2	7687	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 5 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P173	VZ13-86.1	7688	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 6 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•		•
P204	VZ13-21.1	7689	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela		•	•	
P205	VZ13-21.2	7690	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•		•
P206	VZ13-22.1	7691	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•		•	
P207	VZ13-22.2	7692	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P148	VZ13-57.2	7693	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P208	VZ13-25.1	7694	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Po. schroederi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P209	VZ13-25.2	7695	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 7 ex *Po. schroederi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P245	TO13-13.4	7696	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	
P232	TO13-2.2	7697	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P233	TO13-2.3	7698	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P234	TO13-2.4	7699	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	
P236	TO13-5.1	7700	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P237	TO13-5.2	7701	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 8 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P005	RN11-57.18	7702	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P007	RN11-57.20	7703	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P008	RN11-57.21	7704	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P009	RN11-57.22	7705	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P010	RN11-57.23	7706	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P011	RN11-57.24	7707	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P012	RN11-57.25	7708	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 9 ex *Po. motoro*, Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P126	JU12-6.4	7709	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 10 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P121	JU12-5.1	7710	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 10 ex *Po.scobina*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P174	VZ13-86.2	7711	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P175	VZ13-86.3	7712	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P176	VZ13-86.4	7713	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P177	VZ13-86.5	7714	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Pa. aiereba*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P210	VZ13-25.3	7715	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po. schroederi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•		•
P217	VZ13-35.2	7716	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P218	VZ13-35.3	7717	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P219	VZ13-37.1	7718	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P220	VZ13-37.2	7719	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P221	VZ13-37.3	7720	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela		•	•	•
P152	VZ13-59.4	7721	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P165	VZ13-63.2	7722	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 11 ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P211	VZ13-27.1	7723	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 12 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•		
P212	VZ13-27.2	7724	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 12 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	
P249	RN11-1.1	7725	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P250	RN11-1.2	7726	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P252	RN11-15.1	7727	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	
P024	RN11-5.1	7728	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P026	RN11-5.3	7729	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•
P251	RN11-8.1	7730	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 13 ex *Po.* sp (cururu), Rio Negro/AM, Brasil	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P247	TO13-15.1	7731	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 14 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•		•
P248	TO13-19.1	7732	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 14 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil	•	•	•	•
P170	VZ13-85.1	7733	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 15 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P171	VZ13-85.2	7734	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 15 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P172	VZ13-85.3	7735	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 15 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P213	VZ13-28.1	7736	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P215	VZ13-28.3	7737	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P225	VZ13-28.4	7738	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P226	VZ13-28.5	7739	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	
P227	VZ13-28.6	7740	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P228	VZ13-28.7	7741	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
P147	VZ13-57.1	7742	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela	•	•	•	•
**	VZ13-28.2	7743	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 16 ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela				
P116	JU12-2.1	7744	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 17 ex *Po.* cf. *motoro*, Alto Solimões/AM, Brasil	•	•	•	
P235	TO13-3.1	7745	*Potamotrygonocestus* sp. nov. 18 ex *Po.* sp., Bacia do Tocantins/TO, Brasil		•	•	•
**	VZ13-74.3	7746	*P. oriconoensis* ex *Po. orbignyi*, Bacia do Orinoco, Venezuela				
P203	VZ11-26.1	7747	*Acanthobothrium* sp. ex *Po. orbignyi*, Rio Apure, Venezuela	•	•		
P085	MS10-12.3	7748	*Acanthobothrium* sp. ex *Po. motoro*, Bacia do Prata/MS, Brasil	•	•	•	•
P216	VZ13-35.1	7749	*Acanthobothrium* sp. ex *Po.* sp., Bacia do Orinoco, Venezuela		•	•	
P068	RUS32#	7750	*Gangesia* cf. *oligonchis* ex *Trachysurus fulvidraco*, Rio Ilistaya, Russia	•	•		•
P064	EH-1#	7751	*Platybothrium auriculatum* ex *Prionace glauca*, Oceano Atlantico, EUA	•	•	•	•
P065	EH-1#	7752	*Platybothrium auriculatum* ex *Prionace glauca*, Oceano Atlantico, EUA	•	•	•	•

–continua na próxima página

Tabela A.6 – Continuação.

Código Molecular	Código de Campo†	MZUSP	Exemplar sequenciado, hopedeiro e localidade de coleta	Marcadores			
				COI	28S	ITS	Calm
P066	EH-1#	7753	*Platybothrium auriculatum* ex *Prionace glauca*, Oceano Atlantico, EUA	•	•	•	•

† Códigos de campo correspondem às localidades na Figura 1.

Para mais informações, veja http://tapewormdb.uconn.edu/index.php/hosts/specimen_search/elasmobranch.

** Exemplares não sequenciados. # Tecidos emprestados da coleção de Institute of Parasitology, República Checa.

3 Médias das distâncias fenéticas das matrizes de sequências nucleotídicas de COI e nucleares

Tabela A.7: Médias internas das distâncias fenéticas por clado para as matrizes: COI e nucleares em Mega6

Clado	Distância Matriz COI	Distância Matriz Nuclear
G.E.	0,1152445262	0,2031882264
A3.3.1	0,0048051906	0,0109903653
A3.3.2	0,0006631301	0,0018416227
A3.3.3	0,0013807814	0,0037836921
A3.2.0	0,0023148353	0,0019133136
A3.1.0	0,0026951528	0,0076126166
A2.2.1	0,0037125436	0,0045547514
A2.2.2	0,0004794539	0,0012282024
A2.2.3	n/c	n/c
A2.1.0	0,0032726739	0,0075602449
A1.2.1	0,0006543441	0,0020060613
A1.2.2	0,0007290025	0,0016156464
A1.1.1	0,0042217536	0,0120032449
A1.1.2	0,0011934903	0,0006205025
B1.1.0	0,002474201	0,0071897899
B1.2.0	n/c	n/c
B1.3.0	0,0002138516	0,0006415363
B1.4.0	0,0006031364	0,0018416227
B1.5.0	0,0026563783	0,0073963875
B2.1.0	0,0017358567	0,0046171397
B2.2.0	0,0016097611	0,0049240788
B3.1.1	0,0024606764	0,0026965481
B3.1.2	n/c	n/c
B3.2.1	0,0007614807	0,0021148606
B3.2.2	n/c	não existe

Tabela A.8: Médias das distâncias fenéticas entre clados para a matriz de COI em Mega6

Clado	Distância entre os clados																		
0																			
A3.3.1	0,26																		
A3.3.2	0,25	0,08																	
A3.3.3	0,24	0,08	0,07																
A3.2.0	0,24	0,08	0,08	0,06															
A3.1.0	0,26	0,13	0,14	0,11	0,12														
A2.2.1	0,26	0,22	0,21	0,20	0,17	0,19													
A2.2.2	0,25	0,21	0,21	0,21	0,18	0,19	0,04												
A2.2.3	0,26	0,22	0,20	0,20	0,18	0,21	0,08	0,09											
A2.1.0	0,26	0,19	0,19	0,19	0,18	0,21	0,17	0,18	0,18										
A1.2.1	0,26	0,20	0,21	0,19	0,19	0,19	0,21	0,23	0,22	0,20									
A1.2.2	0,25	0,19	0,20	0,19	0,19	0,19	0,21	0,22	0,21	0,20	0,02								
A1.1.1	0,26	0,19	0,20	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20	0,20	0,21	0,15	0,14							
A1.1.2	0,26	0,20	0,21	0,20	0,20	0,19	0,23	0,22	0,24	0,23	0,14	0,13	0,13						
B1.1.0	0,25	0,21	0,19	0,18	0,19	0,20	0,22	0,21	0,23	0,22	0,21	0,20	0,21	0,20					
B1.2.0	0,26	0,22	0,20	0,19	0,20	0,20	0,23	0,22	0,23	0,24	0,23	0,22	0,21	0,21	0,05				
B1.3.0	0,26	0,22	0,19	0,19	0,19	0,20	0,22	0,21	0,21	0,23	0,22	0,21	0,21	0,21	0,04	0,05			
B1.4.0	0,26	0,22	0,19	0,19	0,19	0,20	0,21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,22	0,23	0,21	0,05	0,06	0,06		
B1.5.0	0,26	0,25	0,23	0,20	0,21	0,23	0,22	0,21	0,22	0,23	0,26	0,25	0,23	0,21	0,12	0,13	0,12	0,13	
B2.1.0	0,27	0,22	0,20	0,19	0,20	0,21	0,23	0,24	0,25	0,22	0,24	0,23	0,21	0,23	0,20	0,20	0,19	0,21	0,20

–continua na próxima página

Tabela A.8 – Continuação.

Clado	Distância entre os clados																					
B2.2.0	0,28	0,23	0,22	0,22	0,21	0,21	0,22	0,22	0,24	0,21	0,23	0,23	0,22	0,23	0,21	0,21	0,21	0,23	0,23	0,12		
B3.1.1	0,28	0,26	0,25	0,27	0,25	0,27	0,25	0,26	0,26	0,28	0,23	0,22	0,25	0,23	0,24	0,24	0,23	0,25	0,27	0,25	0,24	
B3.1.2	0,29	0,29	0,27	0,28	0,26	0,29	0,25	0,26	0,25	0,28	0,23	0,23	0,26	0,27	0,25	0,26	0,27	0,26	0,30	0,25	0,27	0,13
B3.2.1	0,30	0,26	0,24	0,24	0,24	0,26	0,23	0,24	0,23	0,28	0,26	0,25	0,28	0,24	0,20	0,21	0,21	0,22	0,22	0,26	0,26	0,20	0,23

Tabela A.9: Médias das distâncias fenéticas entre clados para a matriz de nucleares em Mega6

Clado	Distância entre os clados										
0											
A3.3.1	0,14										
A3.3.2	0,13	0,03									
A3.3.3	0,13	0,03	0,02								
A3.2.0	0,14	0,04	0,04	0,03							
A3.1.0	0,14	0,04	0,05	0,04	0,05						
A2.1.0	0,13	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08					
A2.2.1	0,13	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,06				
A2.2.2	0,12	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,02			
A2.2.3	0,13	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,06	0,03	0,03		
A1.2.1	0,14	0,08	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	
A1.2.2	0,14	0,09	0,09	0,08	0,10	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,01

–continua na próxima página

Tabela A.9 – Continuação.

Clado	Distância entre os clados																						
A1.1.1	0,14	0,08	0,08	0,07	0,09	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,04	0,05											
A1.1.2	0,14	0,08	0,08	0,07	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,04	0,05	0,04										
B1.1.0	0,14	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11									
B1.2.0	0,15	0,11	0,10	0,09	0,12	0,10	0,12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,02								
B1.3.0	0,15	0,12	0,11	0,10	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,11	0,11	0,02	0,02							
B1.4.0	0,14	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,11	0,12	0,12	0,11	0,02	0,02	0,02						
B1.5.0	0,15	0,12	0,11	0,10	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,12	0,13	0,12	0,11	0,04	0,04	0,04	0,04					
B2.1.0	0,16	0,12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12	0,13	0,12	0,13	0,12	0,12	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09				
B2.2.0	0,16	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,13	0,12	0,12	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,04			
B3.1.1	0,15	0,13	0,12	0,12	0,14	0,13	0,14	0,13	0,12	0,13	0,12	0,13	0,13	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11		
B3.1.2	0,15	0,13	0,12	0,12	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,12	0,13	0,05	
B3.2.1	0,16	0,13	0,13	0,12	0,14	0,14	0,14	0,13	0,13	0,13	0,14	0,15	0,14	0,13	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,10	0,11
B3.2.2	0,13	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,05

4 Preparação de lâminas de hologenóforos

- Hologenóforos em etanol 100% foram hidratação em séries alcoólicas regressivas
  - Etanol 70%: 3 min
  - Etanol 50%: 3 min
  - Etanol 30%: 3 min
  - Água destilada I: 3 min
  - Água destilada II: 3 min
- Exemplares hidratados foram corados com Hematoxilina de Delafield por 30-120 min
- Amostras coradas foram hidratadas em séries alcóolicas progressivas
  - Etanol 30%: 3 min
  - Etanol 50%: 3 min
  - Etanol 70%: 3 min
  - Neste ponto, sempre que necessário, o excesso de corante foi removido
    - Manter a amostra corada em solução alcoólica (etanol 70%) de HCl 1% até a remoção do excesso de corante
    - Transferir para solução alcóolica (etanol 70%) de hidróxido de amônia 2% por 1min
  - Etanol 100% I: 3min
  - Etanol 100% II: 3min
- Amostras coradas e desidratadas foram diafanizadas em Salicilato de Metila
  - Salicilato de Metila 75%: 3min
  - Salicilato de Metila 100% I: 3min
  - Salicilato de Metila 100% II: 3min
- Hologenóforos foram montados em lâmina e lamínula com Bálsamo do Canadá

5 Protocolo otimizado para extração de DNA genômico com DNAdvance ™

Diferentes métodos para isolar DNA genômico de uma variedade de espécies de cestodas foi testado. Dentre todos os métodos averiguados, o melhor rendimento foi obtido para o kit de isolamento de DNA Agencourt® DNAdvance™, que forneceu extrações mais limpas e com maiores concentrações de DNA.

Este protocolo foi otimizado para tubos eppendorf de 200µL e pequenas amostras de tecidos de cestodas (<3mm^3). É altamente recomendado que o tecido seja cortado em pedaços pequenos diretamente dentro dos eppendorfs de 200µL. O excesso de etanol deve então ser removido com a ajuda de uma micropipeta ou por outros meios. Antes de dar início ao protocolo, deixe as amostras secarem a temperatura ambiente ou a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Este protocolo empregará a placa magnética Agencourt® SPRIPlate Super Magnet Plate (96-well format, produto no. A32782, a mesma placa empregada para a purificação com o kit Agencourt® AMPure® XP)

- Mix para digestão (80µL por amostra).
  - Prepare o mix conforme a tabela abaixo. Feito isso, misture gentilmente no vórtex e dê um spin para que o material que estiver na tampa vá para o fundo do eppendorf.

Lysis Buffer	73µl
1M DTT	5µl
Proteinase K (20mg/ mL)	4µl
Volume Final	80µl

  - É aconselhável preparar o mix de digestão no gelo. O mix deve ser preparado apenas em quantidade suficiente e ser usado imediatamente após o preparo.
- Adicione 80µl do mix de digestão em cada tudo. Deposite as amostras no vórtex por alguns segundos, em seguida centrifugue gentilmente.
- Incubar a 55°C
  - Mexa as amostras s cada 15 minutos até a digestão total do tecido (o que geralmente demora menos de uma hora mas depende da quantidade de tecido).
- Centrifugue a 15.7 RCF por 10s.
  - Neste momento as amostras poderão ser armazenadas a -70°C caso os passos subsequentes não forem ser realizados imediatamente.

- Adicione 50µl da solução tamponante Bind1 e pipete até ficar homogêneo.
- Misture o conteúdo do frasco de Bind2 até que todas as partículas estejam suspensas e a mistura esteja homogênea.
- Adicione 80µl de Bind2 em cada amostra. Pipete até a mistura ficar homogênea.
- Incube as amostra em temperatura ambiente por 3 minutos.
- Posicione as amostras na placa magnética e aguarde 10 minutos.
- Aspire e descarte o sobrenadante enquanto as amostras estão posicionadas sobre a placa magnética.
  - Ao aspirar, posicione a ponta da pipeta no centro do tubo e cuide para que o anel de partículas magnéticas não se desfaça.
- Retire as amostras da placa. Adicione 150µL de etanol 70% e pipete até que as partículas magnéticas estejam completamente suspensos.
  - Sugere-se que novas soluções de etanol 70% sejam preparadas a cada vez que for repetir este protocolo.
- Reposicione as amostras na placa magnética por 5 minutos.
- Repita os três passos anteriores até ter completado um total de três lavagens com etanol 70%.
- Remova o máximo de etanol possível antes de adicionar o Elution Buffer.
  - Sugere-se secar a temperatura ambiente ou a 37°C por não mais que 15 minutes.
- Retire as amostras da placa magnética. Adicione 100µL de Elution Buffer e misture com a pipeta até que todas as partículas estejam em suspensão.
- Reposicione as amostras sobre a placa magnética por 6 minutos.
- Transfira 80µL do sobrenadante para uma placa limpa ou tubo de armazenamento.
- Se as amostras forem ser armazenadas por um longo período antes do uso, mantenha-as a -70°C. Armazene as amostras entre 4 e -20°C enquanto as estiver usando.

6 Protocolo otimizado para purificação de DNA genômico com AMPure® kit

- Adicione um volume de Agencourt® AMPure® XP iqual a 1,8 vezes o volume de amostra a ser purificada.
  - O volume final não deve ser menor do que 25µL ou a placa magnética não será capaz de separar as partículas magnéticas do retante da solução.
- Posicione as amostras no vórtex brevemente. Em seguida, centrifugue-as brevemente para que todo o material da tampa vá para o fundo do tubo.
- Incube em temperatura ambiente por 5 minutos.
- Posicione as amostras na placa magnética (Agencourt® SPRIPlate Super Magnet Plate, produto no. A32782) por 3 minutes.
- Ainda com as amostras sobre a placa magnética, aspire e descarte o sobrenadante.
  - Enquanto estiver aspirando, posicione a pipeta no centro do tubo para evitar que o anel de partículas magnéticas seja desfeito.
- Adicione gentilmente 150µl de etanol 70% para não desfazer o anel.
  - Recomenda-se fazer novas soluções de etanol 70% a cada vez que se for repetir este protocolo.
- Repita os dois passos anteriores até se completarem duas lavagens com etanol 70%.
- Remova o máximo de etanol possível com a ajuda da pipeta.
  - Após ter removido o etanol com a pipeta, deixe as amostras secarem a 37°C por 15 minutos.
- Adicione 15µl de água Milli-Q misture até que todas as partículas estejam em suspensão.
- Deixe as amostras descansarem a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugue a 15,7 RCF por 3 minutos.
- Transfira o sobrenadante para um tubo novo e armazene a -20°C. Caso as amostras devam ser armazenadas por um longo período antes do uso, mantenha-as a -70°C.

7 Hipótese Filogenética utilizada no estudo

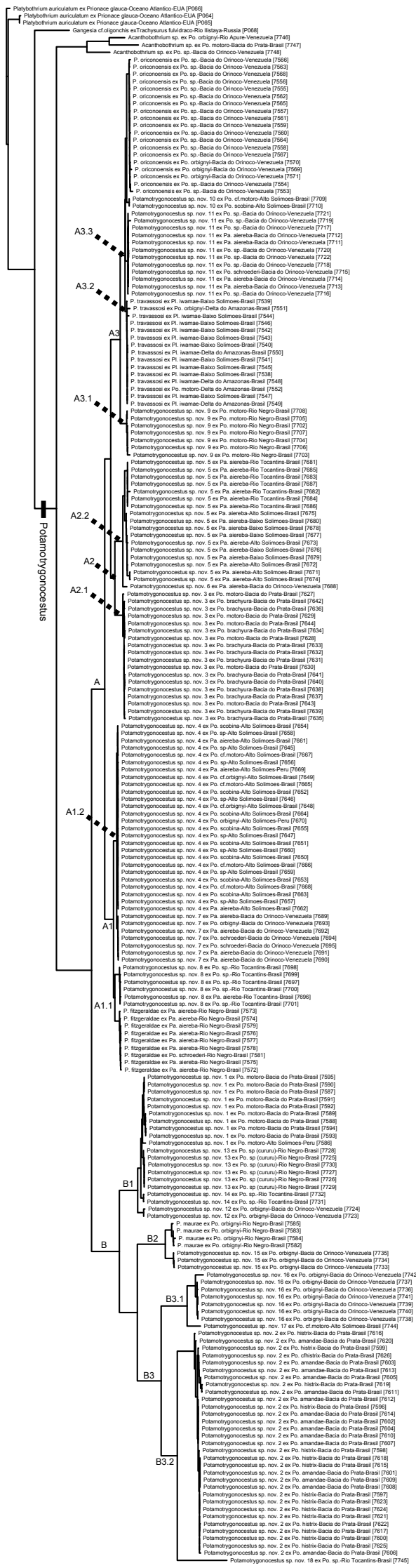


Figura A.16: Hipótese Filogenética com todos haplótipos, obtida sob o paramêtro 0:1:1:1 com comprimento total 4846 em POY, os comprimentos de ramos são proporcionais ao número de transformações. Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

8 Árvore de consenso estrito da análise completa em TNT

Figura A.17: Árvore de consenso estrito de todos os terminais em TNT, **análise completa**. Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.

9 Árvore de consenso estrito da análise parcial em TNT

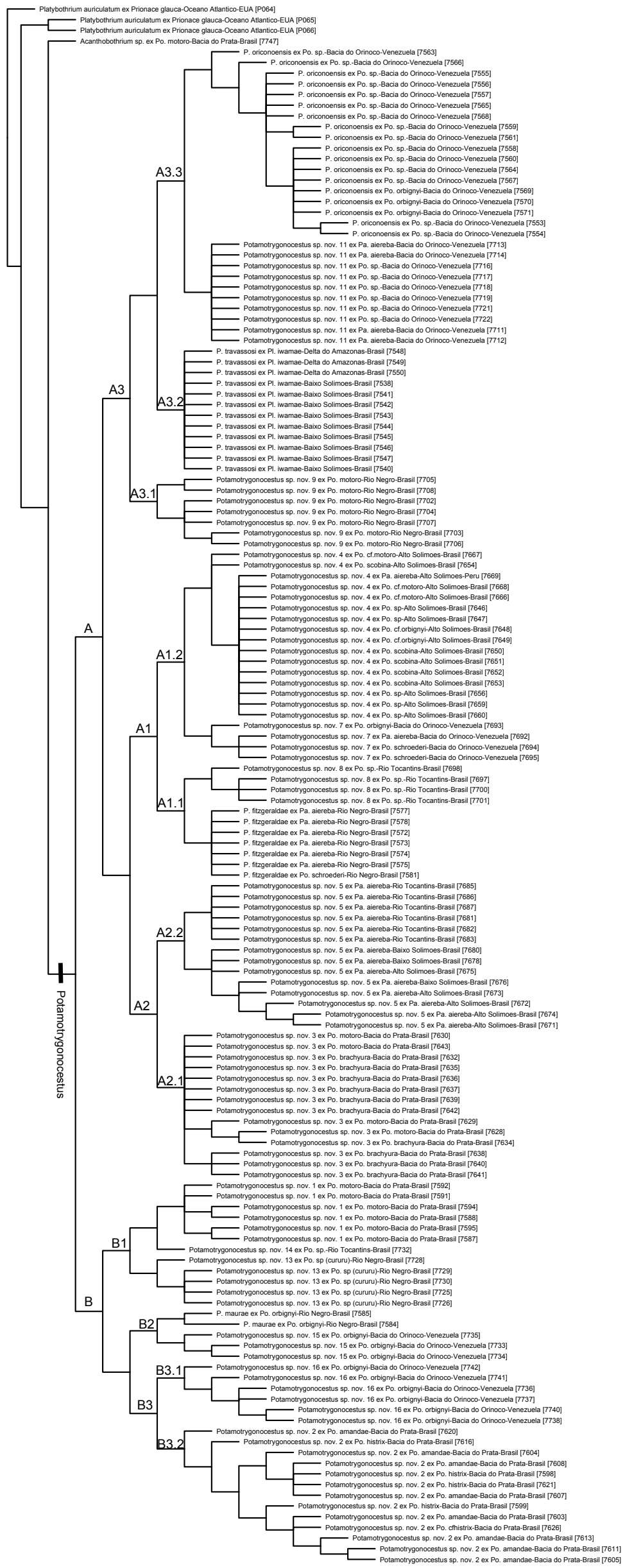


Figura A.18: Árvore de consenso estrito dos terminais que apresentaram sequências em todos os fragmentos genômicos em TNT, **análise parcial**. Cada terminal representa um haplótipo e seu respectivo número de tombo no MZUSP.