

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Roberto de Oliveira Marchesini

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE  
PERITRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) COM BASE EM  
SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA E CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE  
*Rhabdostyla inclinans* KENT, 1881 (PERITRICHIA, EPISTYLIDIDAE)**

Juiz de Fora  
2015

Roberto de Oliveira Marchesini

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE  
PERITRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) COM BASE EM  
SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA E CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE  
*Rhabdostyla inclinans* KENT, 1881 (PERITRICHIA, EPISTYLIDIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias  
Co-orientadores: Prof. Dra. Marta D'Agosto  
Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra

Juiz de Fora  
2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marchesini, Roberto de Oliveira.  
ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE PERITRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA E CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE *Rhabdostyla inclinans* KENT, 1881 (PERITRICHIA, EPISTYLIDIDAE) / Roberto de Oliveira Marchesini. -- 2015.  
121 p. : il.

Orientador: Roberto Júnio Pedroso Dias  
Coorientadora: Marta Tavares D' Agosto  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2015.

1. Filogenia molecular. 2. Epistylis. 3. Opercularia. 4. Operculariidae . 5. Sistemática. I. Dias, Roberto Júnio Pedroso, orient. II. D' Agosto, Marta Tavares, coorient. III. Título.

Roberto de Oliveira Marchesini

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE  
PERITRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) COM BASE EM  
SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA E CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE  
*Rhabdostyla inclinans* KENT, 1881 (PERITRICHIA, EPISTYLIDIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2015

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias (Orientador)**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Dr. Júlio Fernando Vilela**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedico esta dissertação aos meus pais Palmira e Roberto,  
a minha irmã, Raquel e a minha avó Aparecida,  
pelo apoio familiar incondicional.  
A Enir Bastos Marchesini (in memoriam)  
por inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me manter saudável e forte durante a minha caminhada acadêmica e por me cercar de pessoas muito especiais e sempre dispostas a contribuir. É graças à contribuição destas pessoas que finalizo esta pequena etapa de planos maiores que estão por vir.

Aos meus pais, **Palmira Marchesini e Roberto Marchesini** por sempre me apoiarem nos momentos mais difíceis. Por sempre servirem de base para que eu pudesse prosseguir com os meus sonhos e minhas ideias. Serei eternamente grato a tudo que fizeram e fazem por mim. Por isso, dedico a minha dissertação a vocês.

À minha família por me apoiar e ajudar sempre em momentos cruciais da minha vida.

Ao meu grande orientador, amigo, conselheiro, professor **Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias**, por contribuir muito com minha carreira científica, sendo um exemplo de pessoa a ser seguida tanto como profissional quanto no pessoal. Agradeço pela sua grande paciência em entender e compreender as minhas dificuldades, e principalmente por sua capacidade de motivação que me ajudou a enfrentar as dificuldades inerentes da carreira acadêmica e da vida.

À professora **Dra. Marta D'Agosto**, pelas oportunidades, apoio e confiança desde a iniciação científica.

Ao professor **Dr. Inácio Domingos da Silva-Neto**, por sua disposição em sempre me receber muito bem em seu laboratório na UFRJ e seu grande exemplo em dedicação e paixão no estudo dos ciliados.

Ao amigo **Dr. Marcus Senra** por dedicação nos ensinamentos das técnicas moleculares e ajuda na elaboração das árvores, por sua grande ajuda e paciência, sem ele esta dissertação não teria a qualidade na filogenia molecular que será apresentada.

À professora **Dra. Sthefane D'Ávila**, pela contribuição e dedicação na correção da escrita do capítulo dois dessa dissertação durante o exame de qualificação.

À professora **Dra. Isabel Martinele** por apoio, hospedagem e ajuda durante a coleta na sua cidade natal de Santa Rita de Minas e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Professor **Dr. Roberto da Gama Alves** pelo incentivo a docência e por ser um exemplo de profissional com ética e seriedade em seu trabalho.

À todos os professores que contribuíram para minha formação.

À Parceria com **Ana Carolina Lamego, Iara Novelli, Iollanda Ianov e Marcela Miranda** que contribuíram com amostras para o presente estudo. Que esta parceria possa ser mantida para trabalhos futuros.

Aos alunos do Laboratório do professor Dr. Inácio Domingos da Silva-Neto, **Pedro Henrique Campello Nunes e Marcelo Sales** por sempre me receberem bem e por terem ajudado com os seus ensinamentos na técnica do Protargol Wilbert (1975) e nos procedimentos da microscopia eletrônica de Varredura.

À amiga, **Bianca Sartini** um agradecimento muito especial. Pois comecei a observar, raspar, triar e identificar os meus primeiros peritríqueos com ela. Sem você não teria condições de chegar onde cheguei. Obrigado por estar ao meu lado sempre, ensinando e escutando todo este tempo. Você foi e será uma grande professora.

À amiga e companheira de todas as horas **Franciane Cedrola** por estar sempre disposta a ajudar em todos os momentos, pelos seus conselhos e por me entender nos momentos mais difíceis. Obrigado por esses quatro anos de Laboratório de Protozoologia e seis anos de convivência na Academia.

À doutoranda, amiga e companheira de turma do mestrado, **Luisa Oliveira**, por sua ajuda diária no Laboratório de Protozoologia, ajudando sempre a manter a organização e as compras fundamentais para a execução dos projetos no Laboratório.

Aos antigos amigos do Laboratório de protozoologia da UFJF pelo grande aprendizado e ajuda diária: **Alyssa Rossi, Diego Marques e Mariana Rossi**.

Aos amigos e companheiros de trabalho do laboratório de Protozoologia: **Amanda Macedo, Elen Furtado, Felipe dos Santos, Lucas Rieger, Priscila Fregulia, Rafaela Venançoni, Raquel Tostes e Talys Henrique Assumpção** pela convivência diária e momentos de descontração.

À amiga **Rosângela**, por ser exemplo de pessoa amiga e caridosa que está sempre disposta ajudar.

Aos prestativos membros da secretaria, **Marlu, Rita e Osmar** sempre dispostos a ajudar e a tirar dúvidas mais burocráticas.

À **FAPEMIG** pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Nada em biologia faz sentido,  
exceto pela luz da evolução.”*

*Theodosius Dobzhansky*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Proposta de classificação dos eucariotos elaborada por ADL et al. (2012), com base em dados moleculares e incluindo táxons recentemente descobertos.....23
- Figura 1.1.** Árvore filogenética de Verossimilhança Máxima (ML) inferida a partir de sequências do gene 18S-rDNA, contendo 1525 pares de base usando o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+G+I, com configuração mais estrigente.....57
- Figura 1.2.** árvore filogenética de representantes das classes Nassophorea, Phyllopharyngea e Oligohymenophorea (barras cinzas) com base em sequências do gene 18S-rDNA.....95
- Figura 2.** Esquema do ciclo de vida de *Epistylis pygmaeum* (Peritrichia, Epistylididae) conforme GILBERT & SCHRÜDER (2003).....25
- Figura 2.2.** *Rhabdostyla inclinans* fotomicrografias do organismo *in vivo* e desenhos esquemáticos.....96
- Figura 3.** Desenhos esquemáticos de representantes das famílias que compõem a ordem Sessilida (Ciliophora, Peritrichia).....26
- Figura 4.** Diferença entre um representante da família Epistylididae em relação a um membro da família Operculariidae.....27

<b>Figura 5.</b> Características diagnósticas de peritríqueos dos gêneros <i>Zoothamnium</i> (Zoothamniidae) e <i>Carchesium</i> (Vorticellidae).....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema de trofontes de três famílias de “peritríqueos sessilídeos”.....	29
<b>Figura 7.</b> Hipótese filogenética sobre relação entre as subclasses da classe Oligohymenophorea, destacando relação entre as ordens da subclasse Peritrihia: Sessilida e Mobilida.....	30
<b>Figura 8.</b> Árvore filogenética apresentando relações evolutivas entre ciliados peritríqueos com base nas sequências de 18S-rDNA, com nova proposta de duas ordens para subclasse Peritrichia: Vorticellida e Operculariida.....	31
<b>Figura 9.</b> Árvore filogenética inferida a partir de sequências de 18S-rDNA.....	32
<b>Figura 10.</b> Desenho das principais características necessárias a descrição contemporânea de espécies de protozoários ciliados peritríqueos.....	33
<b>Prancha 1.1</b> Protozoários ciliados Peritríqueos encontrados em diversos ambientes de água doce em Minas Gerais e com sequências do gene 18S-rDNA.....	59
<b>Prancha 1.2</b> <i>Rhabdostyla inclinans</i> epibionte de <i>Aeolosoma hemprichi</i> encontrado em bromélias no Brasil.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação do Phylum Ciliophora.....	24
<b>Tabela 1.1.</b> Espécies de peritríqueos (Ciliophora, Peritrichia) encontrados em diversos ambientes do estado de Minas Gerais com informações sobre ambiente, hospedeiro e localidade (coordenadas geográficas).....	42
<b>Tabela 1.2.</b> Caracterização morfométrica de <i>Rhabdostyla inclinans</i> (Müller, 1773) Roux, 1901 epibionte de <i>Aeolosoma hemprichi</i> Ehrenberg, 1831.....	83
<b>Tabela 2.2.</b> Comparação entre as populações de <i>Rhabdostyla inclinans</i> encontradas em bromélias do Brasil e as revisadas por FOISSNER et al. (1992).....	99

## SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	18
1. Caracterização geral da subclasse Peritrichia (Alveolata, Ciliophora) .....	18
2. Sistemática da Subclasse Peritrichia: classificação tradicional e filogenia molecular.....	19
3. Caracterização multidisciplinar de ciliados.....	21
4. Escopo da pesquisa.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
SEÇÃO 1 - ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE PERTRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) BASEADO EM SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS EPISTYLIDIDAE E OPERCULARIIDAE	
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Coleta e processamento inicial das amostras.....	41
Investigação morfológica e identificação das espécies.....	43
Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.....	43
Análises filogenéticas.....	44
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	47

1. Peritrichia: grupo natural?.....	47
2. Peritrichia: Operculariida + Vorticellida?.....	48
3. Operculariida.....	48
4. Vorticellida Utz et al., 2010.....	49
5. 4.1. <i>Vaginicola crystalina</i> : lórica e evolução em Peritrichia.....	49
6. 4.2. Zoothamniidae: grupo natural?.....	50
7. 4.3. Epistylididae: um clado ou um grado?.....	51
8. 4.4. “Vorticelídeos”: Vorticellidae + Astylozoidae + Ophrydiidae + Opisthonectidae.....	53
9. Considerações finais.....	55
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 60
 ANEXO 1.1.....	 66
ANEXO 1.2.....	69
ANEXO 1.3.....	72
ANEXO 1.4.....	74
 SEÇÃO 2 - <i>Rhabdostyla inclinans</i> (CILIOPHORA, PERITRICHIA) EPIBIONTE DE <i>Aeolosoma hemprichi</i> (OLIGOCHAETA, AEOLOSOMATIDAE) EM BROMÉLIAS NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR E POSIÇÃO FILOGENÉTICA SURPREENDENTE.	
 RESUMO.....	 75
INTRODUÇÃO.....	76
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
Coleta e processamento das amostras.....	77
Caracterização morfológica.....	78
Parâmetros ecológicos.....	78
Caracterização molecular: extração de DNA, PCR e análises filogenéticas.....	79

RESULTADOS.....	81
Morfologia.....	81
Parâmetros ecológicos.....	82
Caracterização molecular e Posição filogenética.....	83
DISCUSSÃO.....	84
Morfologia.....	84
Parâmetros ecológicos.....	85
Filogenia Molecular.....	88
1. <i>Rhabdostyla inclinans</i> é um vorticelídeo com características morfológicas de epistilídeo? .....	88
2. <i>Rhabdostyla</i> e <i>Epistylis</i> representam um exemplo de convergência evolutiva?.....	90
3. A relação filogenética entre os “rabdostilídeos”.....	91
4. Importância da caracterização multidisciplinar de ciliados Peritrichia.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO 2.1.....	109
ANEXO 2.2.....	112
ANEXO 2.3.....	115
ANEXO 2.4.....	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120

## RESUMO

O presente trabalho amplia o conhecimento acerca da filogenia de microeucariotos ciliados (Alveolata, Ciliophora) da subclasse Peritrichia Stein, 1859 baseada em análises de sequências de 18S-rDNA e compara sistemática tradicional do grupo com a filogenia baseada em dados moleculares. A proposta apresenta ainda a caracterização multidisciplinar de uma espécie de ciliado peritríqueo epistilídeo com dados morfológicos, ecológicos e moleculares. A dissertação está dividida em dois capítulos (seções). No capítulo 1 foi realizado um estudo filogenético de representantes da subclasse Peritrichia, com inclusão de 12 novas sequências de 18S-rDNA (11 espécies e quatro gêneros - *Epistylis*, *Opercularia*, *Orborhabdostyla*, *Rhabdostyla*) obtidas de organismos coletados em ecossistemas na região Sudeste do Brasil, mais precisamente no estado de Minas Gerais. Neste capítulo foi discutida a validade de algumas famílias da subclasse Peritrichia e investigado se as principais características morfológicas usadas para definir a sistemática do grupo refletem genuína divergência evolutiva. As principais contribuições deste estudo foram: <sup>1</sup>a subclasse Peritrichia está dividida em dois grandes clados; <sup>2</sup>a família Operculariidae parece ser um grupo natural; <sup>3</sup>a família Epistylididae é um grado e não um clado natural e, portanto, necessita de importante revisão sistemática, havendo representantes desta família se agrupando em distintos ramos da subclasse Peritrichia, <sup>4</sup>os epistilídeos *Rhabdostyla* e *Orborhabdostyla* não se agruparam em mesmo clado tal como estabelecido na sistemática atual, baseado em similaridades morfológicas, <sup>5</sup>a família Zoothamniidae é parafilética, e <sup>6</sup>os “vorticelídeos” não constituem um agrupamento natural, necessitando de importante revisão das principais características morfológicas usadas atualmente como sinapomorfias morfológicas. No capítulo 2 (seção 2) foi realizada caracterização multidisciplinar de uma população de *Rhabdostyla inclinans* epibionte de anelídeos Aeolosomatidae coletada em tanques de bromélia. Neste estudo foi discutida pela primeira vez a posição filogenética de um representante do gênero *Rhabdostyla* dentro da subclasse Peritrichia e apresentado dados detalhados da morfologia desta população, bem como informações ecológicas sobre a relação epibiótica. As duas sequências de 18S-rDNA de *R. inclinans* obtidas se agruparam entre representantes da família Vorticellidae, o que refuta a classificação tradicional deste gênero como um epistilídeo (Epistylididae) baseada em caracteres morfológicos. Os resultados moleculares ressaltam necessidade de se ampliar número de sequências de espécies do gênero *Rhabdostyla* nos bancos de dados genéticos para melhor entendimento da filogenia de peritríqueos epistilídeos,

bem como instiga revisão e busca de novos caracteres morfológicos a serem usados como sinapomofias dos clados que compõem a subclasse Peritrichia.

**Palavras-chave:** *Epistylis*, filogenia molecular, *Opercularia*, Operculariidae, *Orborhabdostyla*, sistemática.



## ABSTRACT

This work extends the knowledge of the phylogeny of ciliated micro-eukaryote (Alveolata, Ciliophora) of Peritrichia Stein, 1859 subclass based on analysis of 18S-rDNA sequences and compares traditional systematics of the group to the phylogeny based on molecular data. The proposal also presents a multidisciplinary characterization of *Rhabdostyla inclinans* (Peritrichia, Epistylididae) with morphological, ecological and molecular data. The dissertation is divided into two chapters (sections). In Chapter one (section 1) a phylogenetic study of representatives of Peritrichia subclass was performed with inclusion of 12 new sequences of 18S-rDNA (11 species and four genera - *Epistylis*, *Opercularia*, *Orborhabdostyla*, *Rhabdostyla*) obtained from organisms collected in ecosystems in the Southeast region Brazil, more precisely in the state of Minas Gerais. In this chapter was discussed the validity of some families of peritrichs and investigated whether the main morphological characteristics used to define the systematics of the group reflect genuine evolutionary divergence. The main contributions of this study were: <sup>1</sup>Peritrichia subclass is divided in two major clades; <sup>2</sup>Operculariidae family seems to be a natural group; <sup>3</sup>There are representatives of the Epistylididae family grouping in different branches of the subclass Peritrichia. This fact suggests that Epistylididae family is a grade and not a natural clade and therefore requires systematic review. ; <sup>4</sup>The *Rhabdostyla* and *Orborhabdostyla* epistylids did not grouped in the same clade as set out in the current system based on morphological similarities; <sup>5</sup>Zoothamniidae family is paraphyletic; <sup>6</sup>vorticelids did not formed a natural group requiring major review of the main morphological features currently used as morphological synapomorphies. In chapter two (section 2) was performed a multidisciplinary characterization of epibionts population of *Rhabdostyla inclinans* on Aeolosomatidae collected in bromeliad tanks in Brazil. This study discusses for the first time phylogenetic placement of the *Rhabdostyla* genus within peritrich subclass and presents detailed morphology data for this population. Data about information of Epibiotic relationship are presented too. The two 18S-rDNA sequences of *Rhabdostyla inclinans* obtained clustered with representatives of Vorticellidae family, which refutes the traditional classification of this genus as a epistylid (Epistylididae) based on morphological characters. The molecular results highlight the need to expand the number of sequences of *Rhabdostyla* genus in genetic databases to better understand the phylogeny of epistylids peritrichs and instigate review and

search for new morphological characters to be used as synapomorphy of clades that constitute Peritrichia subclass.

**Keywords:** *Epistylis*, molecular phylogeny, *Opercularia*, Operculariidae, *Orborhabdostyla* systematics.

## INTRODUÇÃO

### 1. Caracterização geral da subclasse Peritrichia (Alveolata, Ciliophora)

Os microeucariotos ciliados (Ciliophora) estão inseridos atualmente em um clado conhecido como SAR (Stramenopiles (Patterson, 1989) ADL et al. 2005, Alveolata Cavalier-Smith, 1981, Rhizaria Cavalier-Smith, 2002) em classificação baseada em múltiplos marcadores moleculares (**Figura 1; p. 23**), sendo os Alveolata constituídos pelos clados Apicomplexa Levine, 1980, Dinoflagellata Bütschli, 1885 e Ciliophora Doflein, 1901 (ADL et al., 2012). A monofilia do filo Ciliophora é suportada tanto por dados moleculares (múltiplos marcadores) como por sinapomorfias morfológicas (aparato nuclear, conjugação e infraciliatura) e está dividido em dois subfilos e 11 classes (**Tabela 1; p. 24**). A classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974 possui seis subclasses, dentre elas a subclasse Peritrichia (*sensu* LYNN, 2008), contendo mais de 1000 espécies descritas. Os peritríqueos estão divididos em duas ordens: Sessilida Kahl, 1933 e Mobilida Kahl, 1933 (LYNN, 2008).

Os sessilídeos (Ordem Sessilida) são um grupo de peritríqueos caracterizados pela presença de um ciclo de vida polimórfico, com grande parte dos táxons apresentando uma fase sésil no ciclo de vida. As duas fases do ciclo são o trofonte (geralmente sésil) e o telotróquio (livre natante) (**Figura 2, a-b: trofonte, d: telotróquio; p. 25**). Estes ciliados são comumente encontrados em ecossistemas marinhos e de água doce, sendo raros em ecossistemas edáficos (FOISSNER et al., 1999). Os trofontes são responsáveis pela nutrição do organismo usando desenvolvida ciliatura adoral para filtrar partículas em suspensão, bactérias e outros microeucariotos (CORLISS, 1979; LYNN, 2008). O trofonte possui um zoóide (organismo responsável pelas funções fisiológicas) e um pedúnculo proteico (haste que prende o zoóide ao substrato). O telotróquio é o “zoóide” livre-natante responsável pela dispersão e reprodução sexuada em ciliados peritríqueos, sendo diferenciado morfológicamente do trofonte por apresentar uma ciliatura somática desenvolvida na região aboral (banda telotrocal), o que permite sua natação em busca de substrato ideal para fixação (GILBERT & SCHRÖDER, 2003). O telotróquio possui reduzida ciliatura oral (pequenos “bastões”) (WILLIAMS & CLAMP, 2007), sendo incapaz de se alimentar, tendo como função primordial dispersão e reprodução. A complexidade fisiológica, plasticidade ecológica e predileção por ambientes enriquecidos organicamente torna este grupo de ciliados bons indicadores da qualidade da água de ecossistemas aquáticos continentais (MADONI, 2005).

Os sessilídeos podem ser encontrados aderidos a substratos inanimados e vivos, havendo ampla gama de estudos sobre a relação epibiótica entre sessilídeos e invertebrados e vertebrados aquáticos (CORLISS, 1979; DIAS et al., 2008, 2009; FERNANDEZ-LEBORANZ & TATO-PORTO, 2000; FOISSNER et al., 1992; KAHL, 1935; SMITH, 1986). Segundo COOK et al. (1998) a epibiose pode ter natureza oportunista, facultativa e não especializada, com os epibiontes colonizando substratos inertes, animais e plantas ou associações obrigatórias e altamente específicas, havendo adaptações morfológicas e comportamentais entre epibionte e basibionte (hospedeiro) que proporcionam este modo de vida (WAHL, 1989).

Os mobilídeos (Ordem Mobilida) são um grupo de peritríqueos móveis e simbioses com corpo discóide, apresentando região aboral côncava e adoral convexa, possuindo um complexo disco adesivo de constituição proteica no polo aboral responsável pela adesão temporária ao substrato. O disco adesivo é a principal característica morfológica dos mobilídeos, sendo uma sinapomorfia para o grupo (ZHAN et al., 2009). Os mobilídeos podem ser encontrados vivendo como comensais ou parasitos em diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados, alimentando-se das bactérias e detritos presentes na epiderme destes hospedeiros. Em casos de grande infestação e em hospedeiros debilitados estes organismos podem agravar o estado de saúde dos seus hospedeiros os levando a morte (LOM, 1995).

## **2. Sistemática da Subclasse Peritrichia: classificação tradicional e filogenia molecular**

A classificação estabelecida para os peritríqueos sessilídeos propõe divisão deste grupo em 14 famílias (**Figura 3; p. 26**). A família Epistylididae Kahl, 1933 apresenta como principal característica morfológica zoóide com aparato oral “epistiliforme” (colar peristomial proeminente e disco peristomial largo) e pedúnculo rígido sem espasmonema e aqueles da família Operculariidae Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1979 com pedúnculo semelhante aos epistilídeos apresentam região oral “operculariforme” (colar peristomial não-eversível e disco peristomial com pedúnculo alongado) (**Figura 4; p. 27**). Os representantes das famílias Vorticellidae Ehrenberg, 1838 e Zoothamniidae Sommer, 1951 possuem espasmonema no pedúnculo, havendo diferença apenas no modo de contração desta fibrila (LYNN, 2008). Em Vorticellidae o modo de contração do espasmonema é espiral, enquanto que em Zoothamniidae o modo de contração é em zigue-zague (**Figura 5; p. 28**). A família Vaginicolidae de Fromentel, 1874 (**Figura 3; p. 26, 12**) é representada por organismos que

possuem uma lórica que está presa ao substrato obliquamente e não possui um pedúnculo em sua base (KAHL, 1935). As famílias Astylozoidae Kahl, 1935 e Opisthonectidae Foissner, 1976 são formadas por organismos que não possuem um trofote típico (**Figura 6; p. 29**), sendo a primeira composta por organismos semelhantes ao trofote e com pedúnculo não desenvolvido, enquanto na segunda família encontramos organismos similares a telotróquios com desenvolvida ciliatura da banda telotrocal (WILLIAMS & CLAMP, 2007). A família Ophrydiidae Ehrenberg, 1838 (**Figura 3; p. 26, 6**) possui pedúnculo sem mionema, vacúolo contrátil com um longo canal coletor e matriz extracelular gelatinosa unindo os zoóides da colônia (LYNN, 2008). Nesta introdução apresentamos apenas detalhes morfológicos das famílias que serão abordadas no capítulo 1 desta dissertação.

A primeira sequência de 18S-rDNA para um ciliado peritríqueo foi obtida por LYNN & SOGIN (1988) para *Opisthonecta henneguyi* Fauré-Fremiet, 1906 (Peritrichia, Opisthonectidae). Entretanto, o primeiro estudo interessado na filogenia interna de Peritrichia foi realizado por MIAO et al. (2001) ao acrescentar seis novas sequências de 18S-rDNA de peritríqueos dos gêneros *Epistylis* Ehrenberg, 1830 e *Vorticella* Linnaeus, 1767. Em estudo mais aprofundado, utilizando sequências de 18S-rDNA de representantes de oito famílias da subclasse Peritrichia, MIAO et al. (2004) detectaram contrastes entre a sistemática tradicional da subclasse e a hipótese filogenética apresentada nesta proposta com base em dados moleculares. Um exemplo evidente foi o agrupamento do epistilídeo *Epistylis galea* Ehrenberg, 1831 entre os opercularídeos, algo que diverge em muito da proposta de classificação do grupo. Este estudo despertou atenção para necessidade de se ampliar número de sequências de 18S-rDNA para ciliados peritríqueos a fim de melhor esclarecer a filogenia interna neste clado. Estudos posteriores sobre filogenia de Peritrichia, utilizando sequências de 18S-rDNA, contestaram a monofilia das seguintes famílias: Astylozoidae (SUN et al., 2011, 2012 a; WILLIAMS & CLAMP, 2007), Epistylididae (UTZ et al., 2010), Ophrydiidae (UTZ et al., 2010; WILLIAMS & CLAMP, 2007), Vorticellidae (SUN et al., 2011, 2012 a; UTZ et al., 2010, WILLIAMS & CLAMP, 2007) e Zoothamniidae (CLAMP & WILLIAMS, 2006; LI et al., 2014).

Com ampliação de sequências de 18S-rDNA de ciliados mobilídeos GONG et al. (2006) investigaram a monofilia de Peritrichia contendo as ordens Sessilida e Mobilida, corroborando formato espiral da ciliatura oral como sinapomorfia do grupo, entretanto, os dados moleculares não suportaram esta hipótese, que posteriormente foi rejeitada por ZHAN et al. (2009), que sugeririam que esta similaridade morfológica se tratava de convergência

evolutiva visto mesmo hábito de vida sésil de sessilídeos e mobilídeos. Estes autores propuseram a criação da nova subclasse *Mobilia* Kahl, 1933 para incluir os antigos mobilídeos (ordem *Mobilida*) independente da subclasse *Peritrichia* (**Figura 7; p. 30**).

Em investigação da filogenia interna da subclasse *Peritrichia* (*sensu* ZHAN et al., 2009) com inclusão de novas sequências de 18S-rDNA de epistilídeos e opercularídeos UTZ et al. (2010) propuseram divisão de peritríqueos em dois clados, as ordens: *Operculariida* Jankowski, 1980 e *Vorticellida* de Fromentel, 1875 (**Figura 8; p. 31**). Contudo, não foram propostas diagnoses, incluindo caracteres morfológicos exclusivos, para estas duas novas ordens, não havendo, até o momento, sinapomorfias para reconhecer estes táxons. Em estudo recente sobre validade do gênero *Vorticella*, SUN et al. (2012) demonstraram, com base em sequências de 18S-rDNA, que este gênero é um grado e não um clado (**Figura 9; p. 32**). Os autores demonstraram ainda que alguns representantes do gênero *Vorticella*, se agrupam em clado contendo representantes das famílias *Astylozoidae* e *Opisthonectidae*.

### 3. Caracterização multidisciplinar de ciliados

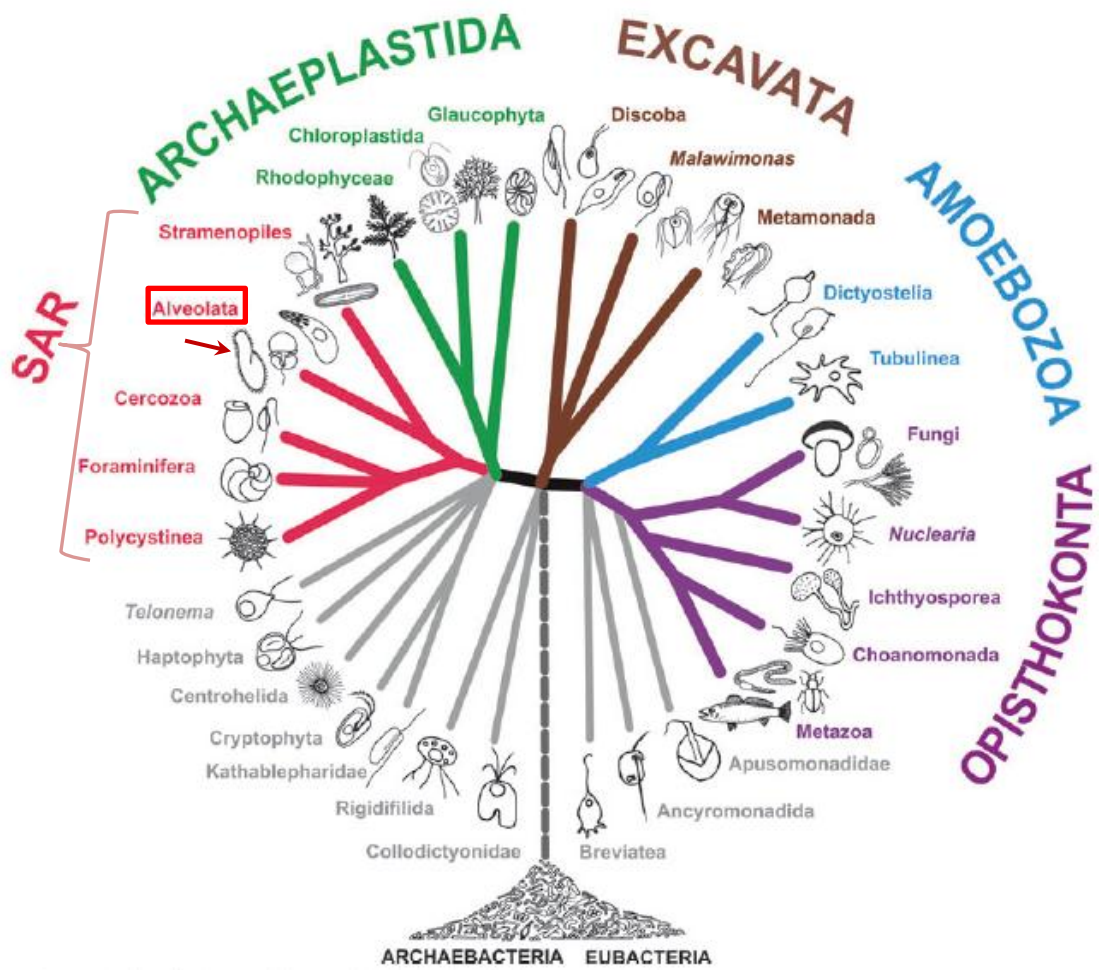
O entendimento sobre a sistemática e/ou parentesco evolutivo entre os microeucariotos ciliados, assim como de outros grupos de organismos, dependeram e dependem dos avanços tecnológicos da época (LYNN, 2008). Podemos dividir o conhecimento sobre sistemática de *Ciliophora* em cinco “Eras”, conforme recursos disponíveis na época. A Era da descoberta (1880–1930) foi a primeira, seguida pela Era da exploração (1930–1950). Estas duas Eras foram baseadas em observações dos organismos com microscopia de luz e elaboração de desenhos esquemáticos detalhados, tendo como base conceitual que a evolução partia de formas mais simples para mais complexas. A Era da infraciliatura (1950–1970) foi baseada no uso de técnicas de impregnação pela prata que revela estruturas do córtex destes microorganismos, havendo importante progresso na descoberta de novas estruturas usadas na taxonomia e sistemática do grupo (**Figura 10; p. 33**). Na Era da ultraestrutura (1970–1990) detalhes minuciosos da infraciliatura oral dos ciliados foram desvendados com importantes progressos no entendimento da relação evolutiva das ciliaturas somática e oral entre os diversos grupos de ciliados. A Era atual, após advento da biologia molecular (1990–atual), se destina a entender as relações evolutivas entre os grupos de ciliados (YI & SONG, 2011) bem como melhor elucidar o conceito de espécies e biogeografia para estes organismos (GENTEKAKI & LYNN, 2010).

Estudos atuais tem demonstrado necessidade de se aplicar uma abordagem multidisciplinar na caracterização das espécies de ciliados para melhor elucidar as relações filogenéticas entre diversos grupos deste filo (FOISSNER et al., 2003; MODEO et al., 2006, 2013; ROSATI et al., 2004). MODEO et al. (2003) recomendam que estudos sobre caracterização taxonômica de espécies de ciliados deveriam informar dados sobre morfologia, ecologia e posição filogenética usando ao menos sequência de 18S-rDNA. Estas descrições completas e robustas facilitarão a comparação entre espécies e serão úteis na interpretação da evolução do grupo para pesquisas futuras (MODEO et al., 2003; ROSATI et al., 2004).

Visto que grande parte das mais de 8.000 espécies de ciliados foi descrita apenas com informações *in vivo* destes micro-organismos, é essencial incluir nos novos estudos taxonômicos uma caracterização multidisciplinar da espécie bem como realizar depósito de lâminas e DNA destes organismos em coleções reconhecidas (MODEO et al., 2003). Ao entendermos as Eras da ciliatologia, fica clara necessidade de realização de descrições e redescrições da ciliatofauna usando esta abordagem multidisciplinar.

#### **4. Escopo da pesquisa**

O presente trabalho apresenta estudo filogenético expandido sobre a subclasse Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) e a caracterização multidisciplinar de uma espécie de ciliado deste grupo ressaltando a necessidade destas informações integradas para melhor esclarecimento da taxonomia e sistemática do grupo. A dissertação está dividida em duas seções. No capítulo 1 (seção 1) foram comparados dados da filogenia interna da subclasse Peritrichia, incluindo 12 novas sequências de 18S-rDNA para 11 espécies deste grupo, com a sistemática atual proposta para esta subclasse e interpretada a validade das sinapomorfias morfológicas atuais para definição de algumas famílias e gêneros. No capítulo 2 (seção 2) foram apresentados dados sobre a morfologia, morfometria, ecologia (relação epibiótica) e posição filogenética de *Rhabdostyla inclinans* (Peritrichia, Epistylididae) registrado pela primeira vez na América do Sul em tanques de bromélias infestando anelídeos da família Aeolosomatidae. Os dados obtidos trouxeram importantes avanços para o conhecimento sobre taxonomia e sistemática da subclasse Peritrichia e despertou o interesse para investigações de novos caracteres morfológicas e utilização de diferentes marcadores moleculares com intuito de entender a genuína divergência evolutiva em Peritrichia.



**Figura 1.** Proposta de classificação dos eucariotos elaborada por ADL et al. (2012), com base em dados moleculares e incluindo táxons recentemente descobertos. Os antigos “protistas” ciliados (Filo Ciliophora: indicado na seta) se inserem nesta proposta no táxon SAR (diatomáceas, alveolados e amebóides) dentro de Alveolata.

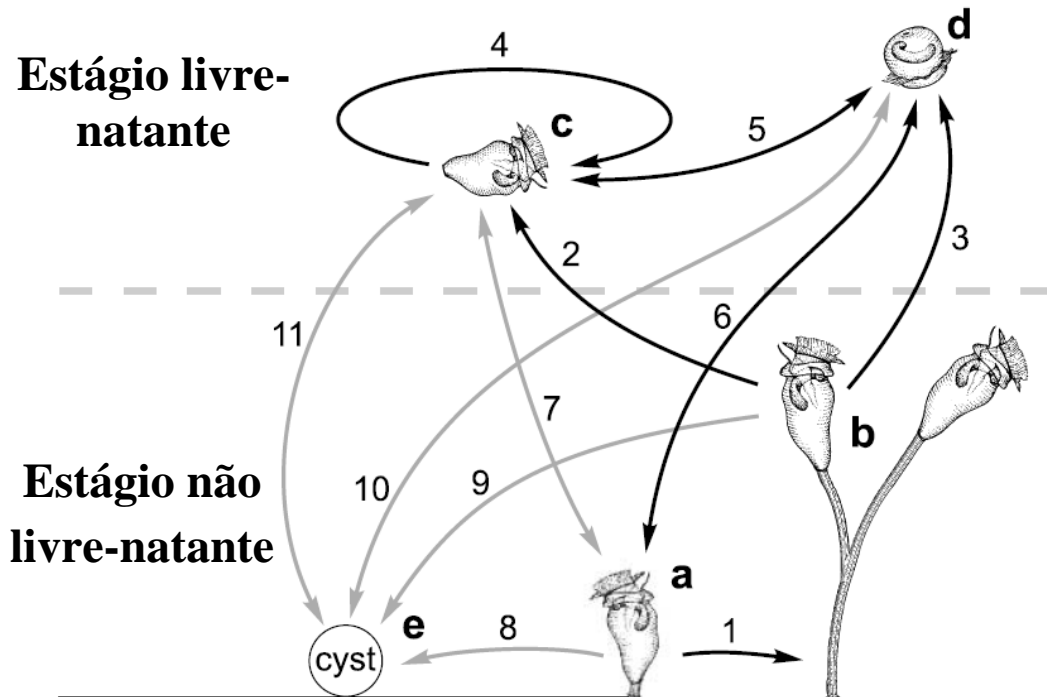


**Tabela 1. Classificação do Phylum Ciliophora (LYNN, 2008)\***

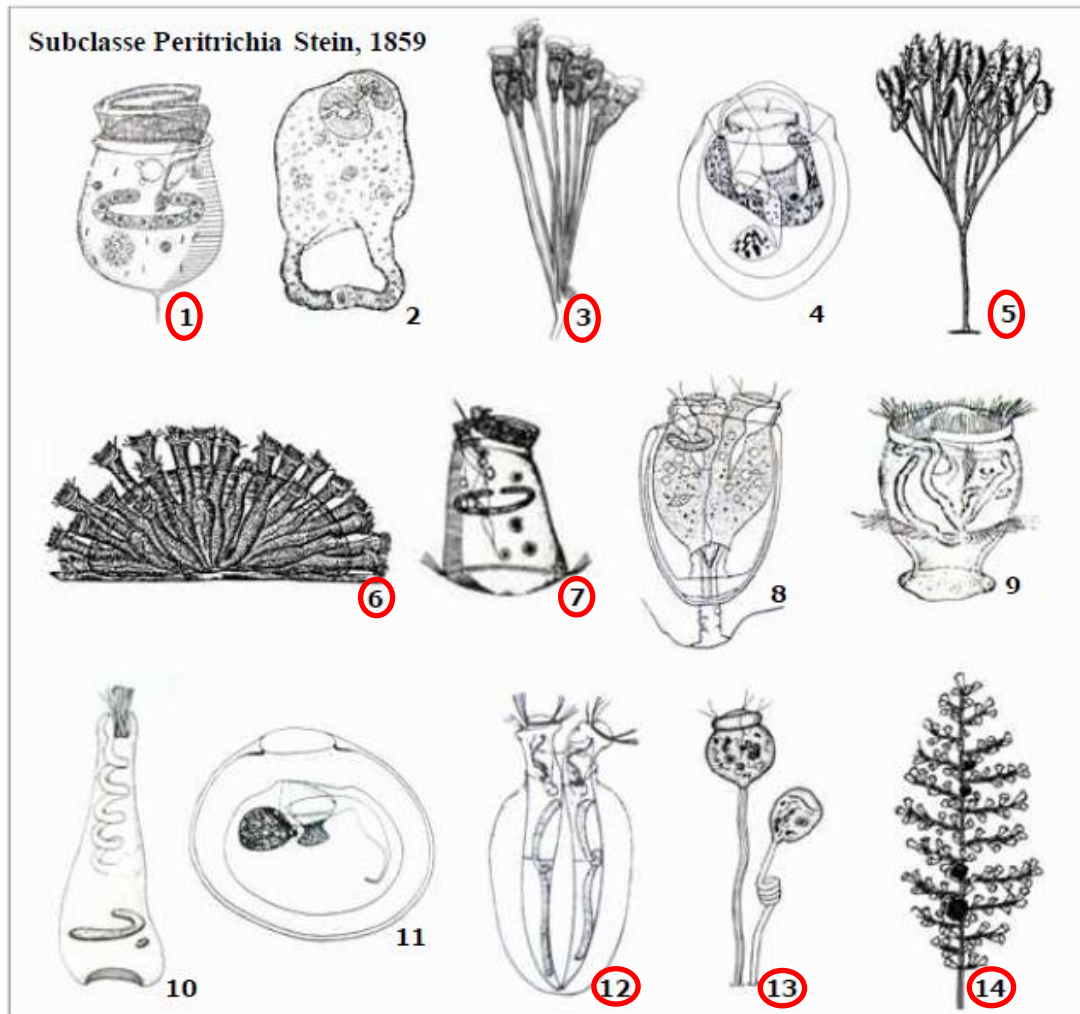
<p>Phylum <b>CILIOPHORA</b> Doflein, 1901</p> <p>Subphylum <b>POSTCILIODESMATOPHORA</b> Gerassimova &amp; Seravin, 1976</p> <p>Class <b>KARYORELICTEA</b> Corliss, 1974</p> <p>Order Protostomatida Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Order Loxodida Jankowski, 1980</p> <p>Order Protoheterotrichida Nouzarède, 1977</p> <p>Class <b>HETEROTRICHEA</b> Stein, 1859</p> <p>Order Heterotrichida Stein, 1859</p> <p>Subphylum <b>INTRAMACRONUCLEATA</b> Lynn, 1996</p> <p>Class <b>SPIROTRICHEA</b> Bütschli, 1889</p> <p>Subclass Protocruziida de Puytorac, Grain, &amp; Mignot, 1987</p> <p>Order Protocruziida Jankowski, 1980</p> <p>Subclass Phacodiniida Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Order Phacodiniida Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Subclass Licnophoria Corliss, 1957</p> <p>Order Licnophorida Corliss, 1957</p> <p>Subclass Hypotrichia Stein, 1859</p> <p>Order Kiitrichida Nozawa, 1941</p> <p>Order Euplotida Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Suborder Discocephalina Wicklow, 1982</p> <p>Suborder Euplotina Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Subclass Choreotrichia Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Order Tintinnida Kofoid &amp; Campbell, 1929</p> <p>Order Choreotrichida Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Suborder Leegaardiellina Laval-Peuto, Grain, &amp; Deroux, 1994</p> <p>Suborder Lohmanniellina Laval-Peuto, Grain, &amp; Deroux, 1994</p> <p>Suborder Strobiliidiina Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Suborder Strombidinopsina Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Subclass Stichotrichia Small &amp; Lynn, 1985</p> <p>Order Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961</p> <p>Order Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961</p> <p>Order Urostylida Jankowski, 1979</p> <p>Subclass Oligotrichia Bütschli, 1887/1889</p> <p>Order Strombidiida Petz &amp; Foissner, 1992</p> <p>Class <b>ARMOPHOREA</b> Lynn, 2004</p> <p>Order Armophorida Jankowski, 1964<sup>a</sup></p> <p>Order Clevelandellida de Puytorac &amp; Grain, 1976</p> <p>Class <b>LITOSTOMATEA</b> Small &amp; Lynn, 1981</p> <p>Subclass Haptoria Corliss, 1974</p> <p>Order Haptorida Corliss, 1974</p> <p>Order Pleurostomatida Schewiakoff, 1896</p> <p>Order Cyclotrichiida Jankowski, 1980 <i>incertae sedis</i></p> <p>Subclass Trichostomatia Bütschli, 1889</p> <p>Order Vestibuliferida de Puytorac et al., 1974</p> <p>Order Entodiniomorphida Reichenow in Doflein &amp; Reichenow, 1929</p> <p>Suborder Archistomatina de Puytorac et al., 1974</p> <p>Suborder Blepharocorythina Wolska, 1971</p> <p>Suborder Entodiniomorphina Reichenow in Doflein &amp; Reichenow, 1929</p> <p>Order Macropodiniida order nov.<sup>a</sup></p> <p>Class <b>PHYLLOPHARYNGEA</b> de Puytorac et al., 1974</p>	<p>Subclass Cyrtophoria Fauré-Fremiet in Corliss, 1956</p> <p>Order Chlamyodontida Deroux, 1976</p> <p>Order Dysteriida Deroux, 1976</p> <p>Subclass Chonotrichia Wallengren, 1895</p> <p>Order Exogemmida Jankowski, 1972</p> <p>Order Cryptogemmida Jankowski, 1975</p> <p>Subclass Rhynchodia Chatton &amp; Lwoff, 1939</p> <p>Order Hypocomatida Deroux, 1976</p> <p>Order Rhynchodida Chatton &amp; Lwoff, 1939</p> <p>Subclass Suctoria Claparède &amp; Lachmann, 1858</p> <p>Order Exogenida Collin, 1912</p> <p>Order Endogenida Collin, 1912</p> <p>Order Evaginogenida Jankowski, 1978</p> <p>Class <b>NASSOPHOREA</b> Small &amp; Lynn, 1981</p> <p>Order Synhymeniida de Puytorac et al., 1974</p> <p>Order Nassulida Jankowski, 1967</p> <p>Order Microthoracida Jankowski, 1967</p> <p>Order Colpodidiida Foissner, Agatha &amp; Berger, 2002</p> <p><i>incertae sedis</i></p> <p>Class <b>COLPODEA</b> Small &amp; Lynn, 1981</p> <p>Order Bryometopida Foissner, 1985</p> <p>Order Bryophryida de Puytorac, Perez-Paniagua, &amp; Perez-Silva, 1979</p> <p>Order Bursariomorphida Fernández-Galiano, 1978</p> <p>Order Colpodida de Puytorac et al., 1974</p> <p>Order Cyrtolophosidida Foissner, 1978</p> <p>Order Sorogenida Foissner, 1985</p> <p>Class <b>PROSTOMATEA</b> Schewiakoff, 1896</p> <p>Order Prostomatida Schewiakoff, 1896</p> <p>Order Prorodontida Corliss, 1974</p> <p>Class <b>PLAGIOPYLEA</b> Small &amp; Lynn, 1985<sup>a</sup></p> <p>Order Plagiopylida Jankowski, 1978</p> <p>Order Odontostomatida Sawawa, 1940 <i>incertae sedis</i></p> <p>Class <b>OLIGOHYMENOPHOREA</b> de Puytorac et al., 1974</p> <p>Subclass Peniculia Fauré-Fremiet in Corliss, 1956</p> <p>Order Peniculida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956</p> <p>Order Urocentrida Jankowski, 1980</p> <p>Subclass Scuticociliatia Small, 1967</p> <p>Order Philasterida Small, 1967</p> <p>Order Pleuronematida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956</p> <p>Order Thigmatrichida Chatton &amp; Lwoff, 1922</p> <p>Subclass Hymenostomatia Delage &amp; Hérourard, 1896</p> <p>Order Tetrahymenida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956</p> <p>Order Ophryoglenida Canella, 1964</p> <p>Subclass Apostomatia Chatton &amp; Lwoff, 1928</p> <p>Order Apostomatida Chatton &amp; Lwoff, 1928</p> <p>Order Astomatophorida Jankowski, 1966</p> <p>Order Pilisuctorida Jankowski, 1966</p> <p>Subclass Peritrichia Stein, 1859</p> <p>Order Sessilida Kahl, 1933</p> <p>Order Mobilida Kahl, 1933</p> <p>Subclass Astomatia Schewiakoff, 1896</p> <p>Order Astomatida Schewiakoff, 1896</p>
---	---

<sup>a</sup> táxon estabelecido com base em dados moleculares, mas sem sinapomorfias morfológicas

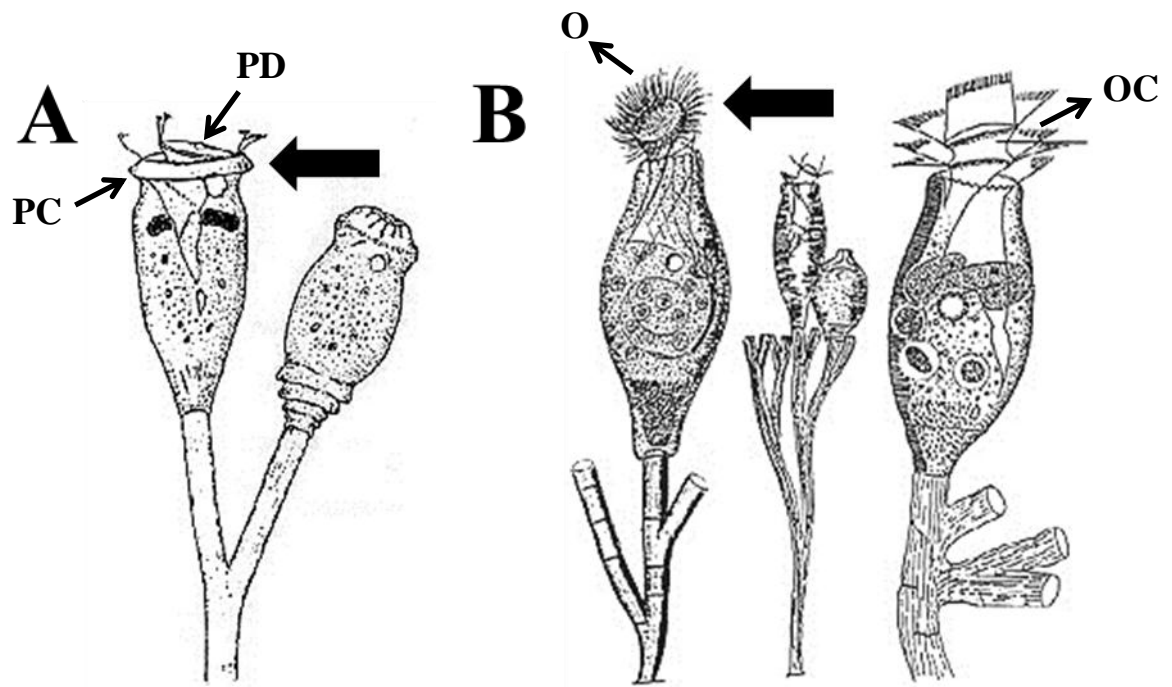
**Tabela 1. Classificação do Phylum Ciliophora. Fonte: LYNN (2008). Marcados com quadrado: Phylum Ciliophora, Classe Oligohymenophorea e Subclasse Peritrichia com suas respectivas ordens.**



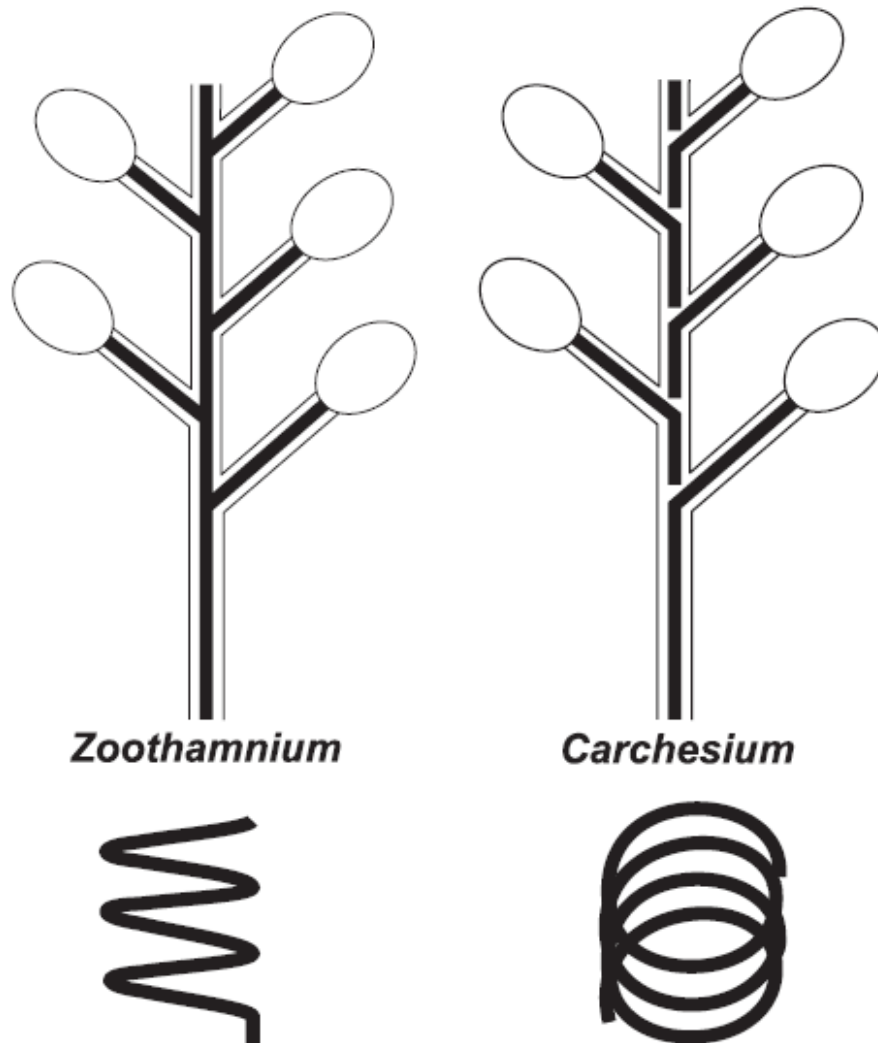
**Figura 2.** Esquema do ciclo de vida de *Epistylis pygmaeum* (Peritrichia, Epistylididae). Estágios do ciclo de vida: (a) zoóide recém-fixado (CORLISS, 1979), (b) colônia com dois zoóides, (c) zoóide livre-natante, (d) telotróquio (CORLISS, 1979) e (e) cisto. Setas pretas indicam caminhos bem estudados para peritríqueos e as setas em cinza indicam possíveis caminhos que necessitam de mais estudos a fim de maior esclarecimento. **Fonte:** Modificado de GILBERT & SCHRÜDER (2003).



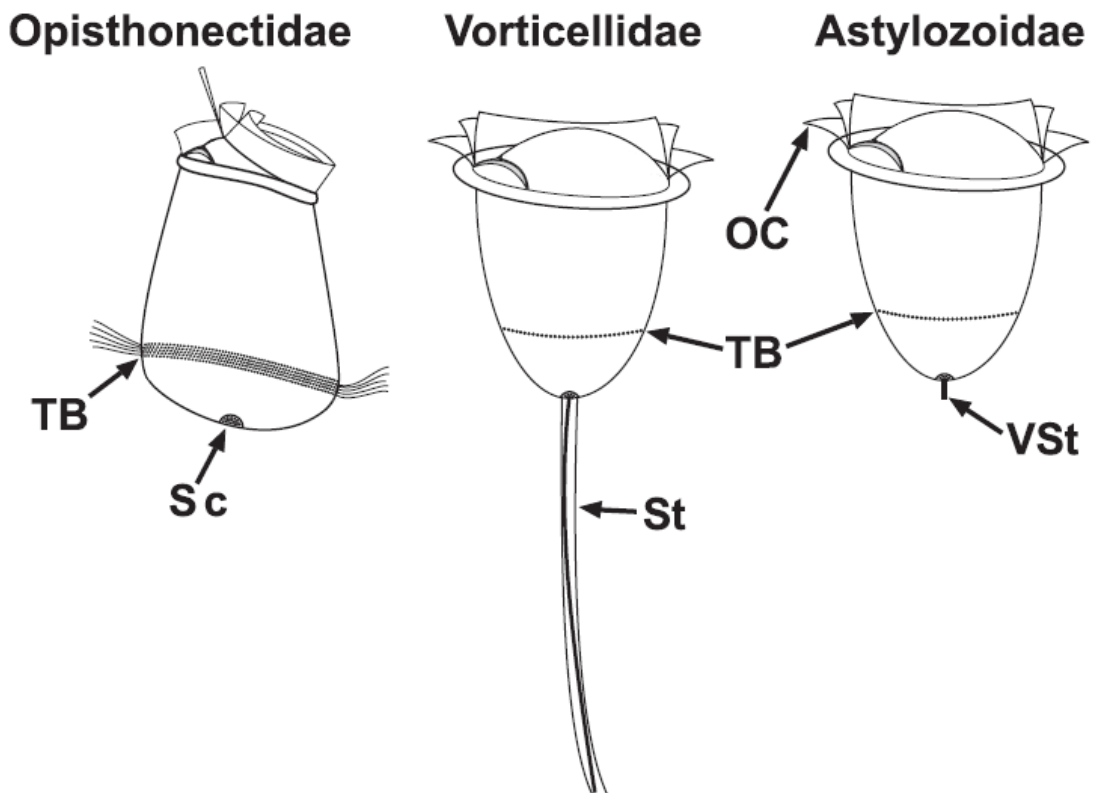
**Figura 3.** Desenhos esquemáticos de representantes das famílias que compõem a ordem Sessilida (Ciliophora, Peritrichia). Os círculos em volta dos números indicam as famílias que já possuem ao menos um representante com 18S-rDNA sequenciado. Legenda: 1. Astylozoidae; 2. Ellobiophryidae; 3. Epistylididae; 4. Lagenophryidae; 5. Operculariidae; 6. Ophrydiidae; 7. Opisthnectidae; 8. Rovinjellidae; 9. Scyphidiidae; 10. Termitophryidae; 11. Usconophryidae; 12. Vaginicolidae; 13. Vorticellidae; 14. Zoothamniidae.  
**Fonte:** Modificado de LYNN & SMALL (2002).



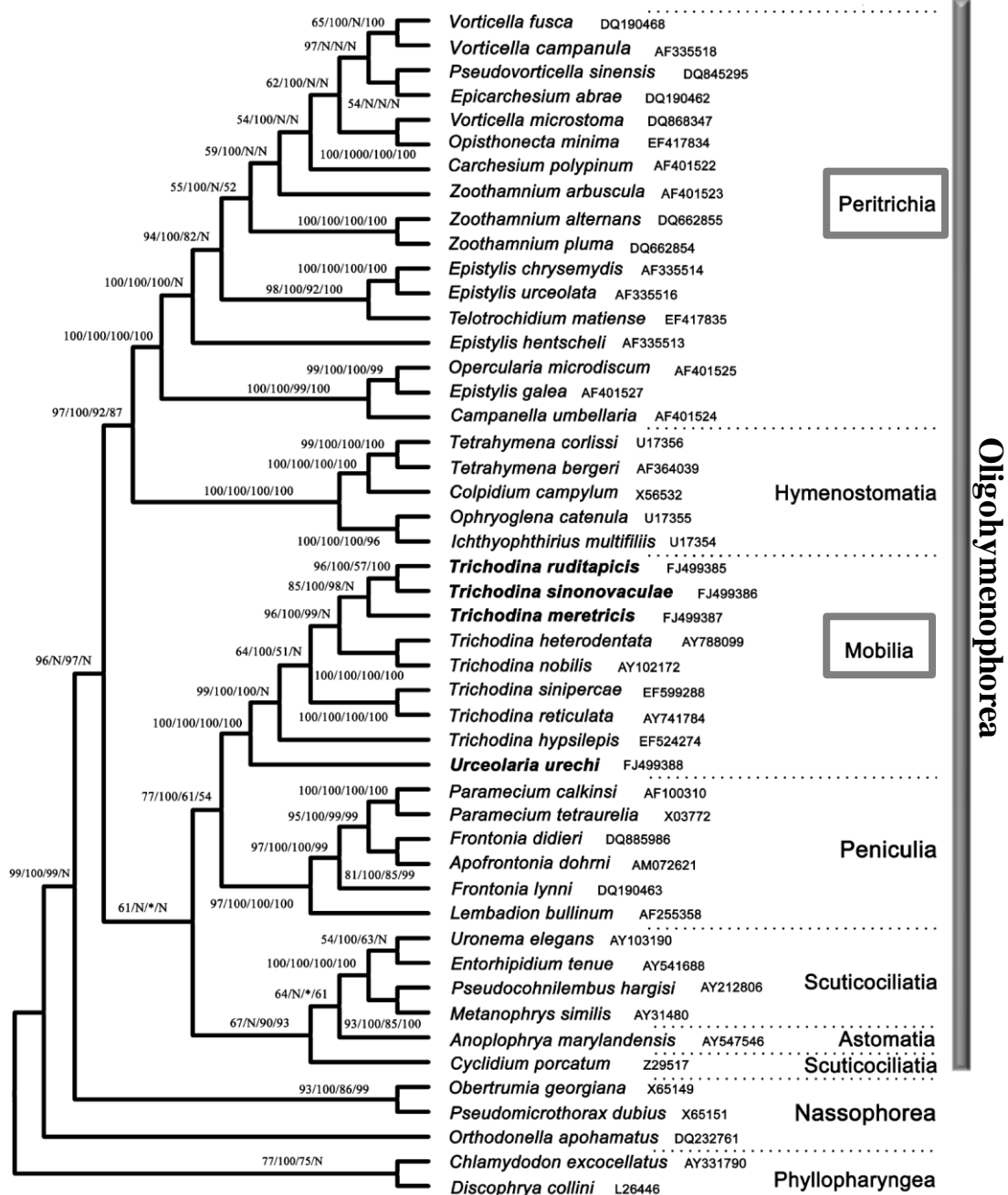
**Figura 4.** Diferença entre um representante da família Epistylididae em relação a um membro da família Operculariidae. As setas largas indicam a diferença entre as áreas peristomiais. **A-** Estrutura oral “epistiliforme” constituído por colar peristomial evertido e disco peristomial curto e largo. **B-** Estrutura oral “operculariforme” constituído por um disco peristomial largo e pedunculado formando um Opérculo, colar peristomial não evertido. Legenda: **PC** = colar peristomial; **PD** = disco peristomial; **O** = opérculo; **OC** = ciliatura oral. **Fonte:** FOISSNER et al. (1992).



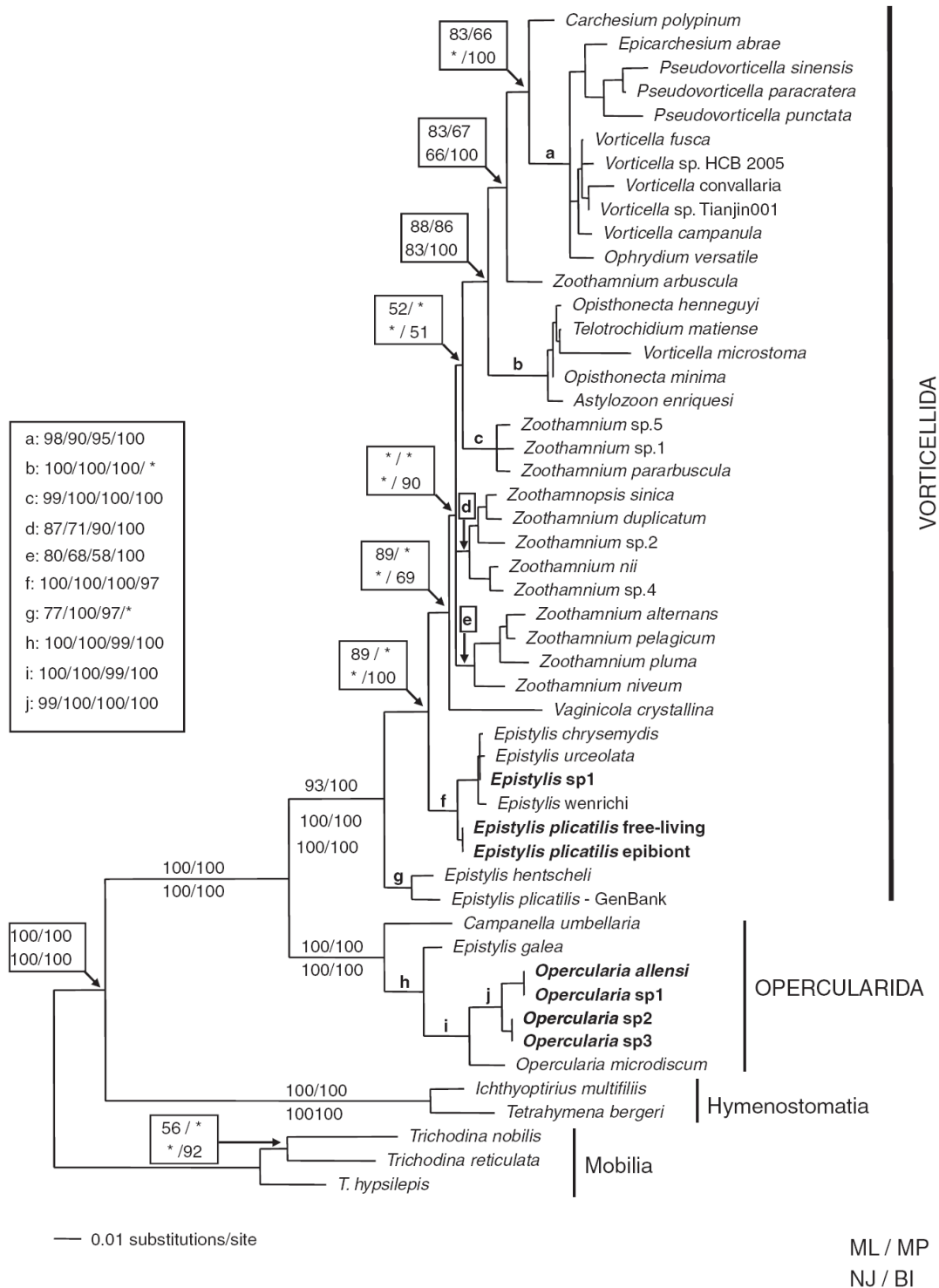
**Figura 5.** Características diagnósticas de peritríqueos dos gêneros *Zoothamnium* (Zoothamniidae) e em *Carchesium* (Vorticellidae). Na parte superior da imagem está apresentada a diferença na estrutura do espasmonema contrátil (extensão do corpo celular no interior do pedúnculo), sendo contínuo em *Zoothamnium* e descontínuo *Carchesium*. Na parte inferior da imagem está demonstrada a forma de contração do espasmonema no pedúnculo destes organismos. No gênero *Vorticella*, o mionema é contínuo, mas como um membro da família Vorticellidae a contração do espasmonema é em espiral. Em *Zoothamnium* (família Zoothamniidae) a contração é em zigue-zague. **Fonte:** Modificado de CLAMP & WILLIAMS (2006).



**Figura 6.** Esquema de trofontes de três famílias de “peritríqueos sessilídeos”. Trofante de vorticelídeo (centro) se fixa ao substrato por meio de um pedúnculo (St) que possui um espasmonema contrátil (filamento sólido) em seu centro. A banda telotrocal (TB) dos cinetossomos está inativa, com cílios não funcionais. Trofante astylozóide (direita) utiliza a ciliatura oral (OC) do seu peristômio para nadar e se alimentar. Como nos vorticelídeos, falta ciliatura telotrocal ciliada. A escópula do astylozóide é inativa. Geralmente há um vestígio de pedúnculo (VSt) a partir da escópula. Trofante de opisthionectídeo (esquerda) utiliza a ciliatura da banda telotrocal para nadar. Os cílios orais são utilizados somente para alimentação. Não há vestígio de pedúnculo associado à escópula (Sc).  
**Fonte:** WILLIAMS & CLAMP (2007).

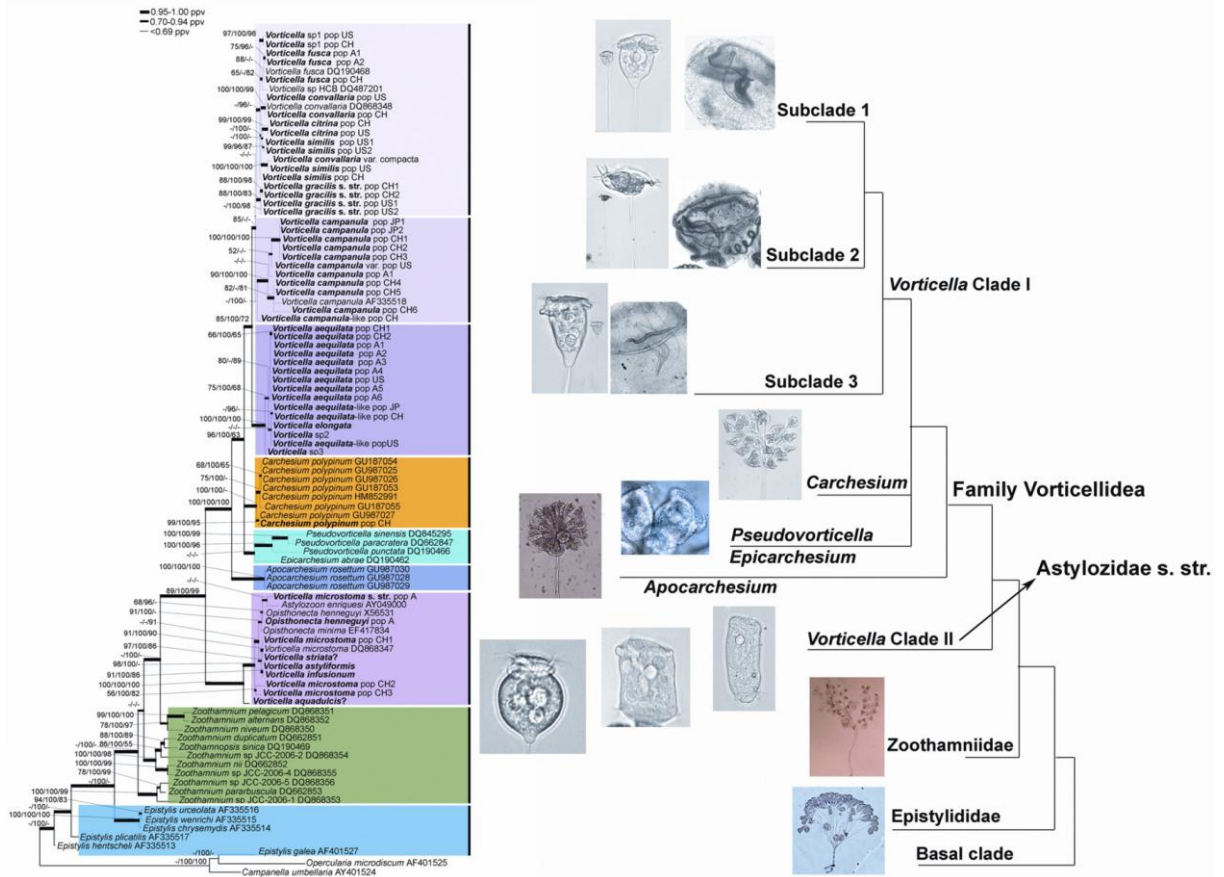


**Figura 7.** Hipótese filogenética sobre relação entre as subclasses da classe Oligohymenophorea, destacando relação entre as ordens da subclasse Peritrichia: Sessilida e Mobilida, com base em sequências de 18S-rDNA e apresentando valores de *bootstrap* conforme quatro métodos de reconstrução: análise bayesiana (BI), verossimilhança máxima (ML), parcimônia máxima (MP) e agrupamentos vizinhos (NJ). Símbolos ao lado do nome dos táxons são os números de acesso no GenBank de cada sequência. \*: valores de bootstrap < 50. N: incongruência na topologia naquele ramo conforme método de reconstrução filogenética utilizado. Novas sequências acrescentadas neste estudo estão em negrito. **Fonte:** ZHAN et al. (2009).



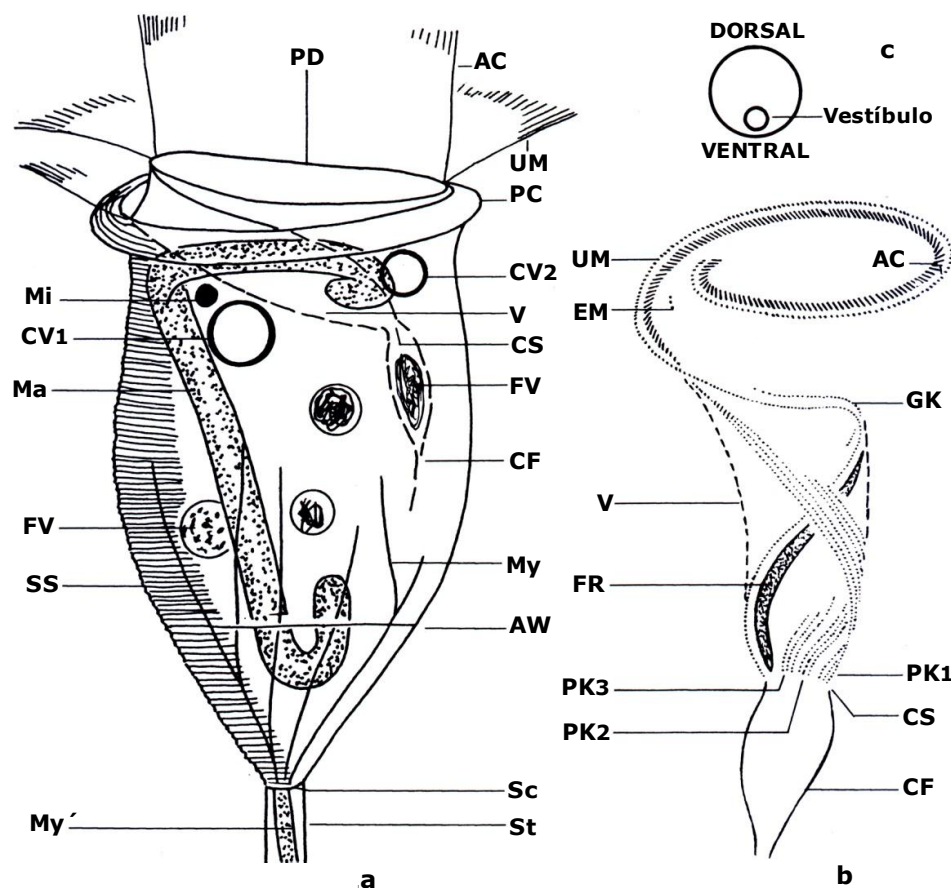
**Figura 8.** Árvore filogenética apresentando relações evolutivas entre ciliados peritríqueos com base nas sequências de 18S rDNA, com nova proposta de duas ordens para subclasse Peritrichia: Vorticellida e Operculariida. Os valores acima dos ramos indicam suporte de bootstrap para o nó ao lado por máxima verossimilhança (ML) e máxima parcimônia (MP). Os valores abaixo dos ramos indicam a probabilidade posterior estimada pelo algoritmo de agrupamento de vizinhos (NJ) e pela inferência Bayesiana (BI). **Fonte:** UTZ et al. (2010).





**Figura 9.** Árvore filogenética inferida a partir de sequências de 18S-rDNA. Valores numéricos mostrados próximos aos nós são valores de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia (MP) e Agrupamento de Vizinhos (NJ), respectivamente. A barra de escala corresponde a 10 substituições por 100 posições de nucleotídeos. A classificação segue LYNN (2008). As fotografias ao lado dos clados mostram a morfologia geral dos gêneros.

**Fonte:** SUN et al. (2012).



**Figura 10:** Esquema com as principais características necessárias a descrição contemporânea de espécies de protozoários ciliados peritríqueos com alta qualidade e confiabilidade. **a-** Peritríqueo **b-** Infraciliatura oral **c-** Visão superior do peritríqueo com determinação da região dorsal e ventral por meio do infundíbulo. AC= ciliatura espiral adoral; AW= coroa ciliar aboral; CF= citofaringe; CS= citóstoma; CV1= primeiro vacúolo contrátil 1; CV2= segundo vacúolo contrátil, raro entre os peritríqueos; EM= membrana epistomial; FR= filamento reticular; FV= vacúolo alimentar; GK= cinécia germinal; Ma= macronúcleo; Mi= micronúcleo; My= mionema somático; My'= mionema do pedúnculo ou espasmonema; PC= collar peristomial; PD= disco peristomial; PK1-3= policinécias infundibulares ou orais 1,2 e 3; SC= escópula; SS= estriações peliculares (“silver line system”); ST= pedúnculo; UM= membrana ondulante; V= vestíbulo. **Fonte:** FOISSNER et al. (1999).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; LANE, C.E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; IEGALL, L.; LYNN, D.H.; MCNAUS, H.; MITCHELL, E.A.D.; MOZLEY-STANRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKY, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.; SMIRNOV, A.; SPIGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.59, n. 5, p. 429-514, 2012.

CLAMP, J. C.; WILLIAMS, D. A molecular phylogenetic investigation of *Zoothamnium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 494-498, 2006.

CORLISS, J.O. **The ciliated protozoa**. Pergamon Press, London, 455p, 1979.

COOK, J. A.; CHUBB, J. C.; VELTKAMP, J. Epibionts of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda): an SEM study. **Freshwater Biology**, v. 39, p. 423-438, 1998.

DIAS, R. J. P.; CABRAL, A. F.; MARTINS, R. T.; STEPHAN, N. N. Occurrence of peritrich Ciliates on Limnic ologochete *Limnodrilus hoffmeisteri* in Neotropic. **Journal of Natural History**, v. 43, p.1-15, 2009.

FERNANDEZ-LEBORANS, G.; TATO-PORTO M. L. A review of the species of protozoan epibionts on crustaceans. i. peritrich ciliates. **Crustaceana**, v. 73, n. 6, p. 643-683, 2000.

FOISSNER, W.; BERGER, H.; KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichte des Bayer. **Landesamtes für Wasserwirtschaft**, v. 92, p. 1-502, 1992.

FOISSNER, W.; STRÜDER-KYPKE M.; VAN DER STAAY, G. W. M.; MOON-VAN DER STAAY, S.-Y.; HACKSTEIN, J. H. P. Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. **European Journal of Protistology**, v. 39, p. 365-372, 2003.

GENTEKAKI, E.; LYNN, D. H. Evidence for cryptic speciation in *Carchesium polypinum* Linnaeus, 1758 (Ciliophora: Peritrichia) inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological markers. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.57, n. 6, p. 508-519, 2010.

GILBERT, J. J.; SCHRÖDER, T. The ciliate epibiont *Epistylis pigmaeum*: selection for zooplakton hosts, reproduction and effect on two rotifers. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 878-896, 2003.

GONG, Y.-C.; YU, Y.-H.; VILLALOBO, E.; ZHU, F.-Y.; MIAO, W. Reevaluation of the phylogenetic relationship between mobilid and sessilid peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 397-403, 2006.

KAHL, A. **Peritrichia und Chonotricha**, p. 651-885. *In*: Urtiere Oder Protozoa. Deutschlands, G. Fischer, 1935.

LOM, J. The morphology and morphogenesis of the buccal ciliary organelles in some peritrichous ciliates. **Arch. Protistenkd**, v. 107, p. 131-162, 1964.

LYNN, D. H. The Ciliated Protozoa. **Characterization, Classification, and Guide to the Literature**, 3rd ed. Springer, Dordrecht, 605 p, 2008.

MADONI, P. Ciliated protozoans communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (northern Italy). **Hydrobiologia**, v. 541, p. 55-69, 2005.

MIAO, W.; YU, Y.-H.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) with emphasis on the genus *Epistylis*, inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 583-587, 2001.

MIAO, W.; FEN, W.-S.; YU, Y.-H.; ZHANG, X.-Y.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 180-186, 2004.

MODEO, L.; ROSATI, G.; ANDREOLI, I.; GABRIELLI, G.; VERNI, F.; PETRONI G. Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). **Proceedings of the Japan Academy**, v. 82, p. 359-374, 2006.

MODEO, L.; PETRONI, G.; LOBBAN, C. S.; VERNI, F.; VANNINI C. Morphological, ultrastructural, and Molecular Characterization of *Euplotidium rosati* n. sp. (Ciliophora, Euplotida) from Guam. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, p. 25-36, 2013.

ROSATI, G.; MODEO, L.; MELAI, M.; PETRONI, G.; VERNI, F. A multidisciplinary approach to describe protists: a morphological, ultrastructural, and molecular study on *Peritromus kahli* Villeneuve-Brachon, 1940 (Ciliophora, Heterotrichea). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 49-59, 2004.

SMITH, M. E. Distribution Patterns and Seasonal Occurrence of *Rhabdostyla* sp. on *Dero nivea* (Oligochaeta, Naididae). **American Midland Naturalist**, v. 116, p. 348-355, 1986.

SUN, P.; CLAMP, J. C.; XU, D.; KUSUOKA, Y.; HORI, M. Molecular phylogeny of the family Vorticellidae (Ciliophora, Peritrichia) using combined datasets with a special emphasis on the three morphologically similar genera *Carchesium*, *Epicarchesium* and *Apocarchesium*. **International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology** v. 61, p. 1001-1010, 2011.

SUN, P.; CLAMP J. C.; XU, D.; KUSUOKA, Y; MIAO, W. *Vorticella* Linnaeus, 1767 (Ciliophora, Oligohymenophora, Peritrichia) is a grade not a clade: redefinition of *Vorticella* and the Families Vorticellidae and Astylozoidae using molecular characters derived from the gene coding for small subunit ribosomal RNA. **Protist**, v. 163, p. 129-142, 2012 a.

UTZ, L. R. P.; SIMÃO, T. L. L.; SAFI, L. S. L.; EIZIRIK, E. Expanded phylogenetic representation of genera *Opercularia* and *Epistylis* sheds light on the evolution and higher-level taxonomy of peritrich ciliates (Ciliophora: Peritrichia). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 415-420, 2010.

WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basics aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p. 175-189, 1989.

WILLIAMS, D.; CLAMP, J. C. A molecular phylogenetic investigation of *Opisthonecta* and related genera (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 317-323, 2007.

YI, Z.; SONG, W. Evolution of the order Urostylida (Protozoa, Ciliophora): new hypotheses based on multi-gene information and identification of localized incongruence. **Plos One**, v.6, e17471, 2011.

ZHAN, Z., XU, K., WARREN, A.; GONG, Y. Reconsideration of phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences, with the establishment of a new subclass Mobilia Kahl, 1933. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 552-558, 2009.

## SEÇÃO 1

### ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA SUBCLASSE PERITRICHIA STEIN, 1859 (ALVEOLATA: CILIOPHORA) BASEADO EM SEQUÊNCIAS DE 18S-rDNA COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS EPISTYLIDIDAE E OPERCULARIIDAE

#### RESUMO

A filogenia da subclasse Peritrichia e dos seus principais clados internos ainda não está resolvida. Para contribuir com melhor entendimento sobre a filogenia de Peritrichia e de seus principais clados (famílias e gêneros) foram sequenciadas sete espécies da família Epistylididae e quatro espécies da família Operculariidae. As árvores filogenéticas de verossimilhança máxima e inferência Bayesiana apresentaram topologias similares. A subclasse Peritrichia permaneceu monofilética. As duas novas ordens de peritríqueos baseadas em sequências do gene 18S-rDNA Vorticellida e Operculariida se mantiveram com valores de suporte máximo. A família Operculariidae e o gênero *Opercularia* permaneceram como um clado natural, indicando que o opérculo pode ser um bom marcador filogenético. As sequências de *Epistylis nympharum* e *Rhabdostyla inclinans* agruparam-se entre os “vorticelídeos” com valor de suporte máximo, indicando que dentro de Vorticellida o gênero *Epistylis*, *Rhabdostyla* e família Epistylididae não formam grupos naturais. A família Epistylididae apresentou representantes distribuídos em três clados muito distintos, indicando que características utilizadas para reunir representantes desta família como a área peristomial “epistiliforme” e o pedúnculo rígido não são bons marcadores filogenéticos. A sequência de *Orborhabdostyla* sp. 1 agrupou-se junto a sequência de *Orborhabdostyla bromelicola*, sugerindo que o novo gênero possa ser um grupo natural. As espécies de *Epistylis chrysemydis* do Brasil e de *Epistylis hentscheli* do Brasil agruparam-se com as suas respectivas espécies da China. A partir dos resultados apresentados conclui-se que há necessidade de investigar mais detalhadamente os caracteres morfológicos dos peritríqueos, a fim de encontrar marcadores filogenéticos confiáveis e aumentar o número de sequências de 18S-rDNA de outros peritríqueos ainda não sequenciados, assim como testar outros marcadores moleculares.

**Palavras-chave:** filogenia molecular, marcadores filogenéticos, monofilética, Operculariida, Vorticellida



## INTRODUÇÃO

Os microeucariotos do filo Ciliophora constituem um grupo natural com mais de 8.000 espécies divididas em dois subfilos e 11 classes. A classe Oligohymenophorea possui seis subclasses, dentre elas a subclasse Peritrichia, contendo mais de 1.000 espécies descritas. Os peritríqueos estão divididos em duas ordens: Sessilida Kahl, 1933 e Mobilida Kahl, 1933 (*sensu* LYNN, 2008) e são comumente encontrados em ecossistemas aquáticos, sendo mais abundantes em ambientes enriquecidos organicamente e com elevada densidade bacteriana, sendo raros em ambientes edáficos. Estudos moleculares recentes sugerem que as duas ordens (Sessilida e Mobilida) não constituem juntas grupos irmãos e propõem a separação da antiga subclasse Peritrichia em duas subclasses: Peritrichia<sup>1</sup> (*sensu* ZHAN et al., 2009) contendo representantes da antiga ordem Sessilida (~800 espécies) e Mobilia<sup>2</sup> contendo representantes da antiga ordem Mobilida (250 espécies) (ZHAN et al., 2009). Iremos adotar neste estudo a proposta elaborada por ZHAN et al. (2009), ou seja, os termos Peritrichia e peritríqueos se referem aos antigos representantes da ordem Sessilida (*sensu* LYNN, 2008).

Embora muitos estudos sobre filogenia molecular tenham corroborado propostas de classificação baseadas em dados morfológicos para ciliados, alguns resultados têm mostrado propostas incongruentes (LI & SONG, 2006; RAGAN et al., 1996; STRÜDER-KYPKE et al., 2000). Os peritríqueos comparativamente com outros grupos de ciliados tem sido negligenciados em relação ao número de sequências do gene 18S-rDNA disponíveis no GenBank (DIAS, 2012), sendo necessário ampliar estudos com esse intuito. Nos últimos quinze anos, estudos sobre filogenia interna de Peritrichia com base em sequências de 18S-rDNA, gene alfa-tubulina e região espaçadora ITS tem demonstrado a formação de clados radicalmente diferentes daqueles propostos na classificação elaborada com base em caracteres morfológicos (CLAMP & WILLIAMS, 2006; DIAS et al., 2012; GONG et al., 2010; LI et al., 2008; MIAO et al., 2001, 2004; MARTÍN-CERECEDA et al., 2007; UTZ & EIZIRIK, 2007; WILLIAMS & CLAMP, 2007; UTZ et al., 2010; SUN et al., 2010, 2011, 2012 a, 2013).

No presente estudo obtivemos 12 novas sequências do gene 18S-rDNA para 11 espécies de peritríqueos, pertencentes a duas famílias distintas, com objetivo de esclarecer e ampliar o conhecimento acerca da filogenia interna de Peritrichia, com ênfase na validade das famílias Epistylididae e Operculariidae. Foram discutidos ainda a validade e relevância das principais características morfológicas usadas para separar os principais grupos de

peritríqueos, tais como: estilo de vida, presença de mionema no pedúnculo, padrão de contração do pedúnculo, morfologia do peristômio e presença de lórica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e processamento inicial das amostras:

Os peritríqueos sequenciados neste estudo foram coletados em taques de bromélias, córregos e lagos urbanos em dois municípios do estado de Minas Gerais: Juiz de Fora (microrregião de Juiz de Fora) e Santa Rita de Minas (microrregião de Caratinga) (**Tabela 1.1; p. 42**).

As coletas foram feitas esporadicamente ao longo dos anos de 2013 e 2014. A metodologia de coleta variou de acordo com o ambiente e o hospedeiro amostrado.

As espécies *Epistylis chrysemydis* Bishop & Jahn, 1941, *Opercularia* sp. 1 e *Opercularia* sp. 2 foram encontradas sob a carapaça de cágados. Para a coleta dos peritríqueos, os cágados foram capturados com rede e sua carapaça foi raspada com estilete. Após a raspagem, uma pipeta de Pasteur foi utilizada para lançar jatos de água mineral sobre a parte raspada da carapaça e um recipiente de acrílico recebia toda a água da lavagem (protocolo CEUA/UFJF n° 023/2015 / IBAMA/SISBIO solicitação n° 453571). Para obtenção de *Epistylis plicatilis* Ehrenberg, 1831 e *Epistylis hentscheli* Kahl, 1935 foram utilizados substratos artificiais (UTZ et al., 2008) submersos em um córrego urbano durante sete dias para colonização destes ciliados coloniais. O epistilídeo epibionte de copépodos *Epistylis nympharum* Engelmann, 1862 foi coletado em um lago eutrófico com o auxílio de uma rede de plâncton 30 µm. As espécies *Epistylis* sp. 1, *Opercularia nutans* (Ehrenberg, 1831) Stein, 1854 e *Opercularia articulata* Goldfuss, 1820 foram encontradas como epibiontes de moluscos ancilídeos (Gastropoda, Ancyliidae) em um córrego urbano. Os moluscos foram coletados com puçá, analisados em microscópio estereoscópio e os peritríqueos foram raspados com agulhas e isolados em saleiras conforme a espécie. As espécies *Rhabdostyla inclinans* (Mueller, 1773) Roux, 1901 e *Orborhabdostyla* sp.1 foram coletadas em ambientes bromelícolas com o auxílio de uma pipeta de acrílico (injetor de temperos de 50 mL) com bulbo na extremidade (**Tabela 1.1; p. 42**).

**Tabela 1.1:** Espécies de peritríqueos (Ciliophora, Peritrichia) encontrados em diversos ambientes do estado de Minas Gerais com informações sobre ambiente, hospedeiro e localidade (coordenadas geográficas).

<b>Espécies de Peritrichia</b>	<b>Ambiente / Hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>
<i>Epistylis chrysemydis</i>	Lago / cágados	A1
<i>Epistylis plicatilis</i>	Córrego / Hirudinea	A2
<i>Epistylis hentschel</i>	Córrego / *	A3
<i>Epistylis nympharum</i>	Lago / copepoda	A4
<i>Epistylis</i> sp.1	Córrego / molusco	A5
<i>Oipercularia articulata</i>	Córrego / molusco	A6
<i>Opercularia nutans</i>	Córrego / molusco	A7
<i>Opercularia</i> sp.1	Lago / cágado	A8
<i>Opercularia</i> sp.2	Lago / cágado	A9
<i>Orborhabdostyla</i> sp.1	Bromélia / *	B1
<i>Rhabdostyla inclinans</i> 1	Bromélia / anelídeo	A10
<i>Rhabdostyla inclinans</i> 2	Bromélia / anelídeo	A11

Microrregião de Juiz de Fora: A1 (21°47'18.12"S; 43°21'56.24"W); A2 (21°44'3.41"S; 43°19'37.39"W); A3 (21°42'42.51"S; 43°37'17.50"W); A4 (21°44'45.64"S; 43°21'35.58"W); A5 (21°39'17.19"S; 43°25'31.17"W); A6 (21°39'17.19"S; 43°25'31.17"W); A7 (21°39'17.19"S; 43°25'31.17"W); A8 (21°27'35.87"S; 43°33'7.93"W); A9 (21°47'18.12"S; 43°21'56.24"W); A10 (21°46'38.77"S; 43°22'13.90"W); A11 (21°46'38.77"S; 43°22'13.90"W); B- microrregião de Caratinga: B1 (19°52'28.83"S; 42° 7'58.84"W). \* representa espécies que não foram encontradas como epibionte.

No laboratório as amostras foram colocadas em placas de Petri contendo água do local de coleta (previamente filtrada) e foram observadas sob microscópio estereoscópio para verificar a ocorrência dos ciliados. Todos os peritríqueos foram triados com auxílio de micropipetas (DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS, 1986) e isolados em uma saleira para fixação conforme técnica a ser realizada: em álcool absoluto para estudo molecular, solução de Bouin para realização da técnica de impregnação pela prata (WILBERT, 1975), formaldeído 4% para realização da técnica do carbonato de prata (FOISSNER et al., 1991).

### **Investigação morfológica e identificação das espécies**

A observação dos ciliados *in vivo* é essencial no estudo da morfologia e taxonomia dos peritríqueos (FOISSNER, 1992; FOISSNER et al., 2002). As espécies de peritríqueos detectadas nas saleiras *in vivo* foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas utilizando microscópio Olympus BX51 com contraste interferencial diferencial (DIC) em aumentos de 100x, 200x, 400x, 800x, 1000x e 2000x e fotografadas com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio pelo programa Software Image pro-plus 5.0 Olympus®. As características utilizadas na observação *in vivo* para identificação dos peritríqueos foram: presença de mionema (espasmonema) no pedúnculo, morfologia do zoóide, formato da colônia, número de zoóides na colônia, contratilidade do zoóide, formato do disco e colar peristomial, posição do vacúolo contrátil, posição e formato do aparato nuclear, detalhe das estriações peliculares (“silverline system”), presença e coloração de grânulos corticais, presença de simbioses (algas endossimbioses, bactérias ectossimbioses), morfologia do infundíbulo, detalhe da ciliatura oral e presença de mionemas e grânulos tecoplasmáticos no pedúnculo. A identificação foi baseada nos trabalhos de KAHL (1935), FOISSNER et al. (1992) e FOISSNER et al. (2009). A terminologia e a sistemática para as famílias seguem proposta de LYNN (2008).

### **Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento**

Os peritríqueos triados e isolados de seus hospedeiros em saleiras foram lavados por mais de uma vez utilizando água mineral esterilizada. Após etapas de lavagem os ciliados foram fixados em etanol absoluto (n~20) e mantidos em tubos de 1,5 mL dentro da geladeira para posterior realização da extração de DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o (*Kit DNeasy® Blood and Tissue*) Qiagen (2006), seguindo as orientações do fabricante (**Anexo 1.1; p. 66**) para extrações de tecidos animais. O DNA dos indivíduos extraídos foi estocado em freezer -20°C em microtubos de 2 mL. As reações de amplificação das sequências de 18S-rDNA foram realizadas em termociclador “Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700”, em eppendorfs de 200µL, em um volume final de 50µL, contendo: 39,8µL de H<sub>2</sub>O; 5µL de tampão 10X; 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,5µL de DNTP (25mM); 1,0µL de cada iniciador (50µM); 0,25µL de Taq Platinum® DNA polimerase (Invitrogen) (5U/µL); e 1,0µL de DNA genômico purificado.

Os parâmetros de ciclagem foram os seguintes: um ciclo de 94 °C por 2 min; 35 ciclos de: 94 °C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 50 °C por 30 segundos

(anelamento dos iniciadores) e 72 °C por 2 minutos (extensão das fitas de DNA); terminando com um ciclo de 72 °C por 7 minutos para a finalização na polimerização de eventuais fitas inacabadas. Foram utilizados os iniciadores específicos para peritríqueos Peri\_57F (5`CAT GCA TGT GTA AGT ATA AGT A) e Peri\_1385R (5`CGG TGT GTA CAT TTT GC) conforme DIAS (2012) para amplificação de sequências do 18S-rDNA. As reações de sequenciamento foram montadas empregando-se produtos de pelo menos quatro reações de PCR purificados para cada espécie de peritríqueo, utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” (Qiagen). Para as reações padrão de sequenciamento foram utilizados 5-100 ng de DNA e 3,2 pmoles de iniciadores internos a sequência de interesse em um volume máximo de 7,0 µL. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento do *amplicon* foram: Peri\_396R (5` - GAG AGT TGT TAT TTC TTG TC); Peri\_975F (5` - GGA AAC TCA TCA GGG CAA) e Peri\_1042R (5` - TGC ACC ACC ACT AGA CC) (DIAS, 2012). Os sequenciamentos foram realizados na Unidade Multidisciplinar de Genômica do IBCCF/UFRJ em sequenciador automático de DNA ABI 3130xl. Os produtos dos sequenciamentos foram editados manualmente utilizando o programa Geneious 6.0 (Biomatters Limited).

### **Análises filogenéticas**

As sequências do gene 18S-rDNA utilizadas na análise filogenética estão listadas no **anexo 1.2 (p. 69)**. Foram utilizados como grupo externo as classes Phyllopharyngea de Puytorac et al., 1974 (n=2) e Nassophorea Small & Lynn, 1981 (n=1). Dentro da classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974 foram usados representantes das subclasses Scuticociliatia Small, 1967 (n=2), Hymenostomatia Delage & Hèrouard, 1896 (n=3), Mobilia Zhan et al. 2009 (n=3), Peniculia Faurè-Fremiet *in* Corliss, 1956 (n=3), Astomatia Schewiakoff, 1896 (n=3) e 56 sequências de 18S-rDNA de representantes da subclasse Peritrichia. Foram selecionadas sequências maiores que 1500 pb e provenientes de estudos que realizaram identificação das espécies usando as técnicas ciliatólogicas necessárias para identificação dos peritríqueos. As sequências foram alinhadas pelo programa MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATO & STANDLEY, 2013), levando em consideração a estrutura secundária do RNA. A edição das sequências foi feita manualmente no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Após a remoção de sítios de natureza ambígua e sequências dos iniciadores, o alinhamento foi editado de modo que todas as sequências tivessem o mesmo tamanho. O produto desta edição foi refinado utilizando o programa Gblocks (v0.91b) selecionando três configurações distintas: mais restrigente, menos

restringente e padrão. A escolha do melhor modelo evolutivo para as análises filogenéticas foi feita tendo como base o indicado pelo programa jModelTest 2.1.4 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003). A análise Bayesiana foi realizada no programa Mr Bayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012) usando o Modelo evolutivo GTR + I + G, através de 1.000.000 gerações e “burn in” de 25%. A análise de verossimilhança máxima (ML) foi realizada no programa PhyML (GUINDON et al., 2010) através do servidor online Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>) (DEREEPER et al., 2008) utilizando o mesmo modelo evolutivo sugerido após análise no jModelTest. O suporte estatístico dos ramos foi avaliado pelo método do *Bootstrap* (1000 pseudo-réplicas). As árvores produzidas foram editadas no programa Figtree 1.4.0 (RAMBAUT, 2006). Visto similaridade entre as árvores obtidas com base nos dois métodos de reconstrução foi apresentada nesta proposta a árvore obtida pela análise de verossimilhança máxima (ML) (**Figura 1.1; p. 57**).

## RESULTADOS

A composição nucleotídica das 12 sequências do gene 18S-rDNA obtidas no presente estudo estão apresentadas no **anexo 1.2 (p. 69)** e as fotomicrografias *in vivo* das 11 espécies sequenciadas estão na **Prancha 1.1 (p. 59)**. As árvores geradas pelos dois métodos de reconstrução filogenética (ML/BI) recuperaram a mesma hipótese evolutiva em quase todos os ramos, apresentando poucas incongruências (**Figura 1.1; p. 57**). Em todas hipóteses filogenéticas apresentadas foi recuperada monofilia da subclasse Peritrichia e, ainda, a divisão de Peritrichia em dois clados irmãos com divergência bem suportada (100/100): Operculariida e Vorticellida (*sensu* UTZ et al., 2010). Entretanto, a subclasse Peritrichia (*sensu* LYNN, 2008), unindo mobilídeos e antigos sessilídeos, se agrupou hora como um clado natural e ainda com diferentes subclasses de Oligohymenophorea conforme as configurações utilizadas na edição do dataset e método de reconstrução filogenético (ML e BI), indicando impossibilidade de definição da relação evolutiva deste grupo usando apenas sequências do gene 18S-rDNA (**Anexo 1.3 e 1.4; p. 72 e 74**). A subclasse Peritrichia (*sensu* ZHAN et al., 2009) é um grupo natural conforme todas as árvores geradas neste estudo, sendo recuperado em todas análises com valores máximos de suporte.

A ordem Operculariida incluiu representantes da família Operculariidae e duas espécies da família Epistylididae (*Epistylis galea* e *Campanella umbellaria*), enquanto que a

ordem Vorticellida incluiu grande parte dos táxons de Peritrichia: *Vaginicola crystallina* (Vaginicolidae), e representantes das famílias Zoothamniidae, Vorticellidae, Opisthnectidae, Ophrydiidae, Astylozoidae e a maioria das espécies de Epistylididae (**Figura 1.1; p. 57**).

No clado contendo representantes da ordem Operculariida as quatro novas sequências de *Opercularia* obtidas neste estudo agruparam-se com sequência do único representante do gênero disponível no GenBank (*Opercularia microdiscum*), formando um clado com elevados valores de suporte (97/100). A inclusão das novas sequências e os elevados valores de suporte sugerem fortemente a monofilia do gênero *Opercularia* (**Figura 1.1**).

No clado contendo representantes da ordem Vorticellida, a única espécie loricada (*Vaginicola crystallina*) se apresentou como grupo irmão de todos outros representantes deste clado (100/100) ressaltando possível importância da lórica no estudo da filogenia de Peritrichia. Os representantes da família Zoothamniidae não se agruparam em clado natural estando distribuídos em três clados distintos (**Figura 1.1**).

Os representantes da família Epistylididae se agruparam em três clados bem distintos da subclasse Peritrichia (*sensu* UTZ et al., 2010). <sup>1</sup>As espécies *Epistylis galea* e *Campanella umbellaria* se agruparam com representantes da ordem Operculariida (100/100). <sup>2</sup>A grande maioria dos representantes se agrupou em clado irmão de *Zoothamnium parabuscola*. Neste clado foram incorporadas novas sequências: *Epistylis chrysemydis*, *Epistylis plicatilis*, *Epistylis* sp.1, *Epistylis hentscheli*, *Orborhabdostyla* sp. 1. <sup>3</sup>O outro clado contendo sequências inéditas dos epistilídeos *Rhabdostyla inclinans* e *Epistylis nympharum* se agrupou entre representantes da família Vorticellidae. Os resultados sugerem que Epistylididae não constitui grupo natural. A presença de representantes do gênero *Epistylis* em três clados distantes indica necessidade de revisão taxonômica do gênero. O mesmo ocorre para o gênero *Rhabdostyla*, visto agrupamento inesperado de *Rhabdostyla inclinans* entre os “vorticelídeos” e não entre os epistilídeos. Outro dado inédito deste estudo é a posição filogenética de *R. inclinans* em relação aos representantes do gênero *Orborhabdostyla* (**Figura 1.1**). O agrupamento contendo as duas sequências do gênero *Orborhabdostyla* com altos valores de suporte (85/100), embora com apenas dois representantes sequenciados, corrobora a proposta elaborada de separar espécies de rabadostilídeos conforme formato do aparato nuclear (FOISSNER et al., 2009). A espécie *Telotrochidium matiense* se agrupou entre os epistilídeos tal como sugerido em estudos recentes. As sequências do gene 18S-rDNA obtidas para populações de *Epistylis hentscheli* e *Epistylis chrysemydis* coletadas no Brasil se agruparam com aquelas coletadas na China (**Figura 1.1**).

O clado denominado informalmente como “vorticelídeos” possui representantes de quatro famílias (Astylozoidae, Ophryidiidae, Opisthnectidae e Vorticellidae) em estudos prévios, entretanto, neste trabalho os epistilídeos *Rhabdostyla inclinans* e *Epistylis nympharum* se agruparam neste clado. Dentre os “vorticelídeos” há dois clados bem suportados (100/100), um contendo epistilídeos, *Opisthnecta henneguyi*, *Opisthnecta minima*, *Astylozoon enriquesi*, e *Vorticella* spp., e outro clado agrupando epistilídeos e representantes dos gêneros *Apocarchesium*, *Carchesium*, *Epicarchesium*, *Pseudovorticella* e *Vorticella* (**Figura 1.1**).

## DISCUSSÃO

### 1. Peritrichia: grupo natural?

A subclasse Peritrichia Stein, 1859 possui 19 famílias e duas ordens (Sessilida e Mobilida) conforme proposta da sistemática tradicional (LYNN, 2008), tendo como principais sinapomorfias a ciliatura oral em espiral e reduzida ciliatura somática (LOM, 1964; LYNN, 2008). Nesta proposta os mobilídeos (Peritrichia, Mobilida) teriam derivado de um ancestral similar aos telotróquios dos sessilídeos (LOM, 1964, 1973; RAABE, 1963).

Estudos recentes usando sequências do gene 18S-rDNA questionaram a monofilia de Peritrichia (GONG et al., 2006; UTZ & EIZIRIK, 2007; ZHAN et al., 2009), propondo que estas similaridades morfológicas nas ciliaturas oral e somática são consequência do estilo de vida e hábito alimentar similares. Embora estudos anteriores sinalizem necessidade de se investigar melhor a monofilia de Peritrichia (*sensu* LYNN, 2008), somente com ampliação de sequências de 18S-rDNA para ciliados “mobilídeos” realizada por ZHAN et al., (2009) foi possível entender melhor a relação entre sessilídeos e mobilídeos. Estes autores propuseram que a subclasse Peritrichia (*sensu* LYNN, 2008) não constitui um grupo natural e que a antiga união das ordens Sessilida e Mobilida se fez com base em caracteres homoplásicos, as ciliaturas oral e somática, fruto de convergência evolutiva. Os referidos autores propuseram a criação da nova subclasse Mobilia Kahl, 1933 e indicaram o disco adesivo como principal apomorfia deste clado.

No presente estudo as árvores inferidas por diferentes métodos filogenéticos (ML/BI) e utilizando de diferentes métodos de configuração das sequências (mais estrigente, menos estrigente e padrão), os “mobilídeos” foram sustentados como grupos irmãos dos sessilídeos



em quatro das seis árvores elaboradas (no presente estudo mostramos três árvores consenso das seis elaboradas) (**Figura 1.1, Anexo 1.3 e 1.4; p. 57, 72 e 74**), indicando que a monofilia da subclasse Peritrichia (Sessilida + Mobilida *sensu* LYNN, 2008) não pode ser rejeitada, tal como recentemente sugerido por ZHAN et al. (2013). Estes autores observaram que conforme quantidade de táxons, métodos de alinhamento e métodos de curamento sessilídeos e mobilídeos se agrupam em diferentes posições dentro da classe Oligohymenophrea, ressaltando incapacidade do marcador 18S-rDNA em esclarecer esta questão, o que ressalta clara necessidade do uso de novos marcadores moleculares.

## **2. Peritrichia: Operculariida + Vorticellida?**

Em estudo sobre filogenia interna de Peritrichia (*sensu* ZHAN et al., 2009), UTZ et al. (2010) propuseram a divisão deste clado em duas ordens (Operculariida e Vorticellida) conforme topologia obtida usando sequências de 18S-rDNA. A monofilia destes dois cladoss possui elevados valores de suporte em diversos estudos na literatura (CLAMP & WILLIAMS, 2006; GONG et al., 2006; LI et al., 2008; MIAO et al., 2004; SUN et al., 2011, 2012 a; UTZ & EIZIRIK, 2007; UTZ et al., 2010; WILLIAMS & CLAMP, 2007). Embora seja consenso a validade destes dois cladoss como grupos naturais, ainda não foram propostos caracteres morfológicos, ecológicos e/ou comportamentais que sirvam como sinapomorfia para estes duas ordens: Operculariida e Vorticellida.

Em todas as árvores filogenéticas apresentadas neste estudo, após inclusão de 12 novas sequências, foi recuperada monifilia das duas ordens propostas por UTZ et al. (2010), com valores máximos de suporte. Estes resultados ressaltam necessidade de se investigar sinapomorfias para estes cladoss, bem como de se obter sequências de 18S-rDNA para representantes de sete outras famílias de Peritrichia e diversos gêneros ainda não sequenciados a fim de melhorar a acurácia das hipóteses filogenéticas e testar divisão da subclasse nas duas ordens propostas por UTZ et al. (2010).

## **3. Operculariida**

A ordem Operculariida (*sensu* UTZ et al., 2010) possui representantes das famílias Operculariidae e Epistylididae no presente estudo. Os peritríqueos destas duas famílias possuem pedúnculo rígido e sem mionemas, entretanto, podem ser diferenciados pela arquitetura da área peristomial do zoóide: <sup>1</sup>grande disco peristomial e colar peristomial proeminente, tipo “epistiliforme” e <sup>2</sup>disco peristomial rígido e pequeno com colar peristomial

não aparente, tipo “operculariforme” (WILLIAMS & CLAMP, 2007). O agrupamento de dois epistilídeos (*Epistylis galea* Ehrenberg, 1831 e *Campanella umbellaria* (Linnaeus, 1758) Goldfuss, 1820) próximo aos opercularídeos (**Figura 1.1**) já havia sido registrado em outros estudos, embora não haja explicações baseadas em dados morfológicos (CLAMP & WILLIAMS, 2006; GONG et al., 2006; LI et al., 2008; MIAO et al., 2004; SUN et al., 2011, 2012 a; UTZ et al. 2007, 2010; WILLIAMS & CLAMP, 2007). Segundo WILLIAMS & CLAMP (2007), se estudos futuros, usando maior número de sequências de 18S-rDNA e outros marcadores moleculares, confirmarem esta posição filogenética para alguns epistilídeos, será necessário rever se formato do colar peristomial reflete genuína divergência evolutiva em peritríqueos.

A primeira sequência do gene 18S-rDNA obtida de um opercularídeo foi a partir da espécie *Opercularia microdiscum* Fauré-Fr., 1904 (MIAO et al., 2004). Com inclusão de quatro novas sequências para gênero *Opercularia* Stein, UTZ et al. (2010) sugerem a monofilia do gênero, mesmo usando sequências em torno de 1Kb. Foram realizadas análises usando todas as sequências disponíveis para o gênero (embora incompletas) e as novas obtidas neste estudo e em todas as topologias recuperadas foi observada monofilia do gênero (dados não apresentados).

Estudos futuros incluindo sequências de 18S-rDNA e outros marcadores moleculares para representantes de outros 14 gêneros da família Operculariidae são necessários para melhor esclarecimento da filogenia interna de Operculariida.

Os representantes da família Operculariidae são caracterizados por apresentar colar peristomial pouco proeminente e disco epistomial eversível e contrátil sobre um pedúnculo (LYNN, 2008). O gênero *Opercularia* possui características únicas que o distingue dos epistilídeos: disco elevado para fora do peristômio por meio de um pedúnculo e colar peristomial conspícuo (KAHL, 1935). Os resultados da filogenia molecular obtidos neste estudo ressaltam importância do disco peristomial como genuína sinapomorfia para o clado.

#### **4. Vorticellida Utz et al., 2010**

##### **4.1. *Vaginicola crystallina*: lórica e evolução em Peritrichia**

Em estudos iniciais sobre a sistemática de Peritrichia, KAHL (1935) propôs divisão destes ciliados em dois grandes grupos: tribos Loricata e Aloricata. A tribo Loricata incluía ciliados que sintetizavam uma lórica pseudoquitinosa, rígida e fortemente delineada. Os outros peritríqueos são caracterizados pela ausência de uma lórica (Aloricata). Embora esta

divisão não tenha sido recuperada em estudos filogenéticos recentes, dentro da ordem Vorticellida há uma clara separação entre a sequência de *Vaginicola crystallina* e os outros representantes da ordem, também observada por DIAS (2012), sugerindo importância desta característica na elaboração de futuras classificações dos peritríqueos. Entretanto, para aprofundamento desta questão será necessário obter informações moleculares de diversos gêneros de peritríqueos lorizados, tais como representantes dos gêneros *Cothurnia* Ehrenberg, 1831, *Thuricola* Kent, 1881, *Pyxicola* Kent, 1881, *Platycola* Kent, 1881, *Lagenophrys* Stein, 1852 e dos raros representantes da família Rovinjellidae.

Os representantes do gênero *Apoarchesium*, criado para agrupar organismos coloniais, com zoóides aderidos em forma de roseta e pedúnculo contraindo em espiral (JI & KUSUOKA, 2009), possuem uma estrutura denominada de disco na base dos zoóides que segundo NORF & FOISSNER (2010) parece ser um vestígio de uma lórica, entretanto, sua posição filogenética distante de *Vaginicola crystallina* (Ehrenberg, 1830) Fromental, 1903 não endossa esta hipótese. Estudos mais aprofundados sobre composição e ontogenia da lórica em Peritrichia e filogenia molecular, acrescentando novas sequências de 18S-rDNA e usando outros marcadores moleculares poderão esclarecer melhor a importância da lórica na evolução dos peritríqueos.

#### **4.2. Zoothamniidae: grupo natural?**

Os peritríqueos do gênero *Zoothamnium* Bory, 1824 foram inseridos na família Vorticellidae por EHRENBURG (1838), entretanto, mais tarde SOMMER (1951) criou a nova família Zoothamniidae para abrigar peritríqueos deste gênero. A validade de Zoothamniidae contestada por CORLISS (1979) foi validada por LYNN & SMALL (2002). A principal sinapomorfia da família é o modo de contração do espasmonema em zigue-zague, diferente de Vorticellidae onde a contração ocorre em espiral (CLAMP & WILLIAMS, 2006; LYNN & SMALL, 2002).

Estudos moleculares recentes demonstraram que os zootaminídeos não se agrupam entre os representantes da família Vorticellidae (CLAMP & WILLIAMS, 2006; LI et al., 2008, 2014; SUN et al., 2011, 2012 a; UTZ et al., 2010), atestando a proposta de classificação sugerida por LYNN & SMALL (2002). Conforme dados obtidos no presente estudo, os zootaminídeos estão mais relacionados com representantes da família Epistylididae (**Figura 1.1**). Nossos resultados também demonstram, tal como apresentado em estudos prévios

(CLAMP & WILLIAMS, 2006; LI et al., 2008, 2014), que a família Zoothamniidae não constitui um grupo natural.

A relação entre zootaminídeos e epistilídeos tem sido investigada em estudos prévios, com sugestão de Epistylididae como um grupo plesiomórfico quando comparado aos zootaminídeos (CLAMP & WILLIAMS, 2006; SUN et al., 2011, 2012 a; UTZ et al., 2010), entretanto, no presente estudo alguns representantes da família Zoothamniidae parecem ser um grupo externo em relação aos epistilídeos, provavelmente pelo acréscimo de novas sequências de epistilídeos nesta proposta quando comparado com estudos anteriores (**Figura 1.1**). Recentemente, LI et al. (2014), em estudo usando sequências do gene 18S-rDNA e da região ITS1-5.8S-ITS2, não descartam a possibilidade dos epistilídeos constituírem um clado interno de Zoothamniidae.

O clado formado por membros dos gêneros *Zoothamnopsis* Song, 1997 e *Myoschiston* Precht, 1935 e as espécies *Zoothamnium nii* Ji et al., 2005 e *Zoothamnium duplicatum* Kahl, 1933 (**Figura 1.1**) ressalta necessidade de se rever validade dos gêneros da família Zoothamniidae, tal como abordado no estudo de CLAMP & WILLIAMS (2006). LI et al. (2008, 2014) sugerem que uma possível explicação para polifilia do gênero *Zoothamnium* pode estar na falta de sincronia entre a taxa de evolução genética e morfológica apresentada pelo grupo.

Nos estudos taxonômicos divergências morfológicas sutis neste grupo tem levado a proposição de novos gêneros, tal como *Myoschiston*. Segundo SUN et al. (2012 b) a única característica que separa representantes de *Myoschiston* e *Zoothamnium* é a presença de um pedúnculo rígido (sem espasmonema) nas colônias maduras de *Myoschiston*. Entretanto, os referidos autores sugerem que *Myoschiston duplicaton* provavelmente seja uma espécie do gênero *Zoothamnium* que possui um desenvolvimento anômalo do pedúnculo, provavelmente perdendo (reversão) espasmonema na base do pedúnculo de colônias maduras, estando em consonância com dados moleculares obtidos no presente estudo (**Figura 1.1**) e em estudos prévios (SUN et al., 2012 b).

#### **4.3. Epistylididae: um clado ou um grado?**

A família Epistylididae possui 12 gêneros, sendo um deles fóssil: *Triadopercularia* Weitschat & Guhl, 1994. Todos possuem trofontes aderidos ao substrato por meio de um pedúnculo rígido e um peristômio do tipo “epistiliforme” (disco peristomial largo e colar peristomial proeminente) (FOISSNER et al., 2009; LYNN, 2008). Dos 11 gêneros atuais,

somente quatro tiveram 18S-rDNA sequenciado: *Campanella* Goldfuss, 1820, *Epistylis* Ehrenberg, 1830 e *Orborhabdostyla* Foissner et al., 2009 (FOISSNER et al., 2009; MIAO et al., 2001, 2004; UTZ et al., 2010).

No presente estudo foram adicionadas novas sequências de sete espécies da família Epistylididae (*Epistylis*, *Orborhabdostyla* e *Rhabdostyla*), ampliando entendimento sobre a relação filogenética entre representantes desta família que apresenta sistemática complexa. As sequências de 18S-rDNA dos gêneros *Epistylis*, *Rhabdostyla* Kent, 1881 e *Orborhabdostyla* se tornam ainda mais relevantes para este grupo visto dificuldade de se elencar características morfológicas que separem estes gêneros. A diferença morfológica mais marcante entre rabdostilídeos e representantes do gênero *Epistylis* é o pedúnculo curto em *Rhabdostyla* e *Orborhabdostyla* (LYNN, 2008), entretanto, estudos sobre biologia de *Epistylis pygmaeum* (Ehrenberg, 1838) Foissner et al., 1999 (GILBERT & SCHRÖDER, 2003) demonstram que estes organismos possuem uma fase do seu ciclo com pedúnculo curto, o que exemplifica a complexidade da sistemática de Epistylididae.

A posição filogenética das espécies *Rhabdostyla inclinans* e *Epistylis nympharum* foi surpreendente visto que seria esperado seu agrupamento entre os epistilídeos e não entre os “vorticelídeos”. Este constitui primeiro estudo demonstrando agrupamento entre peritríqueos com pedúnculo rígido e aparato oral epistiliforme se agrupando entre os “vorticelídeos”, o que ressaltam ainda mais a complexidade da sistemática de Peritrichia, principalmente dentre os epistilídeos.

Com ampliação do número de sequências para o gênero *Epistylis* neste estudo e em topologias obtidas no estudo filogenético podemos sugerir fortemente que este gênero bem como a família Epistylididae constituem claramente um grado e não um clado, tal como observado em estudos prévios (MIAO et al. 2004; UTZ & EIZIRIK, 2007; UTZ et al. 2010; WILLIAMS & CLAMP, 2007). A posição de *Epistylis galea* e *Campanella umbellaria* entre os Operculariida e de *Rhabdostyla inclinans* e *Epistylis nympharum* entre os “vorticelídeos” endossam ainda mais esta hipótese.

A espécie *Orborhabdostyla* sp. 1 encontrada em tanques de bromélia no Brasil se agrupou com *Orborhabdostyla bromelicola*, um “rabdostilídeo” bromelícola com macronúcleo oval (atípico) descrito em bromélias no Equador, corroborando proposta sistemática de FOISSNER et al. (2009) de separar as espécies do gênero *Rhabdostyla* com núcleo oval em um gênero novo. Embora a distância filogenética entre as duas espécies de

*Orborhabdosyla* e *Rhabdostyla inclinans* corroborem esta proposta, são necessárias sequências de mais espécies de “rabdostilídeos” para melhor esclarecer sistemática do grupo.

As sequências de representantes das populações de *Epistylis chrysemydis* e *Epistylis hentscheli* coletadas no Brasil se agruparam com as mesmas espécies coletadas na China em estudos prévios, havendo, entretanto, importante diferença no tamanho de ramos para caso de *E. hentscheli*, ressaltando necessidade de se investir em estudos de genéticas de populações usando outros marcadores moleculares para epistilídeos (**Figura 1.1**).

Os resultados obtidos sobre a posição filogenética dos epistilídeos se agrupando com opercularídeos, zootaminídeos e “vorticelídeos” ressaltam necessidade de se ampliar número de sequências de 18S-rDNA bem como de utilizar outros marcadores moleculares para melhor elucidar validade da família Epistylididae, que por hora parece ser um grupo elaborado com base em características que não refletem divergência morfológica evolutiva.

#### **4.4. “Vorticelídeos”: Vorticellidae + Astylozoidae + Ophrydiidae + Opisthnectidae**

Os membros da família Vorticellidae Ehrenberg, 1838 estão agrupados em 18 gêneros com mais de 200 espécies descritas, podendo ser encontrados em ambientes marinhos, de águas salobras e dulcícolas, e tendo como sinapomorfia a presença de um pedúnculo com espasmonema que possui contração em espiral (LYNN, 2008; WARREN, 1986).

Estudos recentes utilizando sequências do gene 18S-rDNA têm mostrado árvores com membros da família Vorticellidae sendo agrupados em dois clados bem distintos (SUN et al. 2011, 2012 a). O primeiro formado por membros da família Vorticellidae, estando representado pelos gêneros: *Apocharchesium* Ji et al., 2009, *Pseudovorticella* Foissner & Schiffmann, 1975, *Epicharchesium* Jankowski, 1985, *Carchesium* Ehrenberg, 1831 e *Vorticella* Linnaeus, 1767. O segundo reúne membros das famílias Astylozoidae e Opisthnectidae e ainda algumas espécies do gênero *Vorticella* (Vorticellidae). Embora esta separação em dois clados bem distintos tenha sido sugerida por outros autores (SUN et al., 2012 a), não há sugestões de sinapomorfias morfológicas, ecológicas e/ou comportamentais que sustentem esta hipótese, sendo clara necessidade de se investigar tais características, ampliando estudos sobre biologia e microscopia eletrônica de transmissão para estes organismos. O primeiro clado poderia ser definido como possuindo pedúnculo com espasmonema com contração em espiral, entretanto, há representantes no segundo clado com a mesma característica, sugerindo que o gênero *Vorticella* é parafilético. Em estudo detalhado sobre filogenia molecular da família Vorticellidae e validade do gênero *Vorticella*, SUN et al.

(2012) sugeriram denominar o primeiro clado de Vorticellidae *stricto sensu* (pois não contém algumas espécies do gênero *Vorticella*) e o segundo clado formado por membros das famílias Astylozoidae e Opisthnectidae e algumas espécies de *Vorticella* recebeu o nome de Astylozoidae *stricto sensu*.

Embora tenhamos observado a formação dos cladogramas propostos por SUN et al. (2012), com a inclusão de novas sequências, houveram algumas modificações (**Figura 1.1**) tais como a inclusão de representantes das famílias Ophrydiidae (*Ophrydium versatile* (Mueller, 1786) Ehrenberg, 1830) e Epistylididae (*E. nympharum* e *R. inclinans*) no primeiro clado (Vorticellidae *stricto sensu*) proposto por SUN et al. (2012).

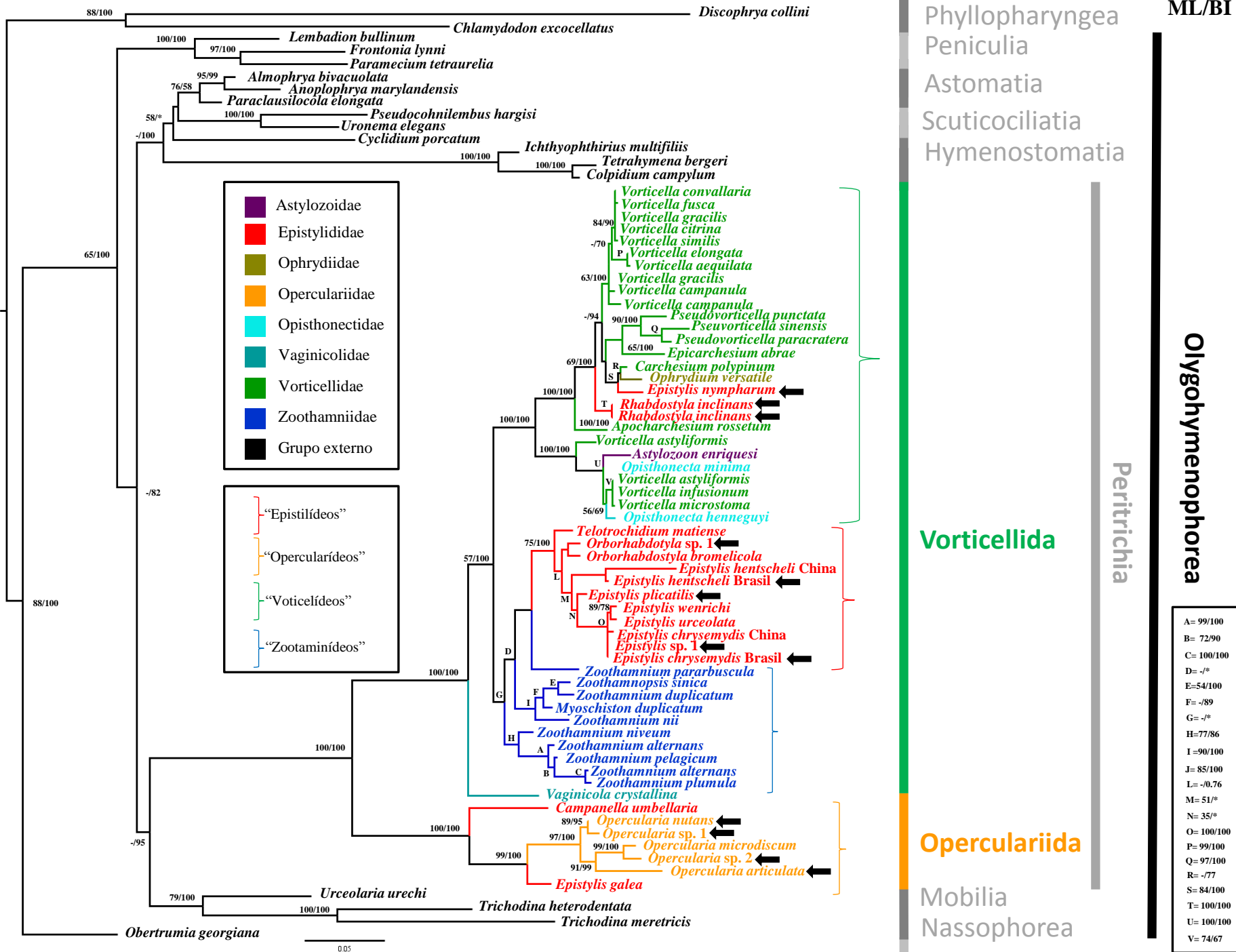
Assim como em estudos anteriores *Ophrydium versatile* (Ophrydiidae) apresentou posição surpreendente (GONG et al., 2006; LI et al., 2008, 2014; MIAO et al., 2004; UTZ & EIZIRIK, 2007, UTZ et al., 2010; WILLIAMS & CLAMP, 2007) ao formar um clado com valor de suporte moderado (84/100) juntamente com *Carchesium polypinum* (Linnaeus, 1758) Ehrenberg, 1830 (Vorticellidae) e *Epistylis nympharum* (Epistylididae). A formação deste clado com a presença de três famílias diferentes conduz a um grande conflito entre sistemática tradicional e filogenia molecular. Este clado reúne organismos que apresentam importantes diferenças na morfologia do pedúnculo, zoóide, aparato oral e no modo de organização da colônia.

A família Ophrydiidae Ehrenberg, 1838 é uma família composta por dois gêneros *Gerda* Claparèd & Lachmann, 1858, zoóides solitários, e *Ophrydium* Bory de St. Vincent, 1824, formado por colônias gelatinosas, sendo a sinapomorfia da família a presença pedúnculos em formas de fibra produzidos pela escópula e vacúolo contrátil, localizado na região aboral, com um longo canal o conectando ao infundíbulo (LYNN, 2008). A família Vorticellidae tendo como sinapomorfia a presença de um pedúnculo com espasmonema que possui contração em espiral (WARREN, 1986; LYNN, 2008). A família Epistylididae possui trofontes aderidos ao substrato por meio de um pedúnculo rígido e peristômio do tipo “epistiliforme” (LYNN 2008; FOISSNER et al., 2009). SUN et al. (2012) afirmam que a falta de sinapomorfias e de características morfológicas devam conduzir a formação de cladogramas baseados em características moleculares, tais como determinar sequências conservadas no gene 18S-rDNA.

## 5. Considerações finais

O agrupamento dos epistilídeos *Epistylis nympharum* e *Rhabdostyla inclinans* entre os “vorticelídeos”, a relação entre epistilídeos e zootaminídeos, e o clado formado pela ordem Operculariida contendo epistilídeos (*Epistylis galea* e *Campanella umbellaria*) e opercularídeos sugerem definitivamente que o gênero *Epistylis* e a família Epistylididae não constituem um grupo natural e que necessita de urgente revisão taxonômica e reforçam ideia de se rever todas características morfológicas usadas para se definir a organização das famílias de subclasse Peritrichia. O clado contendo representantes do gênero *Opercularia* parece representar um grupo natural advindo de um ancestral peritríqueo com área peristomial operculariforme.





ML/BI

Oligohymenophorea

A=	99/100
B=	72/90
C=	100/100
D=	-/*
E=	54/100
F=	-/89
G=	-/*
H=	77/86
I=	90/100
J=	85/100
L=	-0.76
M=	51/*
N=	35/*
O=	100/100
P=	99/100
Q=	97/100
R=	-/77
S=	84/100
T=	100/100
U=	100/100
V=	74/67

**Figura 1.1** Árvore filogenética de Verossimilhança máxima (ML) inferida a partir de sequências do gene 18S-rDNA, contendo 1525 pares de base usando o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+G+I, com configuração mais estrigente. Os valores dos ramos seguem a seguinte ordem: valores de *bootstrap* da análise de verossimilhança máxima (ML) e probabilidade posterior da inferência bayesiana (BI). Letras foram utilizadas em ramos mais internos para melhor visualização dos clados e localização precisa dos valores dos ramos. O traço (-) indica valores de ramos inferiores a 50. O asterisco (\*) indica incongruência na topologia. As setas indicam as 12 sequências incluídas no presente estudo. As chaves com cores representam: a chave laranja representa a família Operculariidae, a chave azul representa a família Zoothamniidae, a chave vermelha representa a família Epistylididae e a chave verde representa os “vorticelídeos” (Família Vorticellidae, Ophrydiidae, Opisthnectidae, Astylozoidae e Epistylididae). A classificação das famílias, classes e subclasses estão representadas por cores e seguem Lynn (2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAMP, J. C.; WILLIAMS, D. A molecular phylogenetic investigation of *Zoothamnium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 494-498, 2006.

CORLISS, J.O. **The ciliated protozoa**. Pergamon Press, London, 455p, 1979.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, p. 772-772, 2012.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET F.; DUFAYARD, J. F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J. M.; GASCUEL, O. Phylogeny.fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 465-469, 2008.

Dias, Roberto Júnio Pedroso. **Taxonomia, Morfologia e Filogenia Molecular de Representantes das Subclasses Peritrichia Stein, 1859 e Mobilia Kahl, 1933 (Protista, Ciliophora, Oligohymenophorea) de Ecossistemas do Sudeste Brasileiro**. 2012. 337f. Tese (Doutorado em Zoologia) Museu Nacional-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DRAGESCO, J.; A. DRAGESCO-KERNÉIS. Ciliés libres de l'Afrique intertropicale. **Faune Tropicale** v. 26, p. 1-559, 1986.

EHRENBERG, C. G. **Die Infusionsthierchen als Vollkommene Organismen**. Leopold Voss, Leipzig, 1838.

FOISSNER, W.; AGATHA S.; BERGER, H. Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha region and the Namib Desert. **Denisia** v. 5, p. 1-1459, 2002.

FOISSNER, W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated Protozoa. **European Journal of Protistology**, v. 27, p. 313-330, 1991.

FOISSNER, W., BERGER, H. & KOHMANN, F. **Taxonomische und ökologische Revision Der Ciliaten des Saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida**. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft., v. 92, p. 1-502, 1992.

FOISSNER, W.; BLAKE, N.; WOLF, K.; BREINER, H. W.; STOECK, T. Morphological and Molecular Characterization of Some Peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from Tank Bromeliads, Including Two New Genera: *Orborhabdostyla* and *Vorticellides*. **Acta Protozoologica**, v. 48, p. 291-319, 2009.

GONG, Y.; XU, K.; ZHAN, Z.; YU, Y.; LI, X.; VILLALOBO, E.; FENG, W. Alpha-tubulin and small subunit rRNA phylogenies of peritrichs are Congruent and do not support the clustering of mobilids and sessilids (Ciliophora, Oligohymenophorea). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, n. 3, v. 5, p. 265-272, 2010.

GONG, Y.-C.; YU, Y.-H.; VILLALOBO, E.; ZHU, F.-Y.; MIAO, W. Reevaluation of the phylogenetic relationship between mobilid and sessilid peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 397-403, 2006.

GUINDON, S.; DUFAYARD, O. J-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704, 2003.

HAUSMANN, K.; HAUSMANN, E. Structural studies on *Trichodina pediculus* (Ciliophora, Peritricha). II. The adhesive disc. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 74, p. 144-155, 1981.

JI, D.; KUSUOKA, Y. A description of *Apocarchesium rosettum* n. gen., n. sp. and a redescription of *Ophrydium eichornii* Ehrenberg, 1838, two freshwater peritrichous ciliates from Japan. **European Journal of Protistology**, v. 45, p. 21-28, 2009.

KAHL, A. **Peritrichia und Chonotricha**, p. 651-885. *In*: Urtiere Oder Protozoa. Deutschlands, G. Fischer, 1935.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, p. 772-780, 2013.

LI, L.; W. SONG. Phylogenetic position of the marine ciliate, *Certesia quadrinucleata* (Ciliophora; Hypotrichia; Hypotrichida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, v. 42, p. 55-61, 2006.

LI, L.; SONG, W.; WARREN, A.; SHIN, M. K.; CHEN, Z.; JI, D.; SUN, P. Reconsideration of phylogenetic positions of five peritrich genera, *Vorticella*, *Pseudovorticella*, *Zoothamnopsis*, *Zoothamnium*, and *Epicarchesium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida) based on small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 448-456, 2008.

LI L.; MA H.; AL-RASHEID K. A. S. Monophyly or polyphyly? Possible conflict between morphological and molecular interpretations of the well-known genus *Zoothamnium* (Ciliophora, Peritrichia). **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 10.1007, 2014.

LOM, J. The morphology and morphogenesis of the buccal ciliary organelles in some peritrichous ciliates. **Archiv für Protistenkunde**, v. 107, p. 131-162, 1964.

LYNN, D.H. **The ciliated Protozoa: characterization, classification and guide to the literature.** 3. ed. Berlin: Springer, p. 428-435, 2008.

LYNN, D.H.; E.B. SMALL. **Phylum Ciliophora Doflein, 1901.** In: Lee, J. J., Bradbury, P. C. & Leedale, G. F. (ed.), *An Illustrated Guide to the Protozoa.* 2nd ed. Lawrence, Kansas. p. 371-656, 2002.

MIAO, W.; YU, Y.-H.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) with emphasis on the genus *Epistylis*, inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 583-587, 2001.

MIAO, W.; FEN, W.-S.; YU, Y.-H.; ZHANG, X.-Y.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51 p. 180-186, 2004.

NORF, H.; W. FOISSNER. A New Flagship Peritrich (Ciliophora, Peritrichida) from the River Rhine, Germany: *Apocarchesium arndti* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v. 57, n. 3, p. 250-264, 2010.

RAABE, Z. Systematics of the family Urceolariidae Dujardin 1841. **Acta Protozoologica**, n. 1, p. 121-138, 1963.

RAMBAUT, A. (2006). Figtree. **Institute of Evolutionary Biology, Univ. of Edinburgh.** Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M; MARK, P. V. D.; AYRES D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

SOMMER, G. Die peritrichen Ciliaten des Großen Plöner Sees. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 44, p. 349-440, 1951.

SUN, P.; CLAMP, J. C.; XU, D. Analysis of the secondary structure of ITS transcripts in peritrich ciliates (Ciliophora, Oligohymenophorea): Implications for structural evolution and phylogenetic reconstruction. **Molecular phylogenetics and Evolution**, n. 56, p. 242-251, 2010.

SUN, P.; CLAMP, J. C.; XU, D.; HUANG, SHIN B. M. K.; TURNER F. An ITS-based phylogenetic framework for the genus *Vorticella*: finding the molecular and morphological gaps in a taxonomically difficult group **Proceedings of The Royal Society**, v. 280 p. 1-11, 2013.

SUN, P.; CLAMP, J. C.; XU, D.; KUSUOKA, Y.; HORI, M. Molecular phylogeny of the family Vorticellidae (Ciliophora, Peritrichia) using combined datasets with a special emphasis on the three morphologically similar genera *Carchesium*, *Epicarchesium* and *Apocarchesium*. **International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology** v. 61, p. 1001-1010, 2011.

SUN, P.; CLAMP J. C.; XU, D.; KUSUOKA, Y; MIAO, W. *Vorticella* Linnaeus, 1767 (Ciliophora, Oligohymenophora, Peritrichia) is a grade not a clade: redefinition of *Vorticella* and the Families Vorticellidae and Astylozoidae using molecular characters derived from the gene coding for small subunit ribosomal RNA. **Protist**, v. 163, p. 129-142, 2012 a.

SUN, P.; XU, D.; CLAMP J. C.; SHIN, M. K. Molecular and morphological characterization of a poorly known marine ciliate, *Myoschiston duplicatum* Precht, 1935: implications for phylogenetic relationships between three morphologically similar genera *Zoothamnium*, *Myoschiston*, and *Zoothamnopsis* (Ciliophora, Peritrichia, Zoothamniidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, p. 163-170, 2012 b.

STRÜDER-KYPKE, M. C.; WRIGHT, A.-G.; FOKIN, S. I.; D.H. LYNN. Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.47, p. 419-429, 2000.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

WARREN A. A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). **Bulletin of the British Museum of Natural History**, v. 50, p. 1-57, 1986.

UTZ, L. R. P.; EIZIRIK, E. Molecular phylogenetics of Sub-Class Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 303-305, 2007.

UTZ, L. R. P. Attachment of the peritrich epibiont *Zoothamnium intermedium* Precht, 1935 (Ciliophora, Peritrichia) to artificial substrates in a natural environmental. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 795-798, 2008.

UTZ, L. R. P.; SIMÃO, T. L. L.; SAFI, L. S. L.; EIZIRIK, E. Expanded phylogenetic representation of genera *Opercularia* and *Epistylis* sheds light on the evolution and higher level taxonomy of peritrich ciliates (Ciliophora: Peritrichia). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 415-420, 2010.

WILBERT, N. Eine verbesserte Technik der Protargolimprägation für Ciliaten. **Mikrokosmos**, v. 64, p. 171-179, 1975.

WILLIAMS, D.; CLAMP, J. C. A molecular phylogenetic investigation of *Opisthonecta* and related genera (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 317-323, 2007.

ZHAN, Z., XU, K., WARREN, A.; GONG, Y. Reconsideration of phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences, with the establishment of a new subclass Mobilia Kahl, 1933. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 552-558, 2009.



## **ANEXO 1.1:Protocolo de Extração de DNA**

### **Protocolo de extração de DNA com o *Kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen).**

- 1- Fixar os protozoários em álcool absoluto em um **microtubo de 1,5 mL**.
- 2- Precipitar os ciliados a aproximadamente **5.000 rpm por 3 minutos** em centrífuga.
- 3- Retirar o máximo possível de álcool, de preferência tudo, esvaziando o conteúdo sobrenadante do microtubo na pia.
- 4- Adicionar no microtubo **180 µL do tampão ATL**.
- 5- Adicionar **20 µL da Proteinase K** e misturar (utilize vortex®) por 10 segundos.
- 6- Incubar em banho-maria em temperatura de **56 °C por 60 minutos**.
- 7- Após 60 minutos, misturar (utilize vortex®) por 15 segundos.
- 8- Adicionar **200 µL de tampão AL** e logo depois adicionar **200 µL de Etanol absoluto** e misturar (utilize vortex®) **por 15 segundos**.

**OBS:** É de extrema importância que o **tampão AL** e o **álcool absoluto** sejam colocados um após o outro. Ao fazer várias extrações ao mesmo tempo, pode-se colocar o tampão AL e o Álcool a ser utilizado em todas as amostras em um único microtubo vazio (estéril) e posteriormente distribuir a solução a cada microtubo de 1,5 mL contendo as amostras que serão extraídas.

- 9- Separe para o passo **10** um **tubo coletor de 2 mL** e **uma coluna** (disponíveis no *Kit*). A **coluna** contendo a **membrana** deve ser inserida no tubo coletor de 2 mL.
- 10- Retire todo o líquido do **microtubo de 1,5 mL** e coloque na **coluna**, exatamente sobre a membrana, cuidadosamente, evitando perfurá-la.
- 11- Centrifugue a **8.000 rpm por 1 minuto**.
- 12- Jogue fora o líquido no fundo do **tubo coletor** e coloque a coluna em um **novo tubo coletor**.
- 13- Adicione **500 µL de tampão AW1** sobre a membrana da coluna e centrifugue a **8.000 rpm por 1 minuto**.
- 14- Jogue fora o líquido junto com o **tubo coletor**.
- 15- Coloque a **coluna com a membrana** em um **novo tubo coletor**.
- 16- Adicione **500 µL de tampão AW2** à membrana da coluna e centrifugue a **14.000 rpm por 3 minutos** para secar a membrana. Jogue fora o **tubo coletor** junto ao líquido.
- 17- Coloque um novo tubo coletor e **repita** a centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos, garantindo que a membrana contida na coluna fique bem seca.

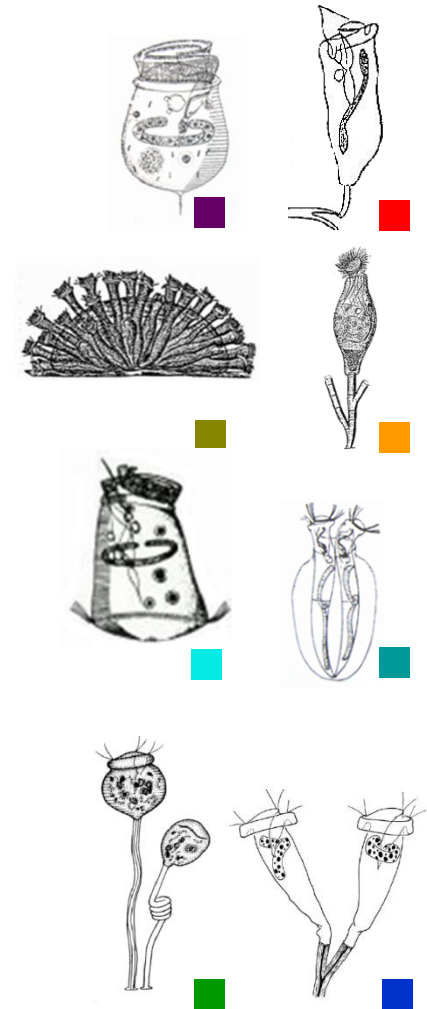
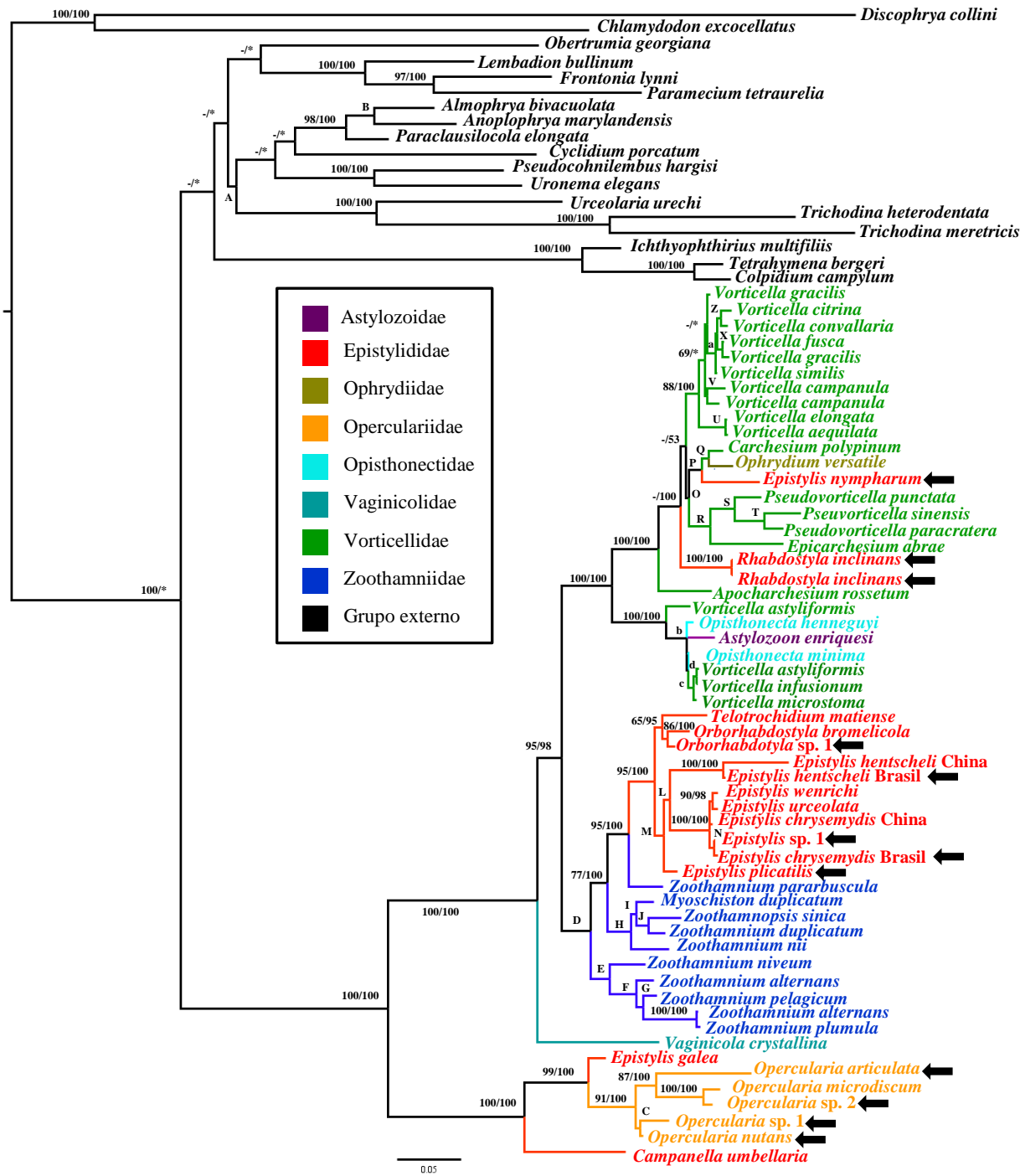
- 18- Coloque a coluna em um microtubo de **1,5 mL** e coloque na coluna **50 µL do tampão AE**. Deixe aguardando na bancada por 1 minuto e, após, centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.
- 19- Guarde o microtubo de 1,5 mL com o DNA extraído dentro do freezer a -20°C.

**ANEXO 1.2: Sequências do gene 18S-rDNA  
utilizadas no presente estudo**

Espécies	Subclasse	Classe	Nº acesso GenBank	Comp. (pb)
<i>Astylozoon enriquesi</i>	Peritrichia (n=56)	Oligohymenophorea (=70)	AY049000	1603
<i>Apocarchesium rosettum</i>			GU987030	1674
<i>Campanella umbellaria</i>			AF401524	1690
<i>Carchesium polypinum</i>			GU187054	1681
<i>Epicarchesium abrae</i>			DQ190462	1737
<b>Epistylis chrysemydis Brasil</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1549</b>
<i>Epistylis chrysemydis</i> China			AF335514	1727
<i>Epistylis galea</i>			AF401527	1746
<b>Epistylis hentscheli Brasil</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1578</b>
<i>Epistylis hentscheli</i> China			AF335513	1729
<b>Epistylis nymphaeum</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1548</b>
<b>Epistylis sp. 1</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1510</b>
<i>Epistylis urceolata</i>			AF335516	1726
<i>Epistylis werrichi</i>			AF335515	1723
<b>Epistylis plicatilis Brasil</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1509</b>
<i>Myoschiston duplicatum</i>			JN836351	1696
<b>Opercularia articulata</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1523</b>
<i>Opercularia microdiscum</i>			AF401525	1743
<b>Opercularia nutans</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1539</b>
<b>Opercularia sp.1 (Alga)</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1556</b>
<b>Opercularia sp.2 (minuta)</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1558</b>
<i>Ophrydium versatile</i>			AF401526	1727
<i>Opisthonecta henneguyi</i>			X56531	1730
<i>Opisthonecta minima</i>			EF417834	1721
<i>Orborhabdostyla bromelicola</i>			GQ872428	1735
<b>Orborhabdostyla sp.1 Brasil</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1522</b>
<i>Pseudovorticella paracratera</i>			DQ662847	1650
<i>Pseudovorticella punctata</i>			DQ190466	1754
<i>Pseudovorticella sinensis</i>			DQ845295	1650
<b>Rhabdostyla inclinans 1</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1507</b>
<b>Rhabdostyla inclinans 2</b>			<b>Nova sequência</b>	<b>1507</b>
<i>Telotrochidium matiense</i>			EF417835	1651
<i>Vaginicola crystallina</i>			AF401521	1728
<i>Vorticella aequilata</i>			JN120210	1542
<i>Vorticella astyliformis</i>			JN120204	1541
<i>Vorticella campanula</i>			JN120251	1542
<i>Vorticella campanula</i>			JN120222	1542
<i>Vorticella citrina</i>			JN120225	1542
<i>Vorticella convallaria</i>			JN120227	1542
<i>Vorticella elongata</i>			JN120217	1542
<i>Vorticella fusca</i>			DQ190468	1733
<i>Vorticella gracilis</i>			GQ872429	1734
<i>Vorticella gracilis</i>			JN120233	1543
<i>Vorticella infusionum</i>			JN120203	1541
<i>Vorticella microstoma</i>			DQ868347	1726
<i>Vorticella similis</i>			JN120235	1542
<i>Vorticella astyliformis</i>			GQ872427	1729
<i>Zoothamnium alternans</i>			DQ868352	1720
<i>Zoothamnium alternans</i>			DQ662850	1732
<i>Zoothamnium duplicatum</i>			DQ662851	1651
<i>Zoothamnium nii</i>			DQ662852	1651
<i>Zoothamnium niveum</i>			DQ868350	1690
<i>Zoothamnium parabuscula</i>			DQ662853	1651
<i>Zoothamnium pelagicum</i>			DQ868351	1731
<i>Zoothamnium plumula</i>			DQ662854	1731
<i>Zoothamnopsis sinica</i>			DQ190469	1733
<b>Lembadion bullinum</b>			<b>AF255358</b>	<b>1746</b>
<i>Frontonia lynni</i>			DQ190463	1747
<i>Paramecium tetraurelia</i>			X03772	1753
<i>Pseudocohnilembus hargisi</i>			AY212806	1753
<i>Uronema elegans</i>			AY103190	1757
<i>Colpidium campylum</i>			X56532	1754
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>			U17354	1747
<i>Tetrahymena bergeri</i>			AF364039	1748
<i>Trichodina meretricis</i>			FJ499387	1721
<i>Trichodina heterodontata</i>			AY788099	1698
<i>Urceolaria urechi</i>			FJ499388	1696
<i>Almophrya bivacuolata</i>			HQ446281	1680
<i>Anoplophrya marylandensis</i>			AY547546	1753
<i>Paraclausilocola elongata</i>			HQ446274	1749
<i>Chlamydonon excocellatus</i>	AY331790	1662		
<i>Discophrya collini</i>	L26446	1678		
<i>Obertruria georgiana</i>	grupo externo	Phyllopharyngea (n=2)	X65149	1765
	grupo externo	Nassophorea (n=1)		



**Anexo 1.3** Árvore filogenética de inferência Bayesiana (BI) inferida a partir de sequências do gene 18S-rDNA, contendo 1525 pares de base usando o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+G+I, com configuração padrão (“sequência integral”). Os valores dos ramos seguem a seguinte ordem: valores da probabilidade posterior e de *bootstrap* da análise de verossimilhança máxima (ML). Letras foram utilizadas em ramos mais internos para melhor visualização dos clados e localização precisa dos valores dos ramos. O traço (-) indica valores de ramos inferiores a 50. O asterisco (\*) indica incongruência na topologia. As setas indicam as 12 sequências incluídas no presente estudo. A classificação das famílias, classes e subclasses estão representadas por cores e seguem Lynn (2008).



A=	-/*
B=	77/100
C=	62/87
D=	95/100
E=	90/100
F=	97/100
G=	75/95
H=	98/100
I=	65/85
J=	76/100
L=	69/93
M=	67/98
N=	91/99
O=	-/83
P=	59/100
Q=	79/90
R=	56/100
S=	87/100
T=	100/100
U=	100/100
V=	-/*
X=	74/99
Z=	-/94
a=	62/*
b=	89/*
c=	83/100
d=	81/100

0.05



**Anexo 1.4.** Árvore filogenética de Verossimilhança máxima (ML) inferida a partir de sequências do gene 18S-rDNA, contendo 1525 pares de base usando o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+G+I, com configuração menos estrigente. Os valores dos ramos seguem a seguinte ordem: valores de bootstrap da análise de verossimilhança máxima (ML) e probabilidade posterior. Letras foram utilizadas em ramos mais internos para melhor visualização dos clados e localização precisa dos valores dos ramos. O traço (-) indica valores de ramos inferiores a 50. O asterisco (\*) indica incongruência na topologia. As setas indicam as 12 sequências incluídas no presente estudo. A classificação das famílias, classes e subclasses estão representadas por cores e seguem Lynn (2008).

## SEÇÃO 2

### ***Rhabdostyla inclinans* (CILIOPHORA, PERITRICHIA) EPIBIONTE DE *Aeolosoma hemprichi* (OLIGOCHAETA, AEOLOSOMATIDAE) EM BROMÉLIAS NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR E POSIÇÃO FILOGENÉTICA SURPREENDENTE.**

#### **RESUMO**

Neste estudo foi discutida pela primeira vez a posição filogenética de um representante do gênero *Rhabdostyla* dentro da subclasse Peritrichia e apresentada uma caracterização multidisciplinar da espécie *Rhabdostyla inclinans*, registrada pela primeira vez sobre anelídeos Aeolosomatidae e em ambientes bromelícolas. Este ciliado se agrupou entre os peritríqueos vorticelídeos (Vorticellidae) com base em informação do gene ribossomal 18S-rDNA, o que refuta a classificação tradicional deste gênero como um epistilídeo (Epistylididae) baseada em caracteres morfológicos. Os resultados moleculares ressaltam necessidade de se ampliar número de sequências de espécies do gênero *Rhabdostyla* nos bancos de dados genéticos para melhor entendimento da relação evolutiva entre representantes dos gêneros *Rhabdostyla* e *Epistylis*, bem como sugere que a similaridade morfológica entre os zoóides destes gêneros podem representar convergência evolutiva baseada no modo de vida epibionte de grande parcela dos representantes destes gêneros.

Palavras-chave: 18S-rDNA; ambiente bromelícola; caracteres morfológicos; convergência evolutiva; filogenia de Peritrichia

## INTRODUÇÃO

*Rhabdostyla* Kent, 1881 é um gênero (Peritrichia: Epistylididae) criado para agrupar organismos solitários que possuem pedúnculo rígido, não contrátil (sem mionemas) e curto. Este gênero é composto por aproximadamente 32 espécies válidas. As espécies do atual gênero *Rhabdostyla* descritas antes de 1881 foram agrupadas no gênero *Epistylis* Ehrenberg, 1830. Entretanto, em 1881, Kent criou o gênero *Rhabdostyla* com a descrição de quatro novas espécies e a inclusão de três espécies do gênero *Epistylis*, contudo não foi designada espécie-tipo para este gênero. Esta divisão foi baseada nos mesmos critérios feitos para a diferenciação entre os gêneros *Carchesium* e *Vorticella*, utilizando o hábito colonial como marcador morfológico. Assim sendo, as espécies coloniais foram agrupadas no gênero *Epistylis*, enquanto que as solitárias agruparam-se no gênero *Rhabdostyla*. A revisão mais completa do gênero foi realizada por KAHL (1935) que compilou informações sobre 27 espécies. Embora novas espécies deste gênero tenham sido descritas após a publicação de KAHL (1935) a maioria das descrições se baseia em poucos caracteres morfológicos observados *in vivo* (NENNINGER, 1948; PRECHT, 1935; RIGHI, 1973), havendo poucos estudos morfológicos com descrições baseadas em informações de espécimes impregnados pela prata (ÁLVAREZ-CAMPOS et al., 2014; FOISSNER, 1979; SONG, 1986). Recentemente, FOISSNER et al. (2009) propuseram criação do gênero *Orborhabdostyla* para incluir rhabdostilídeos com núcleo oval.

O atual status taxonômico da espécie *Rhabdostyla inclinans* (Müller, 1773) Roux, 1901 foi revisado por FOISSNER et al. (1992). Este ciliado foi originalmente descrito como *Vorticella inclinans*, e, posteriormente, incluído no gênero *Rhabdostyla* por Roux (1901), tendo como sinônimas *Rhabdostyla chaeticola* Stokes, 1887 e *Rhabdostyla lumbriculi* Penard, 1922 (FOISSNER et al., 1992; KAHL, 1935). Esta espécie foi incluída por GHUL (1972) no gênero *Opercularia*, entretanto, FOISSNER et al. (1992) ressaltam que esta proposta não foi suficientemente justificada. As sinônimas e a falta de dados morfológicos, ecológicos e moleculares para *R. inclinans* ressaltam a necessidade da caracterização multidisciplinar deste micro-organismo. *R. inclinans* tem sido relatado como epibionte das cerdas e epiderme de anelídeos encontrados em ambientes lóticos, lênticos, de água salgada ou dulcícola e artificiais, apresentando ampla distribuição mundial (FOISSNER et al., 1992).

Estudos sobre *Rhabdostyla* utilizando técnicas ciliatológicas de impregnação pela prata (ÁLVAREZ-CAMPOS et al., 2014; FOISSNER, 1979; SONG, 1986) e caracterização molecular são escassos na literatura (SUN et al., 2010). Dentre as dificuldades para o estudo desses ciliados destacam-se a distribuição agregada nos ecossistemas, dificuldade de cultivo, suas menores dimensões quando comparados à maioria dos representantes da subclasse Peritrichia e o fato de apresentarem íntima associação com os seus basibiontes. Devido à maioria das espécies do gênero *Rhabdostyla* ter sido descrita apenas com base em informações dos ciliados *in vivo* e visto ausência de informações de sequências do 18S-rDNA para ciliados deste táxon, alguns autores ressaltam necessidade de se ampliar dados acerca da morfologia, ecologia e dados moleculares deste grupo para melhor entendimento das características que realmente refletem divergência evolutiva dentro de Peritrichia (FOISSNER et al., 2009; SUN et al., 2010), bem como detectar aquelas que são fruto de convergência evolutiva. Assim sendo, nosso estudo objetivou realizar uma caracterização multidisciplinar de *R. inclinans* baseada em dados moleculares, morfológicos e ecológicos, bem como contribuir para melhor entendimento sobre a filogenia interna de Peritrichia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Coleta e processamento das amostras:**

A população de *Rhabdostyla inclinans* caracterizada neste estudo foi encontrada colonizando as cerdas de *Aeolosoma hemprichi* Ehrenberg, 1831 (Annelida, Aeolosomatidae) em tanques da bromélia *Alcantarea imperialis* no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (21°46'38.77"S; 43°22'13.90"W). Amostras de 100 mL de água do tanque foram coletadas com auxílio de pipeta de acrílico graduada com borracha de látex para sucção e foram acondicionadas em tubos para centrífuga de fundo cônico de 50 mL. Os tubos foram transportados ao laboratório localizado próximo (500 m) ao local de coleta. No laboratório as amostras foram acondicionadas em placas de Petri, onde os anelídeos encontrados foram observados e isolados com auxílio de um estereomicroscópio com objetivo de avaliar a presença ou ausência dos epibiontes. Durante este processo de avaliação, os anelídeos com epibiontes foram triados para realização da caracterização multidisciplinar dos peritríqueos. Os peritríqueos

utilizados na caracterização molecular foram raspados e isolados dos hospedeiros, enquanto que aqueles utilizados na caracterização morfológica foram mantidos sobre as cerdas do hospedeiro para evitar perdas durante o processamento do material. O conceito de caracterização multidisciplinar segue a abordagem apresentada por ROSATI et al. (2004).

### **Caracterização morfológica:**

Os anelídeos isolados em estereomicroscópio foram colocados entre lâmina e lamínula com água do local de coleta para observação dos ciliados epibiontes *in vivo* sob microscópio Olympus BX51 com contraste interferencial diferencial (DIC) em aumentos de 200x, 400x e 1000x. Após observação dos ciliados *in vivo*, uma parcela da amostra foi fixada em bouin e formalina 4% para realização das técnicas do protargol (WILBERT, 1975) e carbonato de prata (FOISSNER, 1991), respectivamente (**Anexo 2.1 e 2.2; p. 109 e 112**); outra parcela foi fixada segundo SILVA-NETO (1994) para realização da microscopia eletrônica de varredura, e outra parcela dos ciliados epibiontes foi fixada em etanol absoluto para estudo molecular. Para observação do formato e posição do aparato nuclear alguns ciliados foram corados com verde de metila conforme sugerido por DEHORITY (1984). O processamento das amostras para realização da microscopia eletrônica de varredura foi realizado conforme SILVA-NETO et al. (2012). Foi realizado estudo morfométrico de *R. inclinans* com base em fotomicrografias de espécimes *in vivo* (n=26) usando o programa Image-pro plus 5.0 Olympus®. Todas as medidas foram dadas em micrômetros e seguem os caracteres propostos por UTZ (2007) e UTZ et al. (2008). A quantificação das estrias peliculares foi realizada usando o programa Image-pro plus 5.0 Olympus® com base em fotomicrografias *in vivo* (n=8) retiradas em aumento de 1000x.

O hospedeiro, *Aeolosoma hemprichi*, foi identificado de acordo com BRINKHURST & MARCHESE (1992).

### **Parâmetros ecológicos:**

Foram quantificados em microscópio com contraste interferencial diferencial em aumento de 200x (DIC) o número de segmentos de cada anelídeo e a abundância de ciliados epibiontes presentes nos lados esquerdo e direito de cada um dos 51 hospedeiros amostrados. Os anelídeos Aeolosomatidae não possuem septos intersegmentares (DI PERSIA, 1976), entretanto, foi

possível reconhecer número de segmentos nestes anelídeos pela inserção das cerdas (HERLANT-MEEWIS, 1950).

A correlação de Pearson entre o número de segmentos e a quantidade de protozoários foi feita no programa STATISTICA versão 7.1 (2005), visto que os dados apresentavam distribuição normal. A prevalência, intensidade média, índice de discrepância e amplitude de infestação foram calculados a partir do programa Quantitative Parasitology 3.0 (ROZSA et al., 2000). Os conceitos de prevalência e intensidade média seguem os preceitos propostos por BUSH et al. (1997) e o índice de discrepância foi calculado de acordo com POULIN (1993). Foi investigada homogeneidade na distribuição dos ciliados entre os lados direito e esquerdo sobre os anelídeos por meio do Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), visto que os dados não apresentam distribuição normal. Os testes foram realizados no programa “Paleontological statistics software package for education and data analysis” (PAST) (HAMMER et al., 2001).

### **Caracterização molecular: extração de DNA, PCR e análises filogenéticas:**

Os anelídeos com elevada taxa de infestação foram triados para uma saleira contendo água mineral esterilizada e os ciliados foram raspados das cerdas com agulha de acupuntura, triados para outras saleiras, sob microscópio estereoscópio, e lavados por 5x em água mineral esterilizada. Após as etapas de lavagem, os ciliados foram fixados em etanol absoluto e mantidos em tubos de 1,5 mL para posterior realização da extração de DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit DNeasy® Blood and Tissue Qiagen (2006), seguindo as orientações do fabricante para extrações de tecidos animais. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  (**Anexo 2.3; p. 115**).

As reações de amplificação das sequências de 18S-rDNA foram realizadas em termociclador “Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700”, em eppendorfs de 200 $\mu\text{L}$ , em um volume final de 50 $\mu\text{L}$ , contendo: 39,8 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 5 $\mu\text{L}$  de tampão 10X; 1,5 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM); 0,5 $\mu\text{L}$  de DNTP (25mM); 1,0 $\mu\text{L}$  de cada iniciador (50 $\mu\text{M}$ ); 0,25 $\mu\text{L}$  de Taq Platinum® DNA polimerase (Invitrogen) (5U/ $\mu\text{L}$ ); e 1,0 $\mu\text{L}$  de DNA genômico purificado.

Os parâmetros de ciclagem foram os seguintes: um ciclo de  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min; 35 ciclos de:  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos; terminando com um ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos. Foram utilizados os iniciadores específicos Peri\_57F (5`CAT GCA TGT

GTA AGT ATA AGT A) e Peri\_1385R (5`CGG TGT GTA CAT TTT GC) desenhados para Peritrichia por DIAS (2012) para amplificação de sequências do 18S-rDNA de *R. inclinans*.

As reações de sequenciamento foram montadas empregando-se produtos de pelo menos quatro reações de PCR purificados para cada espécie de peritríqueo, utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” Qiagen (2006). Para as reações padrão de sequenciamento foram utilizados 5–100 ng de DNA e 3,2 pmoles de iniciadores internos a sequência de interesse em um volume máximo de 7,0 µL. Os iniciadores utilizados para o completo sequenciamento do amplicon foram: Peri\_396R (5`- GAG AGT TGT TAT TTC TTG TC); Peri\_975F (5`- GGA AAC TCA TCA GGG CAA) e Peri\_1042R (5`- TGC ACC ACC ACT AGA CC) (DIAS, 2012). Os sequenciamentos foram realizados na Unidade Multidisciplinar de Genômica do IBCCF - UFRJ em sequenciador automático de DNA ABI 3130xl. Os produtos dos sequenciamentos foram editados manualmente utilizando o programa Geneious 6.0 (Biomatters Limited).

As sequências do SSU rDNA utilizadas a partir do conjunto de dados do GenBank incluídas na análise filogenética estão listadas no material suplementar (**Anexo 2.4; p. 118**). Sendo utilizados como grupo externo: as classes Phyllopharyngea de Puytorac et al., 1974 (n=2), Nassophorea Small & Lynn, 1981 (n=1) e dentro da Classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974 foram escolhidos três ciliados das cinco subclasses que a compõe: Scuticociliatia Small, 1967, Hymenostomatia Delage & Hèrouard, 1896, Mobilis (Kahl, 1933) Zhan et al. 2009 e Peniculia Faurè-Fremiet in Corliss, 1956. Na subclasse Peritrichia foram utilizadas 44 sequências. Todas as sequências foram selecionadas seguindo os critérios: tamanho (maior do que 1500 pares de base) e confiabilidade. As sequências foram alinhadas pelo programa MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATO & STANDLEY, 2013), levando em consideração a estrutura secundária do RNA. A edição das sequências foi feita manualmente no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Após a remoção de sítios de natureza ambígua e sequências dos iniciadores, o alinhamento foi editado de modo que todas as sequências tenham o mesmo tamanho. Após este processo o alinhamento foi curado utilizando o Gblocks (v0.91b) selecionando uma análise dos sítios conservados mais restrigente. A escolha do melhor modelo evolutivo para as análises filogenéticas foi feita tendo como base o indicado pelo (jModelTest 2.1.4.) (DARRIBA et al., 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003). A análise Bayesiana foi realizada no programa Mr Bayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012) usando o Modelo evolutivo GTR + I + G, através de 1.000.000 de gerações e um “burn in” de 25%. A análise de verossimilhança

Máxima (ML) foi realizada utilizando o mesmo modelo evolutivo utilizado anteriormente na bayesiana, no servidor online Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>, DEREPPER et al., 2008). O suporte estatístico dos ramos foi avaliado pelo método do *Bootstrap* (1000 pseudo-réplicas). As árvores produzidas foram analisadas no programa Figtree 1.4.0 (RAMBAUT, 2006). A árvore utilizada em nosso trabalho foi a da análise Bayesiana, apresentando topologia similar com árvore da análise de verossimilhança máxima (**Figura 1.2; p. 95**). A caracterização molecular das sequências utilizadas foi feita no programa Geneious 6.0 (Biomatters Limited).

## RESULTADOS

### **Morfologia:**

**Diagnose:** rabdostilídeo de água doce epibionte de *Aeolosoma hemprichi*; zoóides cilíndricos medindo em torno de 44–55 x 11–16  $\mu\text{m}$  *in vivo*; pedúnculo curto medindo em média 1,8  $\mu\text{m}$  de largura e 1,7  $\mu\text{m}$  em comprimento, sem mionemas. Zoóide com inclinação na região da escópula sempre na porção dorsal. Único vacúolo contrátil, posicionado abaixo do colar peristomial, ventralmente na base do infundíbulo bucal do zoóide. Película com estriações crípticas transversais, variando em torno de 44–62 estrias. Disco peristomial estreito é ligeiramente pedunculado com superfície lisa quase plana. Macronúcleo cilíndrico em forma de “C” ao longo de quase todo corpo, começando ventralmente na base do colar peristomial e terminando no início da região da escópula, apresentando duas extremidades globosas: posterior e anterior e micronúcleo circular próximo da extremidade globosa anterior do macronúcleo.

**Localidade:** tanque da bromélia *Alcantarea imperialis* no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (21°46'38.77"S; 43°22'13.90"W).

### **Morfologia:**

A população de *Rhabdostyla inclinans* encontrada em tanques de bromélia possui a seguinte caracterização morfológica (**Tabela 1.2; p. 83**): dimensão corporal 44–55 x 11–16  $\mu\text{m}$ ,



possuindo em média 49 x 14  $\mu\text{m}$  *in vivo*. Razão entre comprimento e largura 3,4:1; zoóide cilíndrico e contrátil tanto no terço superior quanto no terço inferior, apresentando dobras durante a contração da região posterior (**Prancha 1.2 E; p. 98**), com inclinação típica na região da escópula, sempre na região dorsal (**Prancha 1.2 A**); zoóide com região dorsal e ventral distintas, sendo a dorsal a região do disco peristomial e a ventral a região do infundíbulo (**Prancha 1.2 C**); zoóide afilado na região posterior (**Prancha 1.2 B**); membrana epistomial bem pronunciada medindo em torno de 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4  $\mu\text{m}$  de largura em sua base (**Prancha 1.2 A**); ciliatura oral medindo aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  de comprimento (**Prancha 1.2 D**); colar peristomial é ligeiramente mais largo do que o corpo com uma espessura muito fina, medindo em torno de 16,4  $\mu\text{m}$  de largura e em torno de 2,2  $\mu\text{m}$  de espessura (**Prancha 1.2 A**); o disco peristomial estreito é ligeiramente pedunculado com superfície lisa quase plana, medindo em torno de 8,4  $\mu\text{m}$  (**Prancha 1.2 D**); possui um único vacúolo contrátil com diâmetro médio de 4,3 e posicionado abaixo do colar peristomial, ventralmente na base do infundíbulo bucal do zoóide (**Prancha 1.2 C**); vacúolos alimentares localizados na região equatorial do organismo medindo em torno de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (**Prancha 1.2 C**); organismos impregnados pela prata apresentaram macronúcleo cilíndrico em forma de C ao longo de quase todo corpo com extremidades globosas: posterior e anterior e micronúcleo circular ao lado da extremidade globosa anterior do macronúcleo (**Prancha 1.2 G**); película com estriações crípticas transversais, variando de 44–62 *in vivo* (n=7 zoóides, **Prancha 1.2 C**); pedúnculo não ramificado, muito curto (n=989), medindo em média 1,8  $\mu\text{m}$  de largura, sem mionemas (**Prancha 1.2 F**); epibionte de anelídeos do gênero *Aeolosoma* (Annelida, Aeolosomatidae) e foi observado em *Nais* sp. uma única vez, não sendo encontrado em outro tipo de substrato no tanque da bromélia (**Prancha 1.2 B**).

### **Parâmetros ecológicos:**

Pela primeira vez, um peritríqueo do gênero *Rhabdostyla* foi encontrado em bromélias. Ainda constitui primeiro registro de *R. inclinans* para a América do Sul, assim como o primeiro relato como epibionte de *Aeolosoma hemprichi* em ambiente bromelícola.

A prevalência foi de 100% de um total de 51 hospedeiros analisados. A intensidade média de protozoários por hospedeiro foi de 18,9. A amplitude de infestação por hospedeiro variou de 1–76 epibiontes. O índice de discrepância foi de 0.393, sugerindo distribuição relativamente

uniforme dos epibiontes sobre a população de hospedeiros investigada. O sítio de localização de *R. inclinans* estava associado a porção serrilhada das cerdas do *Aeolosoma hemprichi*. A abundância de ciliados epibiontes nos lados esquerdo (49,55% do total) e direito (50,45% do total) foi semelhante, não tendo sido registrada diferença estatística (U = 1292,5; p = 0,9599). Quanto maior o número de segmentos maior quantidade de protozoários observada (r=0.43; p<0.01).

**Tabela 1.2:** Caracterização morfométrica de *Rhabdostyla inclinans* (Müller, 1773) Roux, 1901 epibionte de *Aeolosoma hemprichi* Ehrenberg, 1831. Valores em µm.

<b>Caracteres</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>M</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CV</b>	<b>n</b>
Comprimento do zoóide (disco peristomial ao fim da região aboral)	44,0	55,0	49,6	3,1	0,6	0,1	26
Comprimento de zoóide (colar péristomial ao fim da região aboral)	41,0	59,0	46,7	4,0	0,8	0,1	26
Largura do zoóide(sob colar peristomial)	11,0	16,0	14,7	1,3	0,3	0,1	26
Largura do zoóide (no ponto médio entre as regiões oral e aboral)	12,0	20,0	15,8	2,0	0,4	0,1	26
Largura do colar peristomial	14,0	18,0	16,4	1,3	0,2	0,1	26
Espessura do colar peristomial	1,0	3,0	2,2	0,6	0,1	0,3	26
Largura do disco peristomial	7,0	10,0	8,4	0,8	0,2	0,1	26
Largura da escópula	5,0	10,0	8,1	1,3	0,3	0,2	18
Largura do pedúnculo	1,0	3,0	1,8	0,6	0,2	0,4	10
Diâmetro do vacúolo alimentar	2,0	6,0	4,0	0,9	0,2	0,2	23
Diâmetro do vacúolo contrátil	3,0	7,0	4,3	1,0	0,2	0,2	26

Legenda: Min = valor mínimo; Max = valor máximo; M= média aritmética; DP = desvio padrão; EP = erro padrão; CV = coeficiente de variação; n = número de espécimes amostrados.

### **Caracterização molecular e Posição filogenética:**

Não houve diferença entre as duas sequências obtidas para *R. inclinans*. A caracterização das sequências, antes da edição no programa Mega, foram as seguintes: um total de 1507 pares de base; composição nucleotídica de G + C igual a 42.6% e de T + A igual a 57.4%; a frequência nucleotídica de cada base nitrogenada foi: A- 0,284 T- 0,289, G- 0,178 e C- 0,247. A caracterização da sequência após a edição foi: composição nucleotídica de 1444 pares de base;

conteúdo de G + C de 43.1% e de T + A igual 56.9%; A quantidade de cada base nitrogenada foi: A- 28.6%, T- 28.1%, G- 25% e C- 18%.

Pela primeira vez a sequência do gene 18S-rDNA de uma espécie do gênero *Rhabdostyla* foi obtida, permitindo testar a relação deste gênero com outros gêneros da subclasse Peritrichia.

A topologia final das árvores inferidas com base em dois métodos de reconstrução filogenética (inferência bayesiana e verossimilhança máxima) foi similar, havendo poucos pontos de incongruência. A população de *R. inclinans* de tanques bromelícolas se agrupou entre os peritríqueos vorticelídeos (Vorticellidae sensu SUN et al., 2012) como grupo irmão de um clado que engloba os gêneros *Vorticella*, *Carchesium*, *Ophrydium*, *Epicarchesium* e *Pseudovorticella* (**Figura 1.2; p. 95**).

## DISCUSSÃO

### **Morfologia:**

*Rhabdostyla inclinans* foi descrito originalmente como *Vorticella inclinans* (Müller, 1773) e teve seu status taxonômico revisado por FOISSNER et al. (1992). De acordo com esta revisão os vários nomes estabelecidos para *R. inclinans*, tal como *Rhabdostyla chaeticola* Stokes, 1887, *Rhabdostyla lumbriculi* Pennard, 1922 e *Opercularia inclinans* (Müller, 1786) Guhl, 1972 foram sinonimizados. Entretanto, FOISSNER et al. (1992) não rejeitam a possibilidade de *Rhabdostyla lumbriculi* e *Opercularia inclinans* serem espécies diferentes, e, ressaltam ainda necessidade de futuras investigações para elucidar esta questão (**Figura 2.2; p. 96**).

A população de *R. inclinans* registrada no Brasil possui maior similaridade com o morfotipo pedunculado registrado por Pennard (1922) colonizando oligoquetas do gênero *Nais* (**Figura 2.2: 12; Tabela 2.2; p. 96 e 99**). As principais características morfológicas semelhantes entre estas populações são: formato do zoóide, comprimento (44–55µm neste estudo *versus* 50–60 µm), posição ventral do vacúolo contrátil em relação ao infundíbulo, pedúnculo liso, formato da membrana epistomial, inclinação do zoóide, formato do disco peristomial, sítio de localização sobre as cerdas e hospedeiro (anelídeos) (**Figura 2.2: 12; Tabela 2.2**). As poucas diferenças morfológicas são comprimento do pedúnculo e extremidade do macronúcleo, entretanto, não justificam a separação em espécies distintas.

A população encontrada por FOISSNER et al. (1992) (**Figura 2.2: 1 e 3**); **Tabela 2.2**) que foi observada sobre a epiderme de oligoquetas apresentou muitas diferenças quando comparada à população caracterizada no presente estudo: disco de adesão do pedúnculo a epiderme do hospedeiro, zoóide piriforme medindo em torno de 45–77 x 35–42  $\mu\text{m}$  *in vivo* (*R. inclinans* 44–55 x 11–16  $\mu\text{m}$ ) e disco peristomial umbilical. Além destas duas espécies, foram observadas ainda outras diferenças entre *R. inclinans* encontrada em bromélias (presente estudo) e outras populações (**Tabela 2.2**) caracterizadas na literatura, tais como (1) STOKES (1887) (**Figura 2.2: 7**) : relação comprimento/largura, morfologia do disco e colar peristomial e comprimento do pedúnculo; (2) KAHL (1935) (**Figura 2.2: 8 e 3**): colar peristomial; (3) GUHL (1972) (**Figura 2.2: 14**): formato do zoóide, colar e disco peristomial, formato do macronúcleo e ausência da inclinação na região da escópula, característica que dá nome ao epíteto específico. As semelhanças entre a população de *R. inclinans* deste estudo com outras populações (**Tabela 2.2**) foram (1) STOKES (1887) (**Figura 2.2: 7**): comprimento do zoóide, estriações peliculares; (2) KAHL (1935) (**Figura 2.2: 8 e 9**): estriações peliculares e formato zoóide; e (3) GUHL (1972) (**Figura 2.2: 14**): pedúnculo.

Os dados morfológicos disponíveis na literatura não são suficientes para demonstrar se as populações descritas como *R. inclinans* se tratam da mesma espécie, sendo necessários futuros estudos com abordagem multidisciplinar (morfológico, molecular e ecológico) para as populações provenientes dos outros continentes (STOKES, 1887; PENNARD, 1922; GUHL, 1972; FOISSNER, 1992), com intuito de elucidar o real status taxonômico desta espécie de ciliado, que por hora consideramos uma única espécie visto ausência de evidências contundentes para separá-las até o momento.

### **Parâmetros ecológicos:**

Os ciliados peritríqueos são encontrados sob duas formas: trofante e telotróquio. O telotróquio é a forma livre natante, utilizada para dispersão e reprodução sexuada, enquanto o trofante é a forma sésil com ciliatura oral bem desenvolvida responsável por filtrar o alimento, ficando preso ao substrato por meio de um pedúnculo (na maioria dos grupos de peritríqueos). A alternância entre estas fases compreende o ciclo de vida em Peritrichia (GILBERT & SCHRÖDER, 2003). A correlação positiva entre o número de ciliados epibiontes e tamanho do hospedeiro pode estar relacionado com maior disponibilidade de substrato e um provável sítio de

localização restrito ao hospedeiro. SMITH (1986) registrou maior número de ciliados rabdostilídeos epibiontes nos espécimes de *Dero nivea* Ayer, 1930 (Annelida, Oligochaeta) maiores, o que provavelmente facilita a recolonização pelos telotróquios.

Bromélias são microcosmos que acumulam considerável quantidade de matéria orgânica vegetal (FOISSNER et al., 2003), o que favorece alimentação de *Aeolosoma hemprichi* Ehrenberg, 1831, corroborando grande quantidade de hospedeiros neste ambiente estudado. *Rhabdostyla inclinans* é um ciliado bacterívoro (CURTIS & CURDS, 1971; FOISSNER et al., 1992), portanto há vantagem para o epibionte ao colonizar os anelídeos que geram corrente suspensívora disponibilizando aos ciliados bactérias que fazem a decomposição da matéria orgânica no tanque da bromélia. Esta corrente é de grande importância para o ciliado, visto que bromélias são microcosmos que não apresentam fluxo de água constante. *Aeolosoma hemprichi* se alimenta de bactérias, pedaços de plantas em decomposição, protozoários e algas. Tanto a movimentação quanto alimentação são realizadas graças a corrente de sucção criada pela musculatura e ciliatura do prostômio (SINGER, 1978).

Grandes cargas de ciliados epibiontes afetam o comportamento natatório dos basibiontes (SUOSSI et al., 2013). Uma possível explicação para a distribuição homogênea de ciliados encontrados do lado esquerdo e direito pode estar no equilíbrio do hospedeiro, pois o lado com maior quantidade de protozoários tem mais atrito com o solo, logo a população que está deste lado tende a formar telotróquios e migrar para o outro lado ou para outro hospedeiro. Ao longo do tempo, com a tendência a gerar o equilíbrio de ambos os lados, a população de protozoários mantém-se com proporções próximas nos dois lados do hospedeiro, sendo esta uma estratégia evolutivamente estável.

A elevada prevalência (100%) e baixo valor do índice de discrepância (0.393) registrados neste estudo podem estar relacionados ao microcosmo investigado, provavelmente influenciados pela distribuição agregada dos hospedeiros o que resulta em possível baixa agregação e elevada prevalência dos ciliados em relação à população de hospedeiros analisadas. Entretanto, são necessários estudos com maior n amostral e em outros ambientes bromelícolas para melhor entendimento da distribuição destes ciliados sobre os anelídeos. Outro importante aspecto da biologia do hospedeiro que propicia baixa agregação da população de epibiontes é a realização de reprodução assexuada por cissiparidade, gerando a partir do pigídio novos segmentos que ficam

aderidos ao organismo inicial até a sua separação podendo formar muitos segmentos (HERLANT-MEEWIS, 1950), o que facilita dispersão dos ciliados na população de hospedeiros.

O rabdostilídeo *R. inclinans* foi relatado em ecossistemas da Ásia, Europa e América do Norte (STOKES, 1887; FOISSNER, 1992). Este estudo representa o primeiro relato desta espécie para o Brasil e América do Sul, entretanto, futuros estudos baseados em dados moleculares analisando amostras deste ciliado provenientes de diferentes continentes e ambientes poderá elucidar se todos estes morfotipos constituem realmente uma única espécie com ampla distribuição geográfica. Este estudo constitui ainda o primeiro relato desta espécie em ambiente bromelícola.

Os diferentes morfotipos de *R. inclinans* foram relatados em habitats muito diversos, variando de ambientes lênticos a lóticos e de água doce a água salobra, mas sempre em ambientes que apresentam nível trófico de alto a moderado e grau de oxigenação moderado. Há relatos de lago da América do Norte (STOKES, 1887), em águas salobras asiáticas, em filtros biológicos na Inglaterra, lago eutrofizado na Alemanha, bancos de esgoto na Hungria e de águas alfamesosaprobias da alta Áustria (GURWITSCH, 1934; FOISSNER et al., 1992). FOISSNER et al. (2009) registraram e descreveram pela primeira vez um rabdostilídeo (*Orborhabdostyla bromelicola*) em amostras de água do tanques da bromélia *Guzmania musaica* coletadas na Jamaica e Equador.

Os epibiontes apresentam graus variados de preferência pelos seus hospedeiros. Neste estudo *R. inclinans* é registrada pela primeira vez colonizando anelídeos da família Aeolosomatidae. Este ciliado foi relatado infestando epiderme e cerdas de oligoquetas dos gêneros *Lumbriculus* Müller, 1774, *Stylaria* Lamarck, 1816, *Tubifex* Lamarck, 1816, *Pristina* (Ehrenberg, 1828) Brinhurst, 1985 e *Nais* Müller, 1773. Segundo NENNINGER (1948) e COOK (1998) existem três grupos ecológicos distintos de peritríqueos, classificados quanto ao grau de especificidade pelo hospedeiro. Indivíduos do grupo O e I colonizam uma ampla gama de substratos, tais como substratos inertes, plantas, animais e não estão restritos ao modo de vida epibiótico. Os organismos do grupo II são parcialmente especializados e restritos, ao nível de filo, classe ou ordem do hospedeiro. No grupo III, os ciliados são epibiontes obrigatórios, com grau de especificidade maior, ao nível de família, gênero ou até espécie. Assim sendo, a espécie *R. inclinans* pode ser considerada até o presente com grau II de especificidade quanto ao hospedeiro

e constitui um dos poucos exemplos de espécies do gênero *Rhabdostyla* epibiontes de anelídeos (ALVAREZ-CAMPOS et al., 2014; DIAS et al., 2009; KAHL, 1935; RIGHI, 1973).

O sítio de localização de todos espécimes de *R. inclinans* registrados neste estudo foram as cerdas de *Aeolosoma hemprichi*. Foi observada a inserção do pedúnculo destes ciliados sobre região serrilhada das cerdas destes anelídeos (**Prancha 1.2; p. 98**), não havendo nenhum relato de ciliados (n= 964) colonizando a epiderme dos hospedeiros, o que ressalta a elevada especificidade quanto ao sítio de localização. A colonização da região serrilhada das cerdas provavelmente se relaciona com a possível maior adesão dos ciliados. Uma possível explicação para ausência de epibiontes sobre a epiderme pode estar relacionada ao fato dos Aeolosomatidae produzirem muco pelas células epidérmicas (POTSWALD, 1971), dificultando assim a colonização das formas livre-natantes (telotróquios) sobre esta região dos basibiontes. A população de *R. inclinans* caracterizada por PENNARD (1922) apresentou dois morfotipos distintos, um deles pedunculado e colonizando porção distal das cerdas de oligoquetas do gênero *Nais*, e outro não-pedunculado colonizando outros indivíduos da mesma espécie de hospedeiro. Não há relato de *R. inclinans* colonizando outros tipos de substratos (FOISSNER et al., 1992; KAHL, 1935; PENNARD, 1922; STOKES, 1887).

## **Filogenia Molecular**

### ***Rhabdostyla inclinans* é um vorticelídeo com características morfológicas de epistilídeo?**

A perda do ciclo de vida polimórfico em um ancestral vorticelídeo poderia ser uma possível explicação para encurtamento do pedúnculo e perda do espasmonema em *Rhabdostyla inclinans*, sendo este um vorticelídeo que por convergência evolutiva apresenta características morfológicas de epistilídeos.

O vorticelídeo *Planeticovorticella finleyi* Clamp & Coats, 2000 possui ciclo de vida polimórfico, o que amplia as possibilidades de entender a evolução do pedúnculo e do espasmonema dentro da família Vorticellidae. *P. finleyi* possui: (1) trofontes livre natantes sem pedúnculo, (2) trofontes sésseis com pedúnculo rígido, sem espasmonema, (3) trofontes com pedúnculo contrátil torcido helicoidalmente com um espasmonema e (4) trofontes sésseis sem pedúnculo, aderidos pela escópula. Ao se analisar cada morfotipo separadamente, há possibilidade desta mesma espécie ser considerada quatro famílias diferentes, dependendo do morfotipo: Astylozoidae (solitário sem pedúnculo), Epistylididae (solitário com curto rígido e

pedúnculo sem espasmonema), Scyphidiidae (solitário, sem pedúnculo, aderido diretamente pela escópula), e Vorticellidae (solitário com pedúnculo contrátil longo) (CLAMP & COATS, 2000). Baseando-se no ciclo de vida polimórfico de *P. finleyi* não descartamos a possibilidade de *R. inclinans* ser derivada de espécies ancestrais de vorticelídeos com ciclo polimórfico após diminuição do pedúnculo e perda do espasmonema visto vida epibiótica, um possível cenário que estaria de acordo com dados moleculares apresentados neste estudo.

Algo semelhante ocorre com gênero *Apocharchesium* criado para agrupar ciliados que possuem as seguintes características: hábito colonial, com todos os zoóides aderidos em forma de roseta na extremidade de único pedúnculo (não ramificado e com contração espiral) (JI & KUSUOKA, 2009). CLAMP & COATS (2000) descrevem em *P. finleyi* uma formação anômala de agrupamentos de 2–4 trofontes sobre um único pedúnculo, incapazes de formar os seus próprios pedúnculos. Este cenário pode ser explicado de forma semelhante àquele proposto para *R. inclinans*: ancestral vorticelídeo com ciclo de vida polimórfico tal como em *P. finleyi* poderia formar tais “trofontes anômalos” e ter dado origem ao ancestral do gênero *Apocharchesium*. Entretanto, está constitui apenas umas das inúmeras hipóteses para a origem destes gêneros a partir de ancestral vorticelídeo, sendo necessário ainda novos estudos moleculares para primeiro elucidar a filogenia interna de Peritrichia.

*Rhabdostyla inclinans* foi registrado colonizando seis gêneros de Oligochaeta. Portanto, é um organismo que possui grau de especificidade com o hospedeiro de intermediário a alto, grupo II (COOK et al., 1998; NENNINGER, 1948). Segundo WAHL & MARK (1999) quando os efeitos da epibiose são benéficos para epibiontes e basibiontes pode se esperar coevolução. No caso de *R. inclinans* houve benefícios em ter um pedúnculo curto e não contrátil, quando se leva em consideração o hábito do hospedeiro. Oligoquetas são invertebrados bentônicos que estão adaptados a viver em sedimentos com matéria orgânica variando da lama a areia, podendo ser encontrados em uma série de ambientes rochosos, rios de planície, lagos e lagoas onde substratos macios são frequentes. Portanto, o hospedeiro está em um ambiente em que há muito atrito, o que dificulta a permanência do epibionte no basibionte (DIAS et al., 2009; FERNANDEZ-LEBORANS et al., 1997; GREEN, 1974; UTZ & COATS 2005). Desse modo, possivelmente, seria desvantajoso para *R. inclinans* ter um pedúnculo muito longo, pois estaria mais exposto ao atrito, e também seria desnecessário presença de mionema, pois como o pedúnculo já é muito curto e o protozoário se encontra muito próximo ao hospedeiro, a vantagem que ele teria fugindo



de um predador por contração já seria o próprio pedúnculo curto, não tendo um custo benefício que favorecesse a contração do pedúnculo, visto que ao contrair o pedúnculo haveria mais gasto energético para o ciliado. Portanto, a própria relação com o hospedeiro teria ajudado esta fase do ciclo polimórfico a ser selecionada.

### ***Rhabdostyla* e *Epistylis* representam um exemplo de convergência evolutiva?**

A definição original do gênero *Rhabdostyla* foi dada por KENT (1881), como sendo animáculos solitários, assemelhando-se aqueles de *Vorticella*, mas “sentados” em um pedúnculo não contrátil ao em vez de contrátil. O gênero *Rhabdostyla* foi definido, portanto, para incluir as espécies do gênero *Epistylis* que possuíam pedúnculo curto e um estágio trofante solitário, similar como ocorria a distinção entre *Vorticella* e *Carchesium* em indivíduos coloniais e não coloniais (KENT, 1881). Até os dias atuais tem-se incluído em *Rhabdostyla* espécies com base na morfologia externa do pedúnculo tal como era feito em 1881 (ÁLVAREZ-CAMPOS et al., 2014). As famílias que incluem estes gêneros também foram divididas com base na morfologia do pedúnculo. *Rhabdosyla* e *Epistylis* foram inseridos na família Epistylididae, e *Vorticella* e *Carchesium* na família Vorticellidae, baseados nas seguintes características: Epistylididae trofantes contráteis sobre pedúnculo não contrátil; Vorticellidae zoóide contrátil, com cada um mesmo nas formas coloniais tendo seu próprio mionema contrátil em contração helicoidal que está centrado dentro de um pedúnculo (LYNN, 2008).

Nos últimos anos diversos trabalhos utilizando dados moleculares como ferramentas para entender a filogenia interna dentro da subclasse Peritrichia tem sido contrários à classificação tradicional baseada em caracteres morfológicos, tradicionalmente utilizada para separar os diversos níveis hierárquicos tais como gêneros e famílias (CLAMP & WILLIAMS 2006; LI et al., 2008; MIAO et al., 2001, 2004; MARTÍN-CERECEDA et al., 2007; SUN et al., 2010; UTZ & EIZIRIK, 2007; UTZ et al., 2010; WILLIAMS & CLAMP 2007). Estes dados moleculares sugerem que os principais caracteres usados para definir famílias em Peritrichia (presença/ausência de mionema no pedúnculo, hábito colonial *versus* solitário) não refletem divergência evolutiva, o que ressalta necessidade de se ampliar o número de sequências de 18S-rDNA para o grupo, bem como uso futuro de outros marcadores moleculares (como ITS1 e ITS2) e da estrutura secundária, para melhor entendimento das relações evolutivas no grupo, e,

consequentemente, propor mudanças na sistemática de Peritrichia a partir de uma caracterização que leve em consideração uma abordagem multidisciplinar.

O primeiro trabalho a questionar a posição filogenética de *Rhabdostyla* foi feito por SUN et al. (2010) baseado nas sequências das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2. Neste estudo *Rhabdostyla* sp. se agrupou entre espécies de vorticelídeos e não entre os epistilídeos tal como propõe a sistemática atual, o que sugeriu a seguinte questão: o pedúnculo dos organismos dos gêneros *Rhabdostyla* e *Epistylis* são resultado de convergência evolutiva? No presente estudo *R. inclinans* se agrupou entre os vorticelídeos (**Figura 1.2; p. 95**), ressaltando que o pedúnculo das espécies de *Rhabdostyla* pode ser resultado de encurtamento e perda do espasmonema. A elevada relação entre os ciliados rabdostilídeos e seus hospedeiros é forte pressão seletiva para redução do tamanho do pedúnculo e conseqüente perda do espasmonema.

*Rhabdostyla inclinans* se agrupou entre os principais grupos da família Vorticellidae e bem distante da família Epistylididae (incluindo *Orborhabdostyla bromelicola*), o que sugere que os ciliados rabdostilídeos constituem um grado e não um clado. Este estudo ressalta ainda necessidade de ampla revisão para do gênero *Rhabdostyla* utilizando caracterização multidisciplinar das espécies, ampliando dados morfológicos (novas ferramentas), ecológicos e moleculares (sequências de 18S-rDNA e outros marcadores) para melhor entendimento da validade do gênero e das características que refletem divergência evolutiva em Peritrichia.

### **A relação filogenética entre os “rabdostilídeos”**

Os protozoários peritríqueos “rabdostilídeos” caracterizam-se por apresentar hábito solitário, zoóide com formato de sino invertido e pedúnculo curto não contrátil (KAHL, 1935; FOISSNER et al., 2009). FOISSNER et al. (2009) descreveram uma nova espécie de “rabdostilídeo” em ambiente bromelícola, e com base em seu aparato macronuclear circular propuseram a criação do novo gênero *Orborhabdostyla*. Dentre os rabdostilídeos apenas três espécies atuais possuem aparato macronuclear circular: *Orborhabdostyla bromelicola*, *Orborhabdostyla khali* e *Rhabdostyla brevipes* (FOISSNER et al., 2009). As espécies do gênero *Rhabdostyla* são atualmente caracterizadas por apresentar macronúcleo em forma de ferradura ou em forma de fita.

Atualmente existem duas sequências depositadas no banco de dados genéticos (GenBank) para ciliados rabdostilídeos: *Rhabdostyla* sp. (SUN et al., 2010; acesso GU586189) e

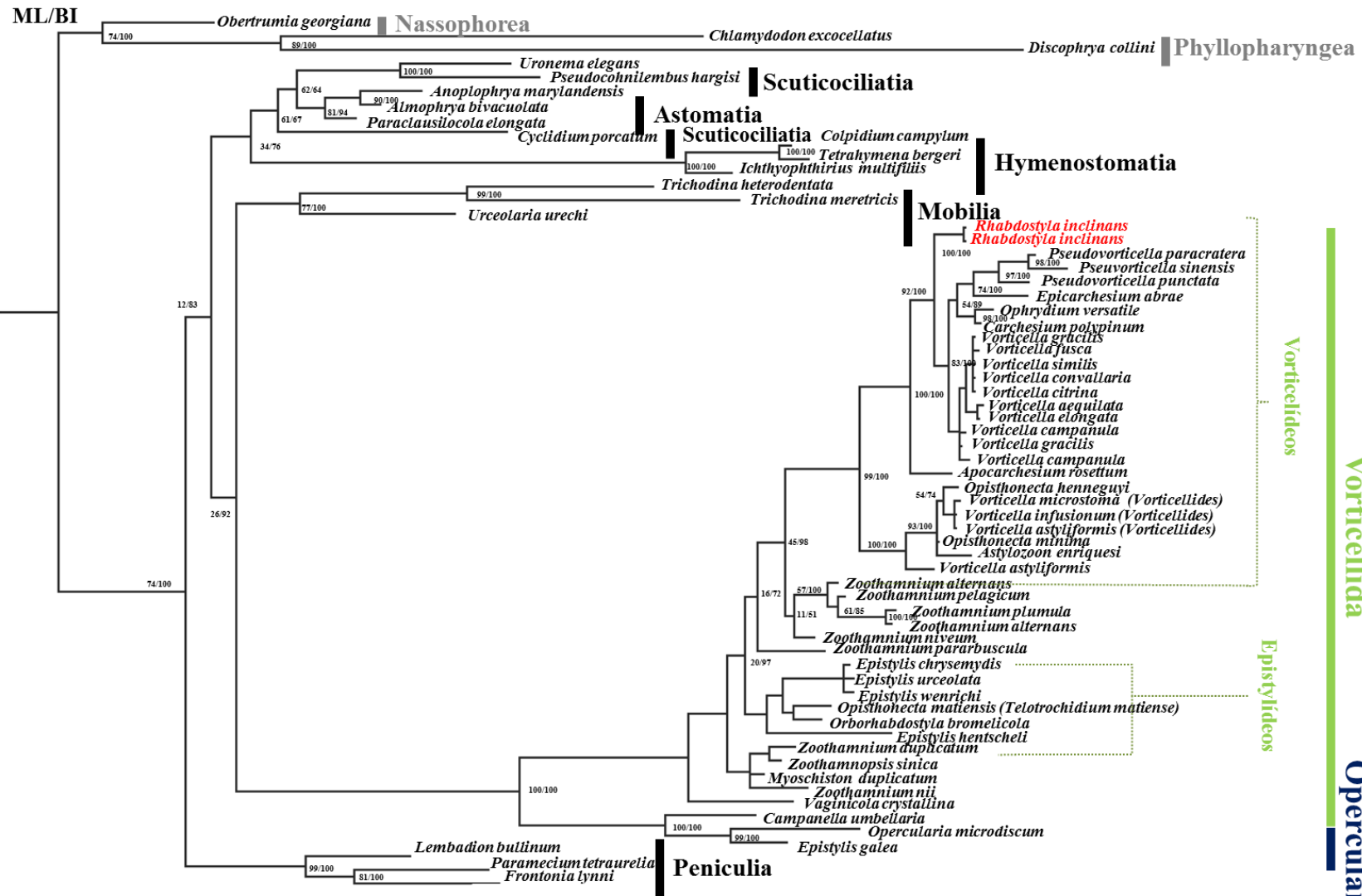
*Orborhabdostyla bromelicola* (FOISSNER et al., 2009; acesso GQ872428). Sun et al. (2010) utilizando as sequências das regiões espessadoras ITS1 e ITS2 sugerem maior afinidade de *Rhabdostyla* sp. com peritríqueos representantes da família Vorticellidae, contrariando a sistemática vigente. Entretanto, dados apresentados por FOISSNER et al. (2009) sobre a posição filogenética de *Orborhabdostyla bromelicola*, baseado no marcador 18S-rDNA, demonstram agrupamento deste ciliado com representantes da família Epistylididae, ressaltando o estabelecido na sistemática tradicional (**Figura 1.2**).

Os poucos dados moleculares disponíveis impedem reorganização da sistemática da subclasse Peritrichia usando dados que reflitam reais divergências evolutivas, sendo necessário ampliação de sequências de diferentes marcadores moleculares bem com ampliação das sequências de 18S-rDNA. Faz-se necessária ainda urgente revisão do gênero *Rhabdostyla* investigando mais caracteres morfológicos e ecológicos para melhor esclarecer as relações evolutivas entre representantes do gênero *Rhabdostyla* e outros peritríqueos, sugerindo assim potenciais caracteres sinapomórficos e reorganizando sistemática do grupo. Este estudo amplia discussão e traz novas perguntas a serem melhor elucidadas: (1) *Rhabdostyla* constitui um clado ou um grado?, (2) Macronúcleo oval/circular é uma característica que representa genuína divergência evolutiva?, (3) Qual importância da presença do mionema na sistemática da subclasse Peritrichia?

### **Importância da caracterização multidisciplinar de ciliados Peritrichia**

Estudos atuais tem demonstrado necessidade de se aplicar uma abordagem multidisciplinar na caracterização das espécies de ciliados para melhor elucidar as relações filogenéticas de diversos grupos deste filo (MODEO et al., 2013; MODEO et al., 2006; ROSATI et al., 2004; FOISSNER et al., 2003). A grande maioria dos trabalhos sobre rhabdostilídeos constituem descrições antigas baseadas em ilustrações e descrições antigas e resumidas. Esta lacuna de conhecimento impede comparações e impede avanço da sistemática do grupo, o que ressalta implementação desta nova abordagem para revisão dos grupos pouco estudados da subclasse Peritrichia, tal como os rhabdostilídeos. Em grupo contendo mais de 30 espécies, há apenas o presente trabalho e aquele realizado por FOISSNER et al. (2009) com esta abordagem multidisciplinar para caracterizar rhabdostilídeos, ressaltando importância da continuação dos estudos com esta abordagem. Segundo MODEO et al. (2013), análises morfológicas em conjunto

com análises moleculares constituem necessidade atual no estudo da sistemática de Ciliophora, sendo útil não só na determinação da biodiversidade como também ampliando precisão e confiabilidade das propostas para sistemática do grupo.



0.04

Vorticellideos

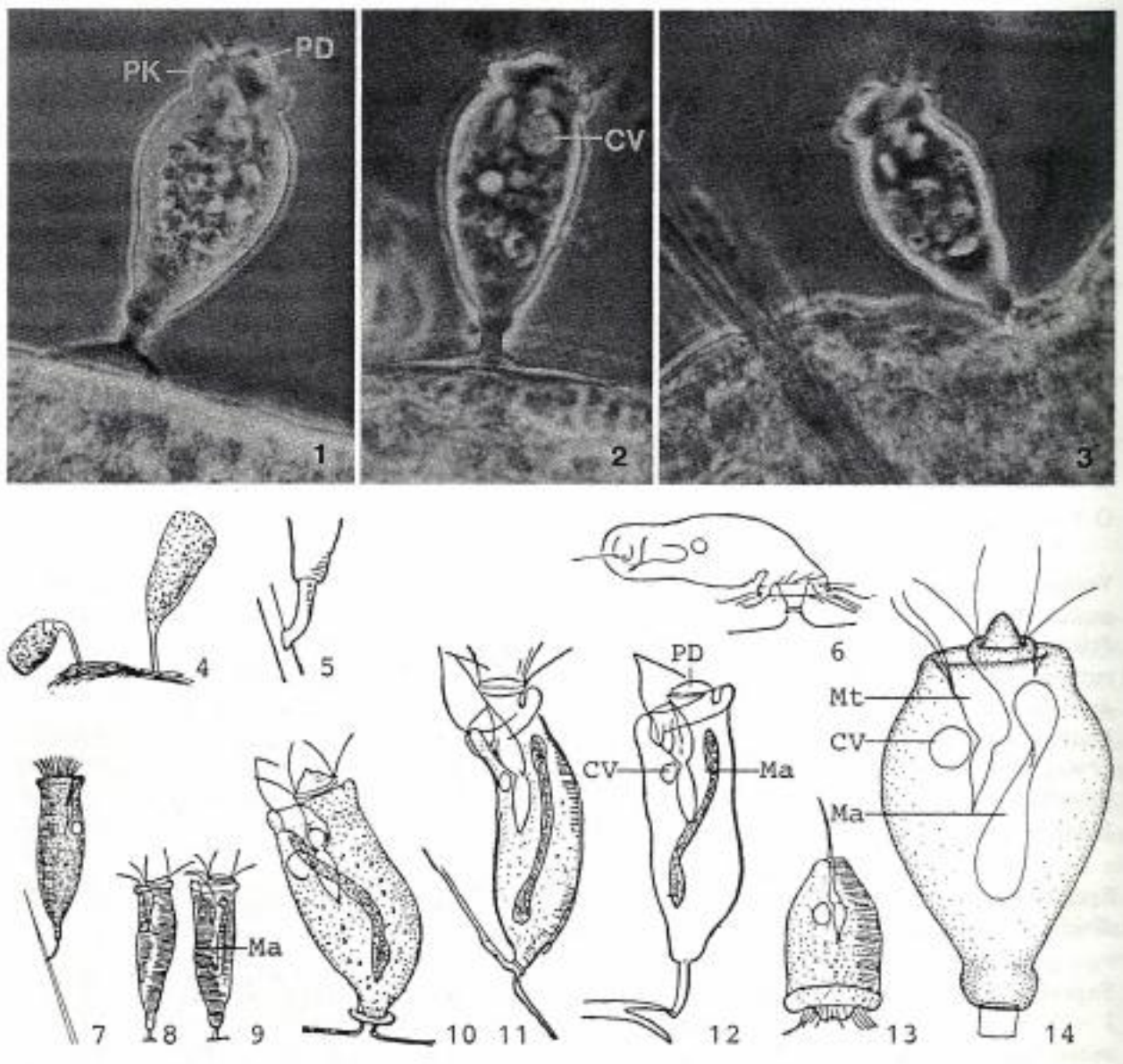
Vorticellida

Peritrichia

Epistylideos

Opercularida

**Figura 1.2:** árvore filogenética de representantes das classes Nassophorea, Phyllopharyngea e Oligohymenophorea (barras cinzas) com base em sequências do gene 18S-rDNA . A classe Oligohymenophorea foi representada por ciliados das suas seis subclasses: Peritrichia, Peniculia, Mobilia, Hymenostomatia, Scuticociliatia e Astomatia (barras pretas). Os valores em cada nó da árvore significam respectivamente: *bootstrap* da análise de verossimilhança máxima (ML) e valores de probabilidade posterior da inferência Bayesiana (BI). O \* representa incongruência na topologia usando determinado método de reconstrução filogenética. As sequências de *Rhabdostyla inclinans* obtidas no presente estudo estão destacadas em vermelho.



**Figura 2.2. 1-14. Fotomicrografias e desenhos esquemáticos *in vivo* de *Rhabdostyla inclinans*. 1-3 (Foissner, 1992); 4 (Müller, 1786); 5-6, 10-13 (Penard 1922); 7. (Stokes 1887b); 8-9. Kahl (1935); 1-4 (Guhl, 1972). 1-3: indivíduos estendidos com curto pedúnculo, colonizando epiderme de Oligochaeta (contraste de fase). 4: dois indivíduos colonizando a epiderme de oligoqueta do gênero *Nais*. 5: detalhe do pedúnculo. 6,13: telotróquio em formação e formado. 7-12, 14: indivíduos estendidos com detalhes do macronúcleo (Ma). Legenda: CV = vacúolo contrátil, Ma = macronúcleo, Mt = vestíbulo, PD = disco peristomial, PK = colar peristomial.**

**Tabela 2.2:** Comparação entre as populações de *Rhabdostyla inclinans* encontradas em bromélias do Brasil e as revisadas por Foissner et al. (1992).

	Morfologia do zoóide	Comprimento do zoóide (µm)	Razão comprimento e largura	Morfologia disco peristomial	disco peristomial pedunculado/proeminente	cutícula	Razão pedúnculo/zoóide	Basibionte	Sítio de localização	Vacuolo contrátil	Macronúcleo
Stokes 1887 <i>Rhabdostyla chaeticola</i>	alongado-ovalado	44	4/1	—	ligeiramente elevado	Finamente estriada transversalmente	1/8	<i>Nais</i> sp.	aderido a cerda dorso-lateral	ventral ao infundíbulo	— longo, longitudinal, flexionado
Pennard 1922 <i>Rhabdostyla lumbriculi</i>	mais largo e curvado	70-77	—	muito convexo com protuberância	—	estrias transversais bem evidentes	—	<i>Lumbriculus</i>	aderido a epiderme	ventral ao infundíbulo grande	alargado nas extremidades longo, longitudinal, flexionado
Pennard 1922 <i>Rhabdostyla inclinans</i> morf. 1	alongado e cilíndrico	50-60	—	disco estreito superfície plana	relativamente elevado	estrias muito finas	1/8 a 1/6	<i>Nais</i> sp.	aderido a cerda	ventral ao infundíbulo	alargado nas extremidades longo, longitudinal, flexionado
Pennard 1922 <i>Rhabdostyla inclinans</i> morf. 2	alongado, cilíndrico e mais curvado	50-60	—	disco estreito superfície plana	muito proeminente	estrias muito finas	séssil e não tem pedúnculo	<i>Nais</i> sp.	aderido a epiderme	ventral ao infundíbulo	alargado nas extremidades
Kahl 1935 <i>Rhabdostyla inclinans</i> F.6	muito cilíndrico	40	—	disco estreito superfície plana	ligeiramente elevado	Finamente estriada transversalmente	—	<i>Pristina longiseta</i>	—	ventral ao infundíbulo	longo e cilíndrico
Kahl 1935 <i>Rhabdostyla inclinans</i> F.7	muito cilíndrico	50	—	disco estreito superfície plana	ligeiramente elevado	Finamente estriada transversalmente	—	<i>Nais elinguis</i>	aderido a cerda	ventral ao infundíbulo	longo e cilíndrico flexionado na região anterior e extremidades globosas
Guhl 1972 <i>Opercularia inclinans</i>	Piriforme	62-70	—	muito convexo com protuberância	ligeiramente elevado	—	—	<i>Oligochaeta</i>	—	ventral ao infundíbulo	—
Foissner et al. 1992 <i>Rhabdostyla inclinans</i>	Piriforme	35-42	—	convexo com protuberância	ligeiramente elevado	Finamente estriada transversalmente	—	<i>Oligochaeta</i>	aderido a epiderme	ventral ao infundíbulo	—
Marchesini et al. 2014 <i>Rhabdostyla inclinans</i>	Cilíndrico	44-55	3,37:1	disco estreito superfície plana	ligeiramente elevado	Finamente estriada transversalmente	1/28	<i>Aeolosoma hemprichi</i>	aderido a cerda	ventral ao infundíbulo	Longo, longitudinal (vários morfotipos)



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ-CAMPOS, P.; FERNÁNDEZ-LEBORANS, G.; VERDES, A.; MARTÍN, G. S.; MARTÍN, D.; RIESGO, A. The tag-along friendship: epibiotic protozoans and syllid polychaetes. Implications for the taxonomy of Syllidae (Annelida), and description of three new species of *Rhabdostyla* and *Cothurnia* (Ciliophora, Peritrichia). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 172, p. 265–281, 2014.

BRINKHURST, R.O.; MARCHESE, M. **Guía para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centroamérica**. Asociación de Ciências Naturales del Litoral, Santo Tomé, 207 p, 1992.

BUSH, A. O.; LAFFERTY K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575–583, 1997.

CLAMP, J. C.; COATS, D. W. *Planeticovorticella finleyi* n.g., n.sp. (Peritrichia, Vorticellidae), a planktonic ciliate with a polymorphic life cycle. **Invertebrate Biology**, v. 119 p. 1–16, 2000.

CLAMP, J. C.; WILLIAMS, D. A molecular phylogenetic investigation of *Zoothamnium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 494–498, 2006.

COOK J. A.; CHUBB J. C.; VELTKAMP C. J. Epibionts of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda): an SEM study. **Freshwater Biology**, v. 39, p. 423–438, 1998.

CURTIS, E. J. C.; CURDS, C. R. Sewage fungus in rivers in the United Kingdom: the slime community and its constituent organisms. **Water Research**, v. 5, p. 1147–1159, 1971.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, 772–772, 2012.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET F.; DUFAYARD, J. F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J. M.; GASCUEL, O. Phylogeny.fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 465–469, 2008.

DEHORITY B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 182–185, 1984.

DIAS, R. J. P.; CABRAL, A. F.; MARTINS, R. T.; STEPHAN, N. N. Occurrence of peritrich ciliates on Limnic ologochete *Limnodrilus hoffmeisteri* in Neotropic. **Journal of Natural History**, v. 43, p. 1–15, 2009.

DIAS, Roberto Júnio Pedroso. **Taxonomia, Morfologia e Filogenia Molecular de Representantes das Subclasses Peritrichia Stein, 1859 e Mobilia Kahl, 1933 (Protista, Ciliophora, Oligohymenophorea) de Ecossistemas do Sudeste Brasileiro**. 337 f. Tese (Doutorado em Zoologia) Museu Nacional-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DI PERSIA, D. H. El genero *Aeolosoma* Ehrenberg, 1828, em algunos ambientes leniticos del noroeste de la provincia de corrientes, argentina (Oligochaeta). **Physys secciones B**, v. 90, p. 9–15, 1976.

FERNANDEZ-LEBORANS, G.; CORDOBA, M. J. H.; ARCO, P. G. Distribution of ciliate epibionts on the portunid crab *Liocarcinus depurator* (Decapoda, Brachyura). **Invertebrate Biology**, v. 116, p. 171–177, 1997.

FOISSNER, W. Peritriche Ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus alpi-nen Kleingewassern. **Zoologische Jahrbuecher Systematik**, v.106, p. 529–558, 1979.

FOISSNER, W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated Protozoa. **European Journal of Protistology**, v. 27, p. 313–330, 1991.

FOISSNER, W.; BERGER, H.; KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichte des Bayer. **Landesamtes für Wasserwirtschaft**, v. 92, p. 1–502, 1992.

FOISSNER, W.; STRÜDER-KYPKE M.; VAN DER STAAY, G. W. M.; MOON-VAN DER STAAY, S.-Y.; HACKSTEIN, J. H. P. Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. **European Journal of Protistology**, v. 39, p. 365–372, 2003.

FOISSNER, W.; BLAKE, N.; WOLF, K.; BREINER, H. W.; STOECK, T. Morphological and Molecular Characterization of Some Peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from Tank Bromeliads, Including Two New Genera: *Orborhabdostyla* and *Vorticellides*. **Acta Protozoologica**, v. 48, p. 291–319, 2009.

GUINDON, S.; DUFAYARD, O. J-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696–704, 2003.

GILBERT, J. J.; SCHRÖDER, T. The ciliate epibiont *Epistylis pigmaeum*: selectionforzooplakton hosts, reproduction and effect on two rotifers. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 878–896, 2003.

GREEN J. Parasites and epibionts of Cladocera. **Transactions of the Zoological Society of London**, v. 32, p. 417–515, 1974.

GUHL, W. *Opercularia inclinans* (O. F. Müller 1786) nov. comb., ein symphoriontes Peritrichvon Oligochaeten. **Zoologischer Anzeiger**, v. 189, p. 351–356, 1972.

GURWITSCH, V. Zur Frage über die Wirkung der Concentration der Salze auf die Protistenfauna der Wasserbecken. **Acta Universitatis Asiae Mediae**, v. 12, p. 1–24, 1934.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontological Electronica**, v. 4, p. 1–9, 2001.

HERLANT-MEEWIS, H. Cyst-formation in *Aeolosoma hemprichi* (EHR). **The Biological Bulletin**, v. 99, p. 173–180, 1950.

JI, D.; KUSUOKA, Y. A description of *Apocarchesium rosettum* n. gen., n. sp. and a description of *Ophrydium eichornii* Ehrenberg, 1838, two freshwater peritrichous ciliates from Japan. **European Journal of Protistology**, v. 45, p. 21–28, 2009.

KAHL, A. **Peritrichia und Chonotricha**, p. 651–885. *In*: Urtiere Oder Protozoa. Deutschlands, G. Fischer, 1935.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772–780, 2013.

KENT, W. S. **A Manual of the Infusoria: Including a Description of all Known Flagellate, Ciliate, and Tentaculiferous Protozoa, British and Foreign, and an Account of the Organization and Affinities of the Sponges**, p. 664–666 London: David Bogue, 3 ST. Martin's Place, Trafalgar Square, W.C, 1881–1882.

LI, L.; SONG, W.; WARREN, A.; SHIN, M. K.; CHEN, Z.; JI, D.; SUN, P. Reconsideration of phylogenetic positions of five peritrich genera, *Vorticella*, *Pseudovorticella*, *Zoothamnopsis*, *Zoothamnium*, and *Epicarchesium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida) based on small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 448–456, 2008.

LYNN, D. H. The Ciliated Protozoa. **Characterization, Classification, and Guide to the Literature**, 3rd ed. Springer, Dordrecht, 605 p, 2008.

MIAO, W.; YU, Y.-H.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) with emphasis on the genus *Epistylis*, inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 583–587, 2001.

MIAO, W.; FEN, W.-S.; YU, Y.-H.; ZHANG, X.-Y.; SHEN, Y.-F. Phylogenetic relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 180–186, 2004.

MARTÍN-CERECEDA, M. Classification of the peritrich ciliate *Opisthnecta matiensis* (Martín Cereceda et al. 1999) as *Telotrochidium matiense* nov. comb., based on new observations and SSU rDNA phylogeny. **European Journal of Protistology**, v. 43, p. 265–279, 2007.

MODEO, L.; ROSATI, G.; ANDREOLI, I.; GABRIELLI, G.; VERNI, F.; PETRONI G. Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). **Proceedings of the Japan Academy**, v. 82, p. 359–374, 2006.

MODEO, L.; PETRONI, G.; LOBBAN, C. S.; VERNI, F.; VANNINI C. Morphological, ultrastructural, and Molecular Characterization of *Euplotidium rosati* n. sp. (Ciliophora, Euplotida) from Guam. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, p. 25–36, 2013.

MÜLLER, O. F. **Vermium terrestrium et fluviatilium, seu, Animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia**, p. 116. Heineck & Faber, Havnie Lipsiae, 1773.

NENNINGER, U. Die Peritrichen der Umgebung von Erlangen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Wirtsspezifität. **Zoologische Jahrbuecher**, v. 77, p. 169–266, 1948.

- PENARD, E. **Études sur les Infusoires d'Eau Douce**. p.265–267, Georg et Cie, Genève, 1922.
- PRECHT, H. Epizoen der Kieler Bucht. **Nova Acta Leopoldina**, v. 3, p. 405–475, 1935.
- POULIN, R. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. **International Journal of Parasitology**, v. 23, p. 937–944, 1993.
- POTSWALD, H. E. A fine structural analysis of the epidermis and cuticle of the Oligochaete *Aelosoma Bengalense* Stephenson. **Journal of Morphology**, v. 135, p. 185–212, 1971.
- RAMBAUT, A. (2006). Figtree. **Institute of Evolutionary Biology, Univ. of Edinburgh**. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- RIGHI, G. On *Pristina minuta* (Oligochaeta, Naididae) from Brazilian soil and its Epizoic *Rhabdostyla pristinis* sp. n. (Ciliata, Epistylidae). **Zoologische Anzeiger**, v. 191, p. 295–299, 1973.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. V. D.; AYRES D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.
- ROSATI, G.; MODEO, L.; MELAI, M.; PETRONI, G.; VERNI, F. A multidisciplinary approach to describe protists: a morphological, ultrastructural, and molecular study on *Peritromus kahli* Villeneuve-Brachon, 1940 (Ciliophora, Heterotrichea). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 49–59, 2004.
- ROZSA, L.; REICZIGEL, J.; MAJOROS G. Quantifying parasites in samples of hosts. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 228–232, 2000.

SILVA-NETO, I. D. Observations sur l'ultrastructure du Cilié Hétérotriche, *Licnophora auerbachii* Cohn, 1866, épibionte de l'étoile de mer. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie**, v. 15, p. 49–62, 1994.

SILVA-NETO, I. D.; PAIVA, T. S.; DIAS, R. J. P.; CAMPOS, C. J. A.; MIGOTTO, A. E. Redescription of *Licnophora chattoni* Villeneuve-Brachon, 1939 (Ciliophora, Spirotrichea) associated with *Zyzyzus warreni* Calder, 1988 (Cnidaria, Hydrozoa). **European Journal of Protistology**, v. 48, p. 48–62, 2012.

SINGER, R. Suction-Feeding in *Aeolosoma* (Annelida). **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 97, p. 105–111, 1978.

SMITH, M. E. Distribution Patterns and Seasonal Occurrence of *Rhabdostyla* sp. on *Dero nivea* (Oligochaeta, Naididae). **American Midland Naturalist**, v. 116, p. 348–355, 1986.

SONG, W. Descriptions of seven new species of peritrichs on *Penaeus orientalis* (Peritricha: Zoothamnidae, Epistylididae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, v. 11, p. 225–235, 1986.

SUN, P.; CLAMP, J. C.; XU, D. Analysis of the secondary structure of ITS transcripts in ciliates (Ciliophora, Oligohymenophorea): implications for structural evolution and phylogenetic reconstruction. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, p. 242–251, 2010.

SOUISSI, A.; SOUISSI, S.; HWANG J-S. The effect of epibiont ciliates on the behavior and mating success of the copepod *Eurytemora affinis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 445, p. 38–43, 2013.

STATSOFT, INC. 2004. “STATISTICA (data analysis software system), version 7.” <http://www.statsoft.com>

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

UTZ, L. R. P.; COATS D. W. Spatial and temporal patterns in the occurrence of peritrich ciliates as epibionts on calanoid copepods in the Chesapeake Bay, USA. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 52, p. 236–244, 2005.

UTZ, L. R. P. First record of *Epistylis plicatilis* (Ciliophora: Peritrichia) attached to *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda) in Southern Brazil. **Zootaxa**, v. 1454, p. 49–57, 2007.

UTZ, L. R. P.; EIZIRIK, E. Molecular phylogenetics of Sub-Class Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 303–305, 2007.

UTZ, L. R. P.; COATS, D. W.; E. B. SMALL. Morphological Characterization and Intraspecific Variation of *Zoothamnium intermedium* Precht, 1935 (Ciliophora, Peritrichia) Attached to Calanoid Copepods in the Chesapeake Bay, USA. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 297–305, 2008.

UTZ, L. R. P.; SIMÃO, T. L. L.; SAFI, L. S. L.; EIZIRIK, E. Expanded phylogenetic representation of genera *Opercularia* and *Epistylis* sheds light on the evolution and higher-level taxonomy of peritrich ciliates (Ciliophora: Peritrichia). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 415–420, 2010.

WAHL, M. & MARK, O. The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. **Marine Ecology Progress Series**, v. 187, p. 59–66, 1999.

WILBERT, N. Eine verbesserte Technik der Protargolimprägation für Ciliaten. **Mikrokosmos**, v. 64, p. 171–179, 1975.



WILLIAMS, D.; CLAMP, J. C. A molecular phylogenetic investigation of *Opisthonecta* and related genera (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 317–323, 2007.

XU, K.; SONG, W. A morphological study on a new species of gill parasitic ciliate, *Urceolaria cheni* nov. spec. from the clam *Scapharca subcrenata*. **Journal of Fisheries Science**, v. 5, p. 13–17, 1998.

## **ANEXO 2.1:Protocolo do Protargol Wilbert (1975)**

## **Impregnação pelo Protargol segundo modificação proposta por Wilbert (1975)**

1. Fixar os ciliados em ácido pícrico (solução de Bouin) ou em sublimado de Stieve (por pelo menos 10 minutos);
2. Lavar em água destilada: Deixar as células concentrarem e remover o sobrenadante com uma micropipeta em microscópio estereoscópio. Repetir o processo até que água torne-se transparente;
3. Clarear as células com solução branqueadora “Eau de Javelle” (solução de hidróxido sódio; solução cáustica de potássio; hipoclorito de sódio; solução de hipoclorito de potássio; solução de cloreto de sódio (coar) Romeis §2448; Este passo é o mais difícil durante o processo de preparação: as células podem não impregnar ou lizar, caso o branqueamento demore em excesso. Ainda, se o branqueamento for insuficiente, os corpos basais não serão observados ao final do processo. Devido a diferenças na concentração do cloro (hipoclorito de sódio) não podemos, neste protocolo, fornecer a concentração exata para a solução branqueadora. Uma diluição de 1 : 30 (30 gotas de água destilada : 1 gota de solução branqueadora) é uma boa aproximação. Com uma micropipeta, gotejar a solução nas células fixadas sempre as observando ao microscópio estereoscópio. As células vão, aos poucos, tornando-se transparentes. Imediatamente após a reação, a solução branqueadora deve ser removida completamente, caso contrário, a solução irá precipitar na etapa de impregnação pelo protargol.
4. Impregnação pelo protargol: foi mostrado que mesmo concentrações bem baixas de sais de prata são capazes de impregnar estruturas que apresentam afinidade pela prata. Sendo assim, o melhor é polvilhar com a ponta da espátula pequenas quantidades de protargol próximo às células. O tempo de impregnação e a temperatura variam. As seguintes condições são favoráveis: 12 horas em temperatura ambiente ou 30–40 minutos a 40–50°C em chapa ou banho-maria.
5. Solução de Hidroquinona 1% preparada recentemente e dissolvida em solução de sulfito de sódio 5% serve como solução catalizadora. Aplicar pequenas gotas da solução catalizadora ao redor das células. As estruturas com afinidade pela prata adquirem coloração amarelada.

Através de um microscópio estereoscópio, os corpos basais, o aparato nuclear e os elementos fibrilares podem ser observados neste momento. Após a revelação, lavar com água destilada.

6. Cobrir as células impregnadas com solução de sulfato de sódio 0,5%. Incubar por 1 a 2 minutos e lavar cuidadosamente com água destilada.

7. Pegar cuidadosamente os organismos impregnados com uma micropipeta e colocar em uma lâmina microscópica desengordurada. Albumina glicerinada serve como substância adesiva: misturar a albumina glicerinada em água destilada (razão aproximada de 1:10). Após, homogeneizar cuidadosamente a mistura e sugar a fase aquosa da albumina glicerinada até que as células fiquem em evidência. Secar as lâminas ao ar ou em chapa aquecida. Desidratar com álcool 70 % e xilol e montar entre lâmina e lamínula em meio sintético.

**ANEXO 2.2:Protocolo do Carbonato de Prata  
(Foissner, 1991).**

## Método de Impregnação pelo Carbonato de Prata

(Foissner, 1991)

1- Colocar 1 gotícula (aproximadamente 0,05 mL) de rica cultura contendo ciliados em um recipiente.

2- Adicionar 1-2 gotas de formalina 4% e deixar fixando por 1–3 minutos. Mexer o recipiente em movimentos circulares.

Observação: Para ciliados que apresentem película grossa: 3 minutos ou mais.

Para ciliados que apresentem película muito delgada: 1 minuto ou menos.

3- Adicionar 3 gotas da solução de Fernandez-Galiano.

4- Colocar o recipiente em uma placa aquecida a 60–80°C. A mistura torna-se marrom, cor de conhaque. Mexer em movimentos circulares, por aproximadamente 2-4 minutos. A impregnação pode ser controlada por meio de microscópio.

Observação: O controle da impregnação é difícil, pois o sucesso da coloração depende do tamanho das gotas utilizadas, da temperatura em que se encontra a placa aquecida, da espécie de ciliado...

5- Interrompa a impregnação no momento desejado removendo o recipiente da placa aquecida e adicionando 1 gota de Tiosulfato de Sódio.

Observação: Esta técnica não é permanente.

Reagentes:

1- Para fixar os organismos:

- 0,1 mL de formalina 37%

- 10 mL de água destilada

## 2- Solução de Fernandez-Galiano:

Pode ser preparada imediatamente antes do uso. Os componentes devem ser adicionados na sequência indicada.

Deve ser armazenada em frasco marrom, ao abrigo da luz. Se armazenada adequadamente, pode ser utilizada por muitos anos.

- 0,3 mL de Piridina em concentração comercial
- 2-4 mL de Rio-Hortega (Carbonato de prata amoniacal)
- 0,8 mL de uma Solução de proteose peptona
- 16 mL de água destilada

## 3- Tioossulfato de Sódio:

- 2,5g de Tioossulfato de Sódio
- 100 mL de água destilada

## 4- Rio Hortega (Carbonato de prata amoniacal):

As proporções são importantes!

50 mL de Nitrato de Prata Aquoso a 10% é colocado em um frasco; 150 mL de carbonato de sódio a 5% são adicionados pouco a pouco. Uma solução de amônia a 25% é adicionada gota a gota até dissolver o precipitado. Tomar cuidado para não adicionar amônia em excesso. Completar o volume da solução com 750 mL de água destilada.

## 5- Proteose Peptona:

- 0,6 mL de água destilada
- 4g de Proteose Peptona
- 0,5 mL de formalina 37%

## **ANEXO 2.3:Protocolo de Extração de DNA**



### **Protocolo de extração de DNA com o *Kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen).**

- 1- Fixar os protozoários em álcool absoluto em um **microtubo de 1,5 mL**.
- 2- Precipitar os ciliados a aproximadamente **5.000 rpm por 3 minutos** em centrífuga.
- 3- Retirar o máximo possível de álcool, de preferência tudo, esvaziando o conteúdo sobrenadante do microtubo na pia.
- 4- Adicionar no microtubo **180 µL do tampão ATL**.
- 5- Adicionar **20 µL da Proteinase K** e misturar (utilize vortex®) por 10 segundos.
- 6- Incubar em banho-maria em temperatura de **56 °C por 60 minutos**.
- 7- Após 60 minutos, misturar (utilize vortex®) por 15 segundos.
- 8- Adicionar **200 µL de tampão AL** e logo depois adicionar **200 µL de Etanol absoluto** e misturar (utilize vortex®) **por 15 segundos**.

**OBS:** É de extrema importância que o **tampão AL** e o **álcool absoluto** sejam colocados um após o outro. Ao fazer várias extrações ao mesmo tempo, pode-se colocar o tampão AL e o Álcool a ser utilizado em todas as amostras em um único microtubo vazio (estéril) e posteriormente distribuir a solução a cada microtubo de 1,5 mL contendo as amostras que serão extraídas.

- 9- Separe para o passo **10** um **tubo coletor de 2 mL** e **uma coluna** (disponíveis no *Kit*). A **coluna** contendo a **membrana** deve ser inserida no tubo coletor de 2 mL.
- 10- Retire todo o líquido do **microtubo de 1,5 mL** e coloque na **coluna**, exatamente sobre a membrana, cuidadosamente, evitando perfurá-la.
- 11- Centrifugue a **8.000 rpm por 1 minuto**.
- 12- Jogue fora o líquido no fundo do **tubo coletor** e coloque a coluna em um **novo tubo coletor**.
- 13- Adicione **500 µL de tampão AW1** sobre a membrana da coluna e centrifugue a **8.000 rpm por 1 minuto**.
- 14- Jogue fora o líquido junto com o **tubo coletor**.
- 15- Coloque a **coluna com a membrana** em um **novo tubo coletor**.
- 16- Adicione **500 µL de tampão AW2** à membrana da coluna e centrifugue a **14.000 rpm por 3 minutos** para secar a membrana. Jogue fora o **tubo coletor** junto ao líquido.
- 17- Coloque um novo tubo coletor e **repita** a centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos, garantindo que a membrana contida na coluna fique bem seca.

- 18- Coloque a coluna em um microtubo de **1,5 mL** e coloque na coluna **50 µL do tampão AE**. Deixe aguardando na bancada por 1 minuto e, após, centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.
- 19- Guarde o microtubo de 1,5 mL com o DNA extraído dentro do freezer a -20°C.

## Anexo 2.4

**Lista de sequências do gene 18S-rDNA utilizadas no presente estudo. Em cinza espécies que não são peritríqueos *sensu* ZHAN et al. (2009).**

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso (GenBank)</b>	<b>Autor</b>	<b>Número de pares de base</b>
<i>Apocarchesium rosettum</i>	GU987030	Sun et al. 2011	1674
<i>Astylozoon enriquesi</i>	AY049000	Strüder-Kypke 2001	1603
<i>Campanella umbellaria</i>	AF401524	Miao et al. 2004	1690
<i>Carchesium polypinum</i>	GU187054	Sun et al. 2011	1681
<i>Epicarchesium abrae</i>	DQ190462	Li et al. 2008	1737
<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	Miao et al. 2001	1727
<i>Epistylis galea</i>	AF401527	Miao et al. 2004	1746
<i>Epistylis hentscheli</i>	AF335513	Miao et al. 2001	1729
<i>Epistylis urceolata</i>	AF335516	Miao et al. 2001	1746
<i>Epistylis wenrichi</i>	AF335515	Miao et al. 2001	1723
<i>Myoschiston duplicatum</i>	JN836351	Sun et al. 2012	1696
<i>Opercularia microdiscum</i>	AF401525	Miao et al. 2004	1743
<i>Ophrydium versatile</i>	AF401526	Miao et al. 2004	1727
<i>Opisthonecta henneguyi</i>	X56531	Greenwood et al. 1991	1730
<i>Opisthonecta matiensis</i>	EF417835	Williams et al. 2007	1651
<i>Opisthonecta minima</i>	EF417834	Williams et al. 2007	1721
<i>Orborhabdostyla bromelicola</i>	GQ872428	Foissner et al. 2009	1735
<i>Pseudovorticella paracratera</i>	DQ662847	Li et al. 2008	1650
<i>Pseudovorticella punctata</i>	DQ190466	Li et al. 2008	1754
<i>Pseuvorticella sinensis</i>	DQ845295	Li et al. 2008	1650
<i>Vaginicola crystallina</i>	AF401521	Miao et al. 2004	1728
<i>Vorticella aequilata</i>	JN120210	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella astyliformis</i>	JN120204	Sun et al. 2012	1541
<i>Vorticella campanula</i>	JN120251	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella campanula</i>	JN120222	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella citrina</i>	JN120225	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella convallaria</i>	JN120227	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella elongata</i>	JN120217	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella fusca</i>	DQ190468	Li et al. 2008	1733
<i>Vorticella gracilis</i>	GQ872429	Foissner et al. 2009	1734
<i>Vorticella gracilis</i>	JN120233	Sun et al. 2012	1543
<i>Vorticella infusionum</i>	JN120203	Sun et al. 2012	1541
<i>Vorticella microstoma</i>	DQ868347	Clamp et al. 2006	1726
<i>Vorticella similis</i>	JN120235	Sun et al. 2012	1542
<i>Vorticella astyliformis</i>	GQ872427	Foissner et al. 2009	1729
<i>Zoothamnium alternans</i>	DQ868352	Clamp et al. 2006	1720
<i>Zoothamnium alternans</i>	DQ662850	Li et al. 2008	1732
<i>Zoothamnium duplicatum</i>	DQ662851	Li et al. 2008	1651
<i>Zoothamnium nii</i>	DQ662852	Li et al. 2008	1651
<i>Zoothamnium niveum</i>	DQ868350	Clamp et al. 2006	1690
<i>Zoothamnium pararbuscula</i>	DQ662853	Li et al. 2008	1651

<i>Zoothamnium pelagicum</i>	DQ868351	Clamp et al. 2006	1731
<i>Zoothamnium plumula</i>	DQ662854	Li et al. 2008	1731
<i>Zoothamnopsis sinica</i>	DQ190469	Li et al. 2008	1733
<i>Almophrya bivacuolata</i>	HQ446281	Fokam et al. 2011	1680
<i>Anoplophrya marylandensis</i>	AY547546	Affa'a et al. 2004	1753
<i>Chlamydodon excocellatus</i>	AY331790	Snoeyenbos-West et al. 2004	1662
<i>Colpidium campylum</i>	X56532	Greenwood et al. 1991	1754
<i>Cyclidium porcatum</i>	Z29517	Embley et al. 1993	1718
<i>Discophrya collini</i>	L26446	Leipe et al. 1994	1678
<i>Frontonia lynni</i>	DQ190463	Li et al. 2005	1747
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	U17354	Wright et al. 1995	1747
<i>Lembadion bullinum</i>	AF255358	Struder-Kypke et al. 2000	1746
<i>Obertrumia georgiana</i>	X65149	Bernhard et al. 1995	1765
<i>Paraclausilocola elongata</i>	HQ446274	Fokam et al. 2011	1749
<i>Paramecium tetraurelia</i>	X03772	Sogin et al. 1986	1753
<i>Pseudocohnilembus hargisi</i>	AY212806	Shang et al. 2003	1753
<i>Tetrahymena bergeri</i>	AF364039	Lynn et al. 2005	1748
<i>Trichodina heterodontata</i>	AY788099	Gong et al. 2006	1698
<i>Trichodina meretricis</i>	FJ499387	Zhan et al. 2009	1721
<i>Urceolaria urechi</i>	FJ499388	Zhan et al. 2009	1696
<i>Uronema elegans</i>	AY103190	Shang et al. 2002	1757

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados moleculares (elevados valores de suporte) bem como a ausência de sinapomorfias morfológicas para Vorticellida e Operculariida ressaltam a necessidade de investigação de características morfológicas que sustentem estes grupos e a ampliação no número de sequências de representantes de outros gêneros e outras famílias ainda não sequenciadas. A busca por novos marcadores moleculares e por novos caracteres morfológicos que reflitam genuína divergência evolutiva e constituem outra futura linha de investigação para estudo da filogenia interna da subclasse Peritrichia.

O clado formado por membros do gênero *Opercularia* permaneceu monofilético mesmo com acréscimo de mais quatro representantes, indicando que a família Operculariidae deva ser um grupo natural e que sua irradiação adaptativa foi derivada a partir de um ancestral peritríqueo com área peristomial operculariforme. Caso mais estudos, utilizando outros marcadores filogenéticos, comprovem o clado *Opercularia* como grupamento natural, pode-se comprovar que apărto oral operculariforme apresenta-se como um bom marcador morfológico filogenético.

A novas sequências dos epistilídeos *Epistylis nympharum* e *Rhabdostyla inclinans* entre os “vorticelídeos”<sup>1</sup>, o clado formado pela maioria dos membros da família Epistylididae junto aos membros da família Zoothamniidae<sup>2</sup> e o clado formado por Operculariidae e dois epistilídeos (*Epistylis galea* e *Campanella umbellaria*) sugerem, definitivamente, que o gênero *Epistylis* é um grado, bem como ressaltam importante revisão taxonômica da família Epistylididae.

A posição filogenética de dois peritríqueos da família Epistylididae (*Epistylis nympharum* e *Rhabdostyla inclinans*) se agrupando entre representantes da família Vorticellidae reforçam topologias obtidas em trabalhos anteriores que caracteres morfológicos usados na sistemática tradicional como diagnose para Vorticellidae, tais como morfologia e forma de contração do pedúnculo e morfologia da área peristomial, não constituem bons caracteres diagnósticos.

A família Zoothamniidae agrupou-se em três clados bem distintos, indicando que esta família pode ser parafilética. Este resultado também sugere que características morfológicas

utilizadas para agrupar os membros desta família são bem menores quando comparadas com a diversidade genética das sequências do gene 18S-rDNA, visto que o 18S para esse grupo possui uma sequência muito conservada.

A posição filogenética de *Vainicola cystalina* como um grupo irmão de todos os outros representantes da ordem Vorticellida sugere a possibilidade da lórica representar um bom marcador morfológico filogenético. Entretanto, reconhecemos que para melhor elucidar esta questão seja requerido um estudo sobre a estrutura físico-química da lórica, assim como utilização de outros marcadores e aumento das sequências de peritríqueos lorizados ainda não sequenciados, como membros das famílias: Lagenophryidae e Rovinjellidae e outros membros da família Vaginicolidae.

O presente estudo propõe uma investigação das diversas populações de *Rhabdostyla inclinans* dos vários continentes a partir de uma caracterização multidisciplinar, a fim de comprovar que os vários morfotipos de *Rhabdostyla inclinans* pertençam à mesma espécie.

A espécie *Rhabdostyla inclinans* agrupou-se junto aos peritríqueos da família Vorticellidae. Caso haja uma persistência de várias espécies de *Rhabdostyla* entre os membros da família Vorticellidae através de sequências do 18S-rDNA e utilização de outros marcadores moleculares, provavelmente, uma revisão taxonômica do gênero será necessária.

Ao considerar *Rhabdostyla inclinans* como um membro da família Vorticellidae, sugere-se que população de *Rhabdostyla inclinans* foi derivada de um ancestral vorticelídeo com ciclo de vida polimórfico, tendo sofrido pressões seletivas que conduziram a convergência evolutiva atual com os epistilídeos.

A presença de glândulas secretoras de muco na epiderme de *Aeolosoma hemprichi* pode ter reduzido o sítio de localização do epibionte a cerda do hospedeiro, em especial, para porção serrilhada da serra, que conferia maior aderência ao telotróquio.

Como conclusão geral, os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma investigação filogenética aprofundada de algumas famílias e gêneros representantes da subclasse Peritrichia por meio da caracterização multidisciplinar, utilizando múltiplos marcadores moleculares, marcadores morfológicos, dados ecológicos e comportamentais são necessários para compreender a genuína irradiação evolutiva ocorrida entre os representantes destas famílias e gêneros.