



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Patrícia Pereira de Andrade

**Morfologia integrativa e revisão taxonômica de populações brasileiras de
Chaetonotus polyspinosus Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida:
Chaetonotidae)**

Integrative morphology and taxonomy of brazilian populations of *Chaetonotus polyspinosus*
Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)

Campinas

2020

PATRÍCIA PEREIRA DE ANDRADE

Morfologia integrativa e revisão taxonômica de populações brasileiras de *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)

Integrative morphology and taxonomy of brazilian populations of *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal, na área de Biodiversidade Animal.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology, in the area of Animal Biodiversity.

Orientador: PROF. DR. ANDRÉ RINALDO
SENNÁ GARRAFFONI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA PEREIRA
DE ANDRADE E ORIENTADA PELO PROF. DR.
ANDRÉ RINALDO SENNA GARRAFFONI

Campinas

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

An24m Andrade, Patrícia Pereira de, 1993-
Morfologia integrativa e revisão taxonômica de populações brasileiras de *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae) / Patrícia Pereira de Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: André Rinaldo Senna Garraffoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Meiofauna. 2. Perifiton. 3. Variação morfológica. 4. Delimitação de espécies. I. Garraffoni, André Rinaldo Senna, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Integrative morphology and taxonomy of brazilian populations of *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)

Palavras-chave em inglês:

Meiofauna

Periphyton

Morphological variation

Species delimitation

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

André Rinaldo Senna Garraffoni [Orientador]

Flávio Dias Passos

Luíza Ishikawa Ferreira

Data de defesa: 23-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0953-9841>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2333339708084053>

Campinas, 23 de novembro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. André Rinaldo Senna Garraffoni

Prof. Dr. Flávio Dias Passos

Dra. Luíza Ishikawa Ferreira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação da Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Dedico à minha família e companheiro por serem os maiores incentivadores dos meus estudos. Vocês foram essenciais para a conclusão dessa etapa da minha vida!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela infraestrutura oferecida durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UNICAMP, por colaborar com a minha qualificação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo FAPESP (2018/01242-1) pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos meus avós Doralice G. L. Andrade e Israel Pereira da Rocha, pais Ruth P. R. G. de Andrade e Paulo de Tarso G. de Andrade e irmãos Gabriela P. de Andrade e Vinicius P. de Andrade, obrigada por serem meus maiores incentivadores e por sempre me apoiarem. É uma honra fazer parte dessa família, amo vocês!

Ao meu amado, parceiro de vidas, Lucas Luciano, obrigada por me apoiar, ouvir e orientar durante esse período da minha vida, todo seu apoio foi essencial para mim. Obrigada por sempre me inspirar ao melhor, obrigada por nós! É um privilégio dividir a vida com você! Te amo!

Ao Prof. Dr. André R. S. Garraffoni pela orientação, apoio, paciência, conversas e principalmente compreensão em relação a questões pessoais, todos esses atributos foram de suma importância para que eu pudesse realizar o meu projeto.

Ao querido amigo Aramys Rocchetti de Mello Cesar pela amizade, companhia, conversas e boas risadas que são me proporcionadas desde a graduação. Um agradecimento especial pelas ilustrações desse trabalho. Você é o melhor! Amo você!

À querida amiga Kelly Fernanda Acosta pela amizade, auxílios em relação às questões teóricas sobre Gastrotricha, conversas e companhia de laboratório. Coqueta, você é muito especial para mim, quero levá-la por toda minha vida! Amo você!

À querida Dra. Renata Aparecida dos Santos Alitto pelo apoio, disposição e gentileza em relação à elaboração da Análise de Discriminantes Lineares, fundamental ao trabalho.

Ao estimado Guilherme Augusto Alves pela amizade, conversas, orientações e auxílios nas matérias do mestrado.

À Marina Prado Melchior por gerar as primeiras informações do presente estudo.

Ao Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas e aos integrantes do Laboratório de Borboletas (LABOR) por terem coletado amostras na região de Mucugê-BA, importante ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Evolução de Organismos Meiofaunais (LEOM), em especial aos queridos Dr. Thiago Quintão Araújo e Axell Kou Minowa por ajudas técnicas com o Photoshop e auxílio com o conhecimento teórico de Gastrotricha.

À Banca de Qualificação, constituída pelos professores: Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Luíza Ishikawa Ferreira e Dr. Flávio Dias Passos, que contribuiram grandemente com orientações e sugestões ao presente estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Já demos um enorme passo em direção à ciência e à tecnologia, invadimos o espaço em busca das estrelas, invadimos as células em busca da vida... deixamo-nos envolver pela euforia de quem não sabia nada e, de repente, aporta na lua e estende a visão para o infinito, procurando encontrar outros planetas para saber da existência de seres em lugares distantes. Deixamo-nos envolver pela euforia de quem consegue penetrar a molécula “da vida” pensando ter descoberto o segredo dessa mesma vida. Mas esquecemos de fazer a mais importante das viagens, em busca de nós mesmos.”

(Hebe Laghi de Souza)

RESUMO

O filo Gastrotricha é representado por pequenos metazoários aquáticos encontrados em diversos ecossistemas pelo mundo todo. Este táxon possui mais de 860 espécies, mas o conhecimento sobre sua diversidade é ainda muito subestimado. As primeiras descrições dos gastrótricos, do final do séc. XIX e início de XX carecem de informações morfológicas, que hoje são consideradas fundamentais para uma confiável delimitação das espécies. Além disso, devido ao baixo número de espécimes estudados, dificilmente era mencionada a existência de possíveis variações morfológicas nas populações amostradas. Neste cenário, apesar da existência de variações morfológicas nas distintas ornamentações cuticulares entre indivíduos coletados na Europa e no Brasil, estes eram considerados como pertencentes à mesma espécie. Como exemplo, pode-se mencionar a espécie *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae), descrita originalmente para a Europa e registrada no Brasil em conjunto com outras três formas semelhantes conhecidas como *C. aff. polyspinosus* I, *C. aff. polyspinosus* II e *C. aff. polyspinosus* III. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a variação morfológica dos espécimes brasileiros e europeus para definir se existe apenas uma espécie ou trata-se de um complexo contendo pelo menos duas espécies diferentes. Para isso, foi utilizada uma abordagem múltipla, baseada na conjunção da morfologia e morfometria, através de técnicas como a microscopia de luz com contraste de interferência diferencial (DIC em inglês), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de discriminantes lineares (LDA em inglês). A partir dos resultados obtidos, foram encontrados seis morfotipos, de acordo com a análise morfológica, dos quais dois representam espécies já descritas: *C. polyspinosus* e *C. ventrochaetus*. A LDA, estabeleceu nove grupos, considerando os espécimes morfológicamente similares à espécie do estudo, retirados da literatura, e discriminou três deles, sendo: os representantes europeus de *C. polyspinosus*, *C. ventrochaetus* e *C. pseudopolyspinosus*, corroborando com a análise morfológica dos espécimes coletados e analisados neste estudo, que também distinguiu *C. polyspinosus* e *C. ventrochaetus*. Outros seis grupos da LDA, dos quais quatro são constituídos pelas espécies candidatas estabelecidas neste trabalho, não foram segregados pela análise, contudo, com base na hipótese de proximidade morfológica foi possível segregá-los na análise morfológica. Desse modo, o presente estudo fornece dados que futuramente poderão complementar estudos moleculares, proporcionando melhor delimitação das unidades evolutivas.

Palavras-chave: Meiobentos. Perifíton. Morfologia integrativa. Delimitação de espécie.

ABSTRACT

The gastrotricha phylum is represented by small aquatic metazoans found in diverse ecosystems around the world. This taxon has more than 860 species, but the knowledge about its diversity is still underestimated. The first descriptions of gastrotrichs, from the end of the 19th century and beginning of the 20th century lack morphological information, which today is considered fundamental for a reliable delimitation of species. In addition, due to the low number of specimens studied, it was difficult to mention the existence of possible morphological variations in the sampled populations. In this scenario, despite the existence of morphological variations in the different cuticular ornaments between individuals collected in Europe and Brazil, they were considered to belong to the same species. As an example, we can mention the species *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae), originally described for Europe and registered in Brazil together with three other similar forms known as *C. aff. polyspinosus* I, *C. aff. polyspinosus* II and *C. aff. polyspinosus* III. Thus, the objective of this work was to investigate the morphological variation of Brazilian and European specimens to define whether there is only one species or it is a complex containing at least two different species. For this, a multiple approach was used, based on the combination of morphology and morphometry, using techniques such as light microscopy with Differential Interference Contrast (DIC), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Linear Discriminant Analysis (LDA). From the results obtained, six morphotypes were found, according to the morphological analysis, of which two represent species already described: *C. polyspinosus* and *C. ventrochaetus*. The LDA established nine groups, considering specimens morphologically similar to the species of the study, taken from the literature, and highlighted three of them, being: European representatives of *C. polyspinosus*, *C. ventrochaetus* and *C. pseudopolyspinosus*, corroborating with the morphological analysis of the collected and analyzed specimens in this study, which also distinguished *C. polyspinosus* and *C. ventrochaetus*. Another six groups of the LDA, of which four are constituted by the candidate species established in this work, were not segregated by the analysis, however, based on the hypothesis of morphological proximity it was possible to segregate them in the morphological analysis. Thus, the present study provides data that in the future may complement molecular studies, providing a better definition of the evolutionary units.

Keywords: Meiobenthos. Periphyton. Integrative morphology. Species delimitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ilustração esquemática das estruturas externas de *Chaetonotus* sp. Visão dorsal. Adaptado de Kolicka (2017).....21
- Figura 2.** Localização dos pontos de coleta nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, Brasil. 1. Represa do Broa, São Carlos; 2. Lagoa Urbana, Paulínia; 3. (a) Lagoa urbana, Faculdade de Educação Física, Unicamp e (b) Lagoa do Taquaral, Campinas; 4. (a) Córrego Soberbo e (b) Córrego Água Limpa, Diamantina; 5. Córrego, Mucugê.....26
- Figura 3.** Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Habitus, visão dorsal; **B** região cefálica visão dorsolateral; **C** região anterior visão dorsal; **D** região mediana do corpo visão dorsal; **E** região posterior vista dorsal; **F** região posterior visão interna. Legenda: **ab** anel bucal; **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **el** espinho lateral; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. **Escalas** A 50 µm; **B, C, D, E, F** 20 µm.....34
- Figura 4.** Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Habitus, visão ventral; **B** região cefálica visão ventrolateral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior vista ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo; **ts** tufo sensorial. **Escalas** A 50 µm; **B, C** 10 µm; **D, E** 15µm.....35
- Figura 5.** Ilustração esquemática de *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e dois pares com três escamas menores, providas com espinhos que ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.....36
- Figura 6.** Micrografia de luz - DIC da EC1. **A** Habitus, visão dorsal; **B** região cefálica visão interna; **C** região anterior visão dorsal; **D** região mediana do corpo visão dorsal; **E** região posterior vista dorsal; **F** região posterior visão interna. Legenda: **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **el** espinho lateral; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. **Escalas** A 50 µm; **B** 20 µm; **C, D** 15 µm; **E, F** 10 µm.....39
- Figura 7.** Micrografia de luz - DIC da EC1. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior vista ventral.

Legenda: **bo** boca; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. **Escalas** A 15 μm ; **B, C, D** 10 μm40

Figura 8. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC1. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalion; **bo** boca; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C** 5 μm41

Figura 9. Ilustração esquemática da EC1. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e dois pares com três escamas menores, providas com espinhos que ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.....41

Figura 10. Micrografia de luz - DIC da EC2. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região posterior vista dorsal. Legenda: **bo** boca; **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C, D** 10 μm45

Figura 11. Micrografia de luz - DIC da EC2. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior visão interna; **E** região posterior visão ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **e** -escama- par de escamas localizadas no centro da base da furca, providas com espinhos longos; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. **Escalas A, D, E** 10 μm ; **B, C** 20 μm46

Figura 12. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC2. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior vista dorsolateral. Legenda: **ab** anel bucal; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C** 5 μm47

Figura 13. Ilustração esquemática da EC2. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal e par de escamas com espinhos no centro da base da furca, visão interna; **B** Escamas terminais pareadas e dois pares com cinco escamas menores providas com espinhos que não ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.....47

Figura 14. Micrografia de luz - DIC da EC3. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região posterior vista dorsal.

Legenda: **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. **Escalas A, B, C, D** 15 μm51

Figura 15. Micrografia de luz - DIC da EC3. **A** habitus; **B** região cefálica visão ventral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior visão ventral; **F** região posterior visão interna. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **esp** -espinho- seis pequenas escamas providas com espinhos que ultrapassam seu limite; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. **Escalas A** 50 μm ; **B, E, F** 15 μm ; **C, D** 20 μm52

Figura 16. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC3. **A** região cefálica visão dorsal; **B** região mediana do corpo visão dorsal. Legenda: **c** cefalion; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura. **Escalas A, B** 5 μm53

Figura 17. Ilustração esquemática da EC3. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas seguidas com dois pares de três escamas, visão ventral; presença de seis pequenas escamas menores providas com espinhos que ultrapassam seu limite, visão interna; **C** escama dorsal; **D** escama da região interciliar, do campo intestinal. Em tracejado: tubos adesivos.....54

Figura 18. Micrografia de luz - DIC da EC4. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D, E** região posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **f** faringe; **hip** hipopleura. **Escalas A, B** 20 μm ; **C, D, E** 10 μm57

Figura 19. Micrografia de luz - DIC da EC4. **A** habitus; **B** região cefálica visão ventral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior visão ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada. **Escalas A** 50 μm ; **B, C, D** 10 μm ; **E** 15 μm58

Figura 20. Ilustração esquemática da EC4. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e pequenas escamas com espinhos que não ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal; **D** escama da região interciliar, do campo intestinal. Em tracejado: tubos adesivos.....59

Figura 21. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região

posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. **Escalas A, B, C, D** 20 µm.....63

Figura 22. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior visão ventral. Legenda: **bo** boca; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **el** espinho lateral; **esf** espinho furcal. **Escalas A, B, C, D** 15 µm.....64

Figura 23. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior visão dorsolateral. Legenda: **bo** boca; **c** cefalion; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C** 5 µm.....65

Figura 24. Ilustração esquemática de *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** Conjunto de escamas e espinhos dorsais e ventrais da base da furca; **B** escama dorsal; **C** escama da região interciliar, da faringe. Em tracejado: espinhos ventrais da base da furca e tubos adesivos.....65

Figura 25. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região cefálica. **A** EC1, visão dorsolateral; **B** EC2, visão dorsolateral; **C** EC3, visão dorsal; **D** *Chaetonotus ventrochaetus*, visão dorsolateral. Legenda: **ab** anel bucal; **bo** boca; **c** cefalion; **epi** epipleura; **hip** hipopleura; **h** hipostômio. **Escalas A, B, C, D** 5 µm.....66

Figura 26. Micrografia de luz – DIC Região mediana do corpo, visão dorsal. **A** *Chaetonotus polyspinosus*; **B** EC1; **C** EC2; **D** EC3; **E** EC4; **F** *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **edt** escama dorsal do tronco. **Escalas A, B, C, D, E, F** 2 µm.....67

Figura 27. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região mediana do corpo, visão dorsal. **A** EC1; **B** EC2; **C** EC3; **D** *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **edt** escama dorsal do tronco. **Escalas A, B, C, D** 2 µm. Colorido artificialmente.....68

Figura 28. Micrografia de luz - DIC Região posterior do corpo. **A** espinho furcal visão dorsal *Chaetonotus polyspinosus*; **B** espinho furcal visão dorsal, EC1; **C** espinho furcal visão dorsal, EC2; **D** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, *Chaetonotus polyspinosus*; **E** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, EC1; **F** par de escamas quilhadas localizadas no centro da base da furca visão interna, EC2; **G** escama terminal pareada e dois pares com cinco pequenas escamas, EC2; **H** espinho furcal visão dorsal, EC3; **I** espinho furcal visão dorsal, EC4; **J** espinho furcal visão

dorsal, *Chaetonotus ventrochaetus*; **K** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, EC3; **L** seis pequenas escamas providas com espinhos que ultrapassam seu limite, localizadas no centro da base da furca visão interna, EC3; **M** escama terminal pareada e conjunto de pequenas escamas visão ventral, EC4; **N** espinho furcal visão ventral, *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **e** escama; **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada. **Escalas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N** 10 µm.....69

Figura 29. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região posterior. **A** EC1, visão dorsal; **B** EC2, visão dorsolateral; **C** *Chaetonotus ventrochaetus*, visão dorsolateral. Legenda: **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C** 5 µm.....70

Figura 30. Gráfico da Análise de Discriminantes Lineares: Eixos 1 e 2 da análise baseada em vinte e três características morfológicas, utilizando espécimes brasileiros e europeus (Ver Material e Métodos para a definição das características morfológicas e Material Suplementar 2 para a análise morfométrica). grupo 1 EC1 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* I; grupo 2 *Chaetonotus polyspinosus* do Brasil; grupo 3 EC2 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* II; grupo 4 EC3; grupo 5 *Chaetonotus ventrochaetus*; grupo 6 EC4 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* III; grupo 7 *Chaetonotus polyspinosus* da Europa; grupo 8 *Chaetonotus pseudopolyspinosus*; grupo 9 *Chaetonotus breviacanthus*. **Localidades: a** São Carlos; **b** Paulínia; **c** Campinas; **d** Reserva da Juréia; **e** Diamantina; **f** Pará; **g** Mato Grosso do Sul; **h** Mucugê; **i** Polônia; **j** Suécia.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos locais amostrados no presente estudo com suas respectivas características ambientais e coordenadas geográficas.....	25
Tabela 2. Características morfométricas de <i>Chaetonotus polyspinosus</i> , N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	33
Tabela 3. Características morfométricas da EC1, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	38
Tabela 4. Características morfométricas da EC2, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	44
Tabela 5. Características morfométricas da EC3, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	50
Tabela 6. Características morfométricas da EC4, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	56
Tabela 7. Características morfométricas de <i>Chaetonotus ventrochaetus</i> , N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (µm).....	62
Material suplementar 1. Características morfológicas de <i>Chaetonothus polyspinosus</i> do Brasil, das espécies candidatas (EC1, EC2, EC3 e EC4) e de <i>Chaetonotus ventrochaetus</i>	85
Material suplementar 2. Morfometria de <i>Chaetonothus polyspinosus</i> do Brasil, das espécies candidatas (EC1, EC2, EC3 e EC4), <i>Chaetonotus ventrochaetus</i> brasileiros, e representantes da literatura.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DIC- Differential Interference Contrast: Contraste de Interferência Diferencial

EC- Espécie Candidata

G- Grupo

LDA- Linear Discriminant Analysis: Análise de Discriminantes Lineares

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Características gerais do Filo Gastrotricha.....	19
1.2. Complexo de espécie em Gastrotricha e <i>Chaetonotus polyspinosus</i> Greuter, 1917.....	21
1.3. Morfologia das formas brasileiras.....	22
1.4. Delimitação de espécie e morfologia integrativa.....	23
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Coleta, triagem e identificação dos espécimes.....	24
3.2. Análise ao Microscópio de Luz (ML).....	27
3.3. Escalas e Medida U.....	27
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
3.5. Análise morfométrica.....	28
4. RESULTADOS	30
4.1. <i>Chaetonotus polyspinosus</i> (Greuter, 1917).....	30
4.2. EC1.....	36
4.3. EC2.....	42
4.4. EC3.....	48
4.5. EC4.....	54
4.6. <i>Chaetonotus ventrochaetus</i> (Kisielewski, 1991).....	60
4.7. Análise morfométrica.....	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	83
8.1 Anexo 1 - Declaração de Bioética e Biossegurança.....	83
8.2 Anexo 2 - Declaração de Direitos Autorais.....	84
Material suplementar 1	85
Material suplementar 2	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais do Filo Gastrotricha

Gastrotricha são microinvertebrados componentes da meiofauna- uma definição operacional de organismos aquáticos móveis, com base em sua retenção em uma malha de peneiras entre 44 e 500 mm (Giere, 2009) - de ambientes marinhos e de água doce, que apresentam de 0,06 a 3,5 mm de comprimento (Araújo & Garraffoni, 2010; Balsamo *et al.*, 2014). Estes organismos vivem entre espaços intersticiais de sedimentos soltos ou associados a raízes de plantas aquáticas (Balsamo *et al.*, 2014), sendo que em habitats de água doce, eles estão entre os cinco táxons mais comuns, com densidades de até 158 indivíduos por 10 cm² (Balsamo & Todaro, 2002).

O nome Gastrotricha (do grego *gaster*, estômago; *trichos*, pelo) refere-se à presença de cílios distribuídos ventralmente desde a cabeça até a porção final do corpo, que são utilizados na locomoção desses organismos (Hochberg & Litvaitis, 2000a). Tipicamente, o corpo é dorsalmente arqueado, ventralmente plano e é dividido em uma cabeça e um tronco alongado. Externamente, no tronco há vários arranjos de espinhos e outras ornamentações cuticulares (escamas e quilhas) que apresentam uma imensa variação quanto à forma e disposição (Ruppert, 1991). A cutícula externa do corpo é formada por várias camadas, sua composição é principalmente proteica e não contém quitina. A cobertura cuticular se estende por todo o corpo, incluindo tubos adesivos e cílios locomotores e sensoriais (Balsamo *et al.*, 2014).

Esses metazoários alimentam-se de pequenas partículas orgânicas, vivas ou mortas, como protozoários e bactérias, por meio de uma faringe bombeadora conectado a uma boca anterior. São hermafroditas e a transferência de espermatozoide é direta ou são fêmeas paternogênicas, como ocorre na maioria dos representantes dulcícolas (Weiss & Levy, 1979; Hochberg & Litvaitis, 2000a; Weiss, 2001). As espécies de água doce produzem tanto ovos de desenvolvimento rápido com cascas finas quanto, ovos de resistência com cascas espessas, que resistem a condições ambientais severas (Ruppert 1991).

O filo é considerado monofilético por compartilhar as seguintes características morfológicas: (I) cutícula com multicamada, (II) cílios motores e sensoriais envolvidos por epicutículas, (III) glândulas adesivas com saída dupla coberta por cutículas únicas e (IV) músculos helicoidais (Todaro *et al.*, 2006; Kieneker *et al.*, 2008). Os gastrótricos são representados por 860 espécies e dividem-se em duas ordens: Chaetonotida Remane, 1925 e Macrodasyida Remane, 1925 (Kånneby, 2011; Kolicka *et al.*, 2016; Todaro, 2020).

Macrodasyida são representados por cerca de 377 espécies de vermes majoritariamente marinhos (e.g. Garraffoni *et al.*, 2019a) com tubos adesivos distribuídos ao longo do corpo e Chaetonotida apresenta mais de 483 espécies que têm o corpo estreito na região cefálica e grosso na porção posterior ou em “forma de boliche” e povoam ambientes de água doce, são distribuídos em oito famílias e 30 gêneros (Hochberg & Litvaitis, 2000a; Balsamo *et al.*, 2008, Kieneke *et al.*, 2008; Todaro, 2020).

A família Chaetonotidae é a mais especiosa dentro dos Gastrotricha sendo constituída por 13 gêneros e aproximadamente 400 espécies (Kånneby *et al.*, 2013). As relações de parentesco bem como a validade taxonômica da família e da maioria dos seus subgrupos ainda não foram suficientemente compreendidas (Hochberg & Litvaitis, 2000; Kieneke *et al.*, 2008; Kånneby *et al.*, 2013; Kånneby & Todaro, 2015; Garraffoni *et al.*, 2017).

O gênero *Chaetonotus* Ehrenberg, 1830 é constituído por mais de 200 espécies representantes e a classificação baseia-se na variação dos espinhos e escamas. Esse grupo é reconhecidamente não monofilético, como observado em vários trabalhos que utilizaram tanto marcadores moleculares quanto morfológicos na tentativa de reconstruir as relações de parentesco entre as espécies da família Chaetonotidae (Kieneke *et al.*, 2008; Kånneby *et al.*, 2013; Kånneby & Todaro, 2015; Kolicka *et al.*, 2016; Garraffoni *et al.*, 2017).

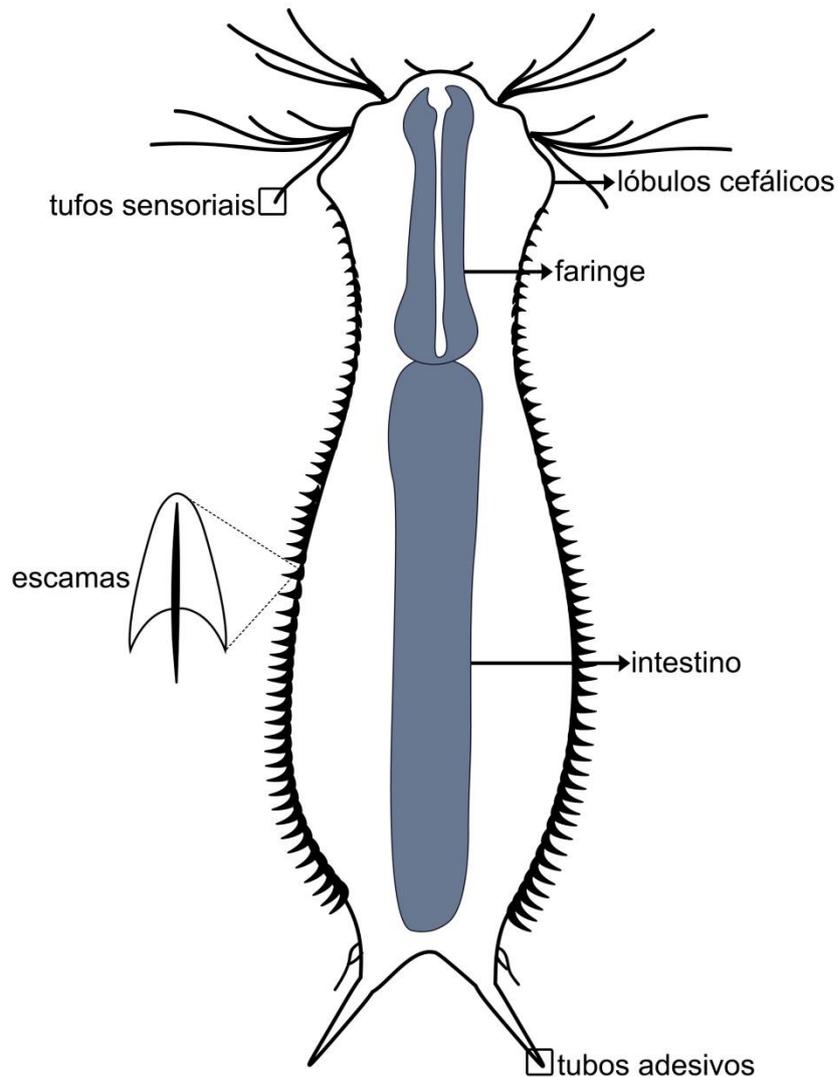


Figura 1. Ilustração esquemática das estruturas externas de *Chaetonotus* sp. Visão dorsal. Adaptado de Kolicka (2017).

1.2. Complexo de espécie em *Gastrotricha* e *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917

Membros da meiofauna são caracterizados por terem: corpo pequeno, movimentação restrita, ciclo de vida curto e ausência de estágio larval planctônico, sugerindo que os padrões de distribuição desses espécimes sejam restritos (Higgins & Thiel, 1988; Giere, 2009). Todavia, muitos estão espalhados pelo globo, essa aparente contrariedade é conhecida como "paradoxo da meiofauna" (Giere, 2009). Esse status de "cosmopolita" pode ter levado ao "agrupamento" mundial de muitas espécies morfológicamente semelhantes (Klautau *et al.*,

1999), levando a formação de complexos de espécies, que são duas ou mais espécies com características semelhantes e geralmente associados a um habitat. Desse modo, pode haver dificuldades relacionadas à identificação das espécies integrantes de complexos desta natureza (Absalão & Roberg, 1999).

Estudos sobre gastrótricos dulcícolas realizados no Brasil, levantaram a possibilidade de complexos de espécies em Gastrotricha, visto que em muitos casos, observaram-se variações em indivíduos da mesma espécie, quando comparados aos representantes europeus (Kisielewski, 1991; Kånneby & Todaro, 2012). Como exemplo, Kisielewski (1991) registrou pela primeira vez na América do Sul a espécie *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917, que condiz em todas as características com o representante europeu, a qual ele intitulou de “forma tipo”. Além desta, Kisielewski (1991) descreveu outras três formas muito semelhante e com aparente pouca variação morfológica, denominadas de *C. aff. polyspinosus* I, *C. aff. polyspinosus* II e *C. aff. polyspinosus* III.

O gastrótrico de água doce *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917, é pentalobado e o indivíduo adulto mede cerca de 341 µm de comprimento. Apresenta dois pares de tufo ciliares e escamas subtriangulares com espinho fino e simples. Os tubos adesivos têm 25 µm de comprimento com 10 espinhos em cada lado da base da furca (estrutura bifurcada provida com órgãos adesivos, localizada na porção terminal do corpo) (Kisielewski, 1991). É típico de ambientes eutróficos, descrito na Europa, foi relatado em muitos países europeus (França, Grã-Bretanha, Itália, Polônia, Romênia, Rússia, Suíça) e também no Canadá, Brasil, Israel e Coreia (Grilli *et al.*, 2010). No Brasil a espécie e as formas foram descritas com local de ocorrência no Mato Grosso do Sul- MS, Pará- PA, Reserva da Juréia- SP e São Carlos- SP (Kisielewski, 1991).

1.3. Morfologia das formas brasileiras

Em comparação as formas brasileiras de *Chaetonotus polyspinosus*, a forma I apresenta os espinhos dorsais mais curtos e mais finos e os espinhos das escamas da região terminal também são mais curtos, atingindo o comprimento de 1 µm. Por outro lado, a forma II é a menor encontrada no Brasil. Para o seu comprimento corporal, o cefalio (lóbulo presente na porção anterior da cabeça) é maior, enquanto a epipleura (lóbulo lateral anterior da cabeça) é menor. Por fim, a forma III tem o corpo delgado com 294-346 µm de comprimento, o cefalio

é longo e excepcionalmente largo (33-37,5 µm de largura). Apenas a hipopleura (lóbulo lateral posterior da cabeça) forma o seu contorno, aparentando constituir-se de três lóbulos, no entanto, a cabeça é realmente formada por cinco lóbulos. Além disso, a faringe da forma III é um pouco mais curta em relação à forma brasileira de *Chaetonotus polyspinosus* (73-82 µm em comparação com 96-99 µm) e espinhos muito mais curtos (5,5 µm em comparação com 19,8 µm) (Kisielewski, 1991).

1.4. Delimitação de espécie e morfologia integrativa

A maioria dos biólogos concorda que a espécie é uma unidade natural fundamental e sua delimitação é essencial para a descoberta de diversidade da vida e na elaboração de qualquer estudo sobre a biodiversidade (Mayr 1982, 2005).

Winston (1999) agrupou cinco principais conceitos de espécie: fenético, biológico, filogenético, ecológico e coesivo. Cada conceito de espécie adota uma propriedade diferente para defini-las e de acordo com o conceito abordado geram-se diferentes conclusões sobre quais linhagens devem ser reconhecidas como espécie (de Queiroz, 2005). Segundo Platnick (1979), podemos tratar espécies como hipóteses sobre padrões históricos de distribuição de caracteres baseadas em teorias de transformação do caráter e se basearmos hipóteses de espécies em distribuições de caracteres observáveis e testáveis, evita-se a estreiteza associados a espécies delimitadas por processos particulares (Wheeler, 2007).

Durante os últimos anos, vários novos métodos para delinear e testar hipóteses de espécies foram desenvolvidos (Sites & Marshall, 2003), os mais sofisticados permitem investigações estruturais mais detalhadas, por exemplo, técnicas microscópicas avançadas, como contraste de interferência diferencial (DIC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal.

Em Gastrotricha a taxonomia tradicional compreende uma abrangente descrição e representação de estruturas superficiais dorsais e ventrais, como os padrões: cuticulares, dos cílios, dos tubos adesivos e da anatomia interna. Com o emprego de técnicas microscópicas atuais é possível fornecer evidências adicionais que apoiem ou refutem a hipótese da respectiva espécie, sendo essencial para representação da variabilidade morfológica e para uma delimitação confiável (Kieneke & Nikoukar, 2017).

Desta forma, os táxons delimitados com base em uma abordagem múltipla são mais bem definidos, e conseqüentemente, as hipóteses construídas são mais suportadas, não deixando dúvidas sobre seus limites. Por outro lado, espécies mal definidas conduzem a respostas incorretas, o que evidencia a importância de uma abordagem integrativa. Assim, o desafio científico para o futuro da taxonomia é delimitar espécies de uma maneira que melhor reflita a biodiversidade existente na natureza (Dayrat, 2005).

Kisielewski (1991) fez as observações taxonômicas e as respectivas ilustrações de cada forma de *Chaetnotus polyspinosus* Greuter, 1917 descritos para o Brasil, indicando as variações existentes entre as formas do grupo de espécies. Nesse sentido, um ponto importante a ser realizado pelo presente estudo é compreender as variações das estruturas homólogas dos espécimes, através de um estudo mais aprofundado da morfologia e verificar se tratam de variações interespecíficas ou intraespecíficas. Assim, poderão ser relevadas unidades evolutivas, contribuindo para maior conhecimento das espécies de gastrótricos do Brasil, reduzindo a problemática do complexo de espécies, que implica na falta de conhecimento sobre a diversidade biológica.

2. OBJETIVO

Investigar a variação morfológica das populações brasileiras de *Chaetnotus polyspinosus* Greuter, 1917 a partir da utilização de técnicas morfológicas integrativas (DIC, MEV e LDA), para definir se existe apenas uma espécie ou trata-se de um complexo contendo pelo menos duas espécies diferentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, triagem e identificação dos espécimes

O material analisado foi coletado em sete diferentes locais amostrais, nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia (**Tabela 1, Figura 2**).

Tabela 1. Lista dos locais amostrados no presente estudo com suas respectivas características ambientais e coordenadas geográficas.

Ponto	Estado	Local	Ambiente	Latitude	Longitude
1	São Paulo (SP)	Cidade de São Carlos, na represa do Broa	Lêntico e areia fina	22°11'21"S	47°52'56"W
2	São Paulo (SP)	Cidade de Paulínia, lagoa urbana	Lêntico, vegetação flutuante com <i>Echhornia</i> sp	22°47'38"S	47°08'44"W
3 (a)	São Paulo (SP)	Cidade de Campinas, lago localizado na Faculdade de Educação Física / Universidade Estadual de Campinas	Lêntico, com folha e perifíton	22°48'44.7"S	47°04'18.5"W
3 (b)	São Paulo (SP)	Cidade de Campinas, Lagoa do Taquaral	Lêntico	22°52'29.59"S	47°03'00.01"W
4 (a)	Minas Gerais (MG)	Cidade de Diamantina, córrego Soberbo	Lótico com areia grossa e cascalho	18°11'40"S	43°34'00"W
4 (b)	Minas Gerais (MG)	Cidade de Diamantina, Córrego Água Limpa	Lótico com areia grossa e cascalho	18°12'53"S	43°37'02"W
5	Bahia (BA)	Cidade de Mucugê, no córrego do Mucugêzinho	Substrato arenoso/rochoso	13°00'31.6"S	41°22'19.7"W

A camada superior dos sedimentos de fundo; a água e partículas entre as raízes de plantas aquáticas; ou perifíton de folhas e troncos foram recolhidos manualmente, de maneira aleatória, e colocados em recipientes plásticos de 6000 cm³. Posteriormente foram transferidos e armazenados no Laboratório de Evolução de Organismos Meiofaunais (LEOM) da Universidade Estadual de Campinas, onde foram mantidos sob aeração constante e a uma temperatura em torno de 20°C. A triagem foi feita no menor tempo possível devido à fragilidade dos corpos dos gastrótricos (Higgins & Thiel, 1988; Giere 2009; Garraffoni & Araújo, 2010). Para a triagem, a amostra foi colocada em uma placa de Petri para ser analisada em um estereomicroscópio ZEISS Stemi 2000.

Os gastrótricos vivos costumam ser móveis, de modo que sua identificação requer o isolamento dos indivíduos para serem observados *in vivo* e/ou depois da fixação. Na observação *in vivo*, os indivíduos foram separados manualmente da amostra com o auxílio de uma micropipeta, transferidos para pequenos frascos de vidro (*embryo dishes*) contendo água destilada e anestesiados utilizando a solução aquosa MgCl₂ 2%, que bloqueiam todos os movimentos ciliares, imobilizando os espécimes e facilitando sua remoção do sedimento,

especialmente dos sedimentos arenosos (d'Hondt, 1967a; Forneris, 1985; Higgins & Thiel, 1988; Giere, 2009). Posteriormente, os espécimes foram transferidos para uma lâmina sob lamínula e observados no microscópio de luz. Caso os espécimes não degradassem ou fossem perdidos durante as observações, eles seriam fixados em glutaraldeído diluído em tampão cacodilato a 4°C para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Garraffoni *et al.*, 2019b).



Figura 2. Localização dos pontos de coleta nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, Brasil. 1. Represa do Broa, São Carlos; 2. Lagoa Urbana, Paulínia; 3. (a) Lagoa urbana, Faculdade de Educação Física, Unicamp e (b) Lagoa do Taquaral, Campinas; 4. (a) Córrego Soberbo e (b) Córrego Água Limpa, Diamantina; 5. Córrego, Mucugê.

3.2. Análise ao Microscópio de Luz (ML)

Os gastrótricos foram observados sob o microscópio de luz ZEISS Axio Imager M2 equipado com Contraste de Interferência Diferencial (Differential Interference Contrast, DIC), câmera AxioCam MRC5 acoplada e com o programa AxioVision foi possível obter as imagens e medidas com diferentes magnificações para que se possa fazer uma descrição morfológica detalhada do corpo e especialmente da distribuição e formato das escamas e espinhos ao longo do tronco ventral e dorsal.

3.3. Escalas e Medida do “U”

Nas fotos foram adicionadas as escalas correspondentes a cada aumento e depois houve a elaboração de pranchas das imagens e a medição de determinadas estruturas, com auxílio dos programas Image J para as medições e Photoshop para a construção das pranchas.

Para a comparação dos caracteres dos espécimes, o comprimento total e a posição dos órgãos foram descritos em (%) em relação à unidade corporal, ou seja, o comprimento total a partir da região anterior (U00) para a posterior (U100) será de 100 unidades (Hummon *et al.*, 1992). A descrição foi dividida de acordo com a região do corpo da parte cefálica até os tubos adesivos.

3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realizar os procedimentos da Microscopia Eletrônica de Varredura, os espécimes foram inicialmente tratados 2x em 0,1 M de tampão cacodilato (phosphate buffered saline, PBS), posteriormente foram submetidos ao processo de desidratação alcoólica (20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95% e 100%) e ao final, a secagem foi realizada utilizando a substância química HMDS (hexamethyldisilazane) (Hochberg & Litvaitis, 2000b). As amostras secas são extremamente higroscópicas e, portanto, foram imediatamente metalizadas, isto é, revestidas com uma camada metálica fina e condutora (ouro, ouro-paládio) sobre *stubs* de alumínio. A metalização foi feita pela técnica do Sputter e a análise foi realizada no Centro de Microscopia da Universidade Estadual de Campinas. O material foi e analisado no microscópio JSM 5800 LV, com a voltagem de 15 kV.

3.5. Análise morfométrica

Os dados morfométricos foram analisados por meio de Análises de Discriminantes Lineares (ADL), Linear Discriminant Analysis (LDA), em inglês. Este teste estatístico é tradicionalmente aplicado para um conjunto de dados com duas ou mais observações para cada espécime (por exemplo, várias medições morfométricas diferentes da mesma amostra) (Dytham, 2011).

As seguintes estruturas anatômicas externas foram medidas: (d1) comprimento do corpo; (d2) comprimento total da furca; (d3) comprimento da faringe; (d4) comprimento das escamas dorsais do tronco; (d5) comprimento dos espinhos dorsais do tronco; (d6) comprimento das escamas dorsais do pescoço; (d7) comprimento dos espinhos dorsais do pescoço; (d8) comprimento do maior espinho dorsal da base da furca; (d9) diâmetro do anel da boca; (d10) comprimento do cefalion; (d11) largura do cefalion; (d12) número total de fileiras longitudinais alternadas; (d13) número de escamas em uma única fileira longitudinal; (d14) número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal); (d15) comprimento do par que escamas terminais; (d16) largura do par de escamas terminais; (d17) comprimento das quilhas do par de escamas terminais; (d18) maior espinho interno da base da furca (dorso); (d19) comprimento da escama ventral da base da furca; (d20) comprimento do espinho ventral da base da furca; (d21) comprimento dos espinhos centrais da base da furca; (d22) largura da epipleura; (d23) largura da hipopleura; (d24) comprimento da escama da região interciliar; (d25) comprimento do espinho da região interciliar. Todas as medições foram feitas utilizando o programa AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss Microscopy, Alemanha).

Como essa análise necessita a delimitação de grupos a priori, também chamada de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) (Sokal & Sneath, 1963), a partir das comparações dos espécimes das várias localidades brasileiras e utilizando a hipótese de proximidade morfológica, foram estabelecidos 9 grupos distintos, dos quais 6 grupos são constituídos pelas espécies candidatas encontradas nesse estudo (ver resultados).

Ao total, foram utilizadas medidas de 25 características morfológicas de 42 indivíduos que integraram os grupos da análise, sendo 27 espécimes brasileiros e 15 espécimes retirados da literatura, originado: **G1**: EC1 e *C. aff. polyspinosus* I (Kisielewski, 1991); **G2**: *Chaetonotus polyspinosus* (Greuter, 1917) do presente estudo e *Chaetonotus polyspinosus* de Kisielewski (1991); **G3**: EC2 e *C. aff. polyspinosus* II (Kisielewski, 1991); **G4**: EC3; **G5**: *Chaetonotus ventrochaetus* do presente estudo e de Kisielewski (1991); **G6**: EC4 e *C. aff.*

polyspinosus III (Kisielewski, 1991); **G7**: espécimes europeus de *Chaetonotus polyspinosus* (Kisielewski, 1980 e Kånneby, 2013); **G8**: espécimes de *Chaetonotus pseudopolyspinosus* (Kisielewski, 1991); **G9**: espécimes de *Chaetonotus breviacanthus* (Kisielewski, 1991).

Vale destacar que identificamos espécimes com características de *Chaetonotus ventrochaetus* e em função da similaridade morfológica, principalmente das características: forma das escamas dorsais, origem e tamanho dos seus respectivos espinhos e número de espinhos longos dorsais e ventrais da base da furca, os agrupamos com a espécie de Kisielewski (1991), constituindo G5.

Já G8 é representado pela espécie *Chaetonotus pseudopolyspinosus*, que enriquece o grupo intimamente relacionado com *Chaetonotus polyspinosus*, mas difere em morfologia das escamas, sendo mais estreitas e também, na distribuição de espinhos longos na base da furca.

Assim, foi realizada a análise para testar a coesão dos grupos pré-definidos utilizando as medidas obtidas dos espécimes brasileiros (por esse trabalho e por Kisielewski, 1991) e medidas dos espécimes europeus (por Kisielewski, 1980, 1991 e Kånneby, 2013).

Para evitar multicolineariedade entre os caracteres morfológicos foi construída uma matriz de correlação e as variáveis significativamente correlacionadas foram removidas com um valor limiar de 0.9. Para investigar as diferenças entre os caracteres morfológicos uma função de adl (pacote MASS) foi usada para distinguir os grupos da análise.

3.6. Espécie Candidata (EC)

As espécies candidatas foram inicialmente separadas com base em características morfológicas tradicionalmente utilizadas para a taxonomia do grupo como: número de pleuras, forma e tamanho das escamas e dos espinhos dorsais e do campo intestinal, da região interciliar, padrão de distribuição de espinhos ao longo do corpo, presença de constrição no pescoço e base da furca e conjunto de espinhos da base da furca.

O conceito de espécie candidata é utilizado quando há reanálise de uma espécie e constata-se que pode existir mais de uma unidade evolutiva, é, portanto, uma hipótese. Pelo conjunto analisado: um dos padrões encontrados representa a espécie *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 e os demais, que variam em morfologia e morfometria são as espécies candidatas.

Desse modo, utilizamos os seguintes termos e abreviações: espécies candidatas (**EC**) referente aos espécimes analisados no presente trabalho; forma (**F**): indivíduos descritos na literatura por Kisielewski (1991) e grupo (**G**): constituídos pelos espécimes deste estudo e representantes da literatura, refere-se à análise morfométrica.

4. RESULTADOS

Um total de 24 espécimes foram inicialmente identificados como *Chaetonotus polyspinosus*, mas posteriormente foram subdivididos *Chaetonotus polyspinosus* (Greuter, 1917) forma brasileira (cinco indivíduos) e outras quatro ECs (**EC1**: 6 indivíduos; **EC2**: 4 indivíduos; **EC3**: 6 indivíduos; **EC4**: 3 indivíduos). Também encontramos três indivíduos de *Chaetonotus ventrochaetus* (Kisielewski, 1991), que foram redescritos nesse trabalho. As formas brasileiras propostas por Kisielewski (1991) foram analisadas e classificadas dentro das distintas espécies candidatas designadas no presente estudo, sendo: a “forma tipo” representante de *Chaetonotus polyspinosus*, forma I da EC1, forma II da EC2 e forma III da EC4.

Descrições morfológicas

Filo Gastrotricha Mečnikow, 1865

Ordem Chaetonotida Remane, 1925 [Rao & Clausen, 1970]

Subordem Paucitubulatina d’Hondt, 1971

Familia Chaetonotidae Gosse, 1864 (sensu Leasi & Todaro, 2008)

Subfamily Chaetonotinae Gosse, 1864 (sensu Kisielewski, 1991)

Gênero *Chaetonotus* Ehrenberg, 1830

4.1. *Chaetonotus polyspinosus* (Greuter, 1917)

(Figs. 3 a-f; 4 a-e; 5 a-c, 26 a; 28 a,d; Tabela 2)

Chaetonotus polyspinosus - Kisielewski 1991, p. 21- 25, figs. 11, 15, 19, 23, tab. 6

Material: Um adulto coletado na Represa do Broa (substrato arenoso/rochoso) no ano de 2015, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Três adultos coletados em substrato associado a raízes de *Echhornia* sp. no ano de 2016 e 2017 em um lago urbano no município de Paulínia, estado de São Paulo, Brasil. Um adulto coletado em substrato associado a raízes de plantas no ano de 2018, na Lagoa do Taquaral no município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Quatro espécimes coletados em uma poça de chuva na Reserva da Juréia, estado de São Paulo, Brasil. Dois espécimes coletados em uma lagoa (entre lodo) no Mato Grosso do Sul, Brasil (Kisielewski, 1991).

Descrição

Habitus: Corpo medindo 219-346 μm de comprimento e 73-91 μm de diâmetro (U56), com a forma clássica de “pino de boliche” evidente (**Fig.3-a; Fig.4-a**). Cabeça formada claramente por cinco lóbulos, com 42-59 μm de diâmetro (U10) (**Fig.3-b**) e presença de dois pares de tufos sensoriais (**Fig.4-b**). Cefalion 17-22 μm de comprimento e com 27- 34 μm de largura (**Fig.3-b**). Dois pares de pleuras, epipleura com 13-16 μm (**Fig.3-b**) e hipopleura com 10-15 μm de diâmetro (**Fig.3-b; Fig.4-b**). Furca caudal com 35-46 μm de comprimento e presença de sutil constrição na base da furca (U85). Tubos adesivos são finos.

Pescoço com 35-62 μm de largura (U23). Faringe robusta com 57-93 μm de comprimento e 16-30 μm de diâmetro (U4) e 21-32 μm de diâmetro (U29), sem dilatação posterior. A boca é subterminal, com 7-19 μm de diâmetro e envolta pelo anel bucal (**Fig.3-b; Fig.4-b**). Hipostômio com 8-9 μm de diâmetro. Ocelo ausente. Par anterior e posterior de cerdas sensoriais presentes.

Escamas: A porção dorsal é recoberta por escamas quilhadas trilobadas com lóbulo anterior arredondado e borda interna fortemente côncava (**Fig.3-c, d; Fig.5-c; Fig.26-a**). Elas são distribuídas em 23-45 fileiras longitudinais alternadas, com 25-40 escamas em cada (**Tabela 2**). Na região do pescoço apresentam 4-5 μm de comprimento (**Fig.3-c**) e aumentam gradualmente ao longo do corpo, no tronco tem 7-8 μm de comprimento (**Fig.3-d**). São oblíquas umas às outras na região do pescoço (U7- U26) (**Fig.3-c**), no tronco tornam-se paralelas (U26- U68) e na região U68 a U85 acham-se novamente oblíquas, onde algumas linhas medianas desaparecem.

Espinhos: Os espinhos (projeções espinhosas) originam-se no início das escamas, formando quilhas e curvam-se sutilmente em direção ao corpo. Eles ultrapassam pouco o limite da escama e são grossos (**Fig.3-c, d; Fig.5-c; Fig.26-a**). Encostam-se à região anterior da escama

sucedente. Os espinhos das escamas dorsais que recobrem a região do pescoço têm 6-7 μm (**Fig.3-c**) e no tronco têm 8-10 μm de comprimento (**Fig.3-d**).

Na região da base da furca, há espinhos que são evidentemente maiores do que outras regiões do corpo (**Fig.3-e, f; Fig.5-a; Fig.28-a**), atingindo 14-22 μm de comprimento, são 4 pares de espinhos dorsais, 1 par dorsolateral e ausência de espinhos ventrais (4D+1DL+0V). Todos ultrapassam o limite da base da furca e são retos. O maior espinho dorsal da parte interna da base furcal apresenta 6-9 μm de comprimento (**Tabela 2**).

Região interciliar: A porção ventral tem 2 bandas ciliares separadas e é recoberta por 10-12 fileiras longitudinais, no campo intestinal (**Tabela 2**). As escamas da região interciliar são estreitas e arredondadas e apresentam espinhos que não ultrapassam seu limite, da faringe medem 3 μm de comprimento (**Fig.4-c**) e no campo intestinal medem de 4-7 μm e têm espinhos de 6 μm de comprimento (**Fig.4-d**). Ao final da região há um par de escamas pareadas com 11-17 μm de comprimento, 7-10 μm de diâmetro e com quilhas de 13-19 μm de comprimento, elas apresentam evidente constrição no lóbulo anterior e a borda interna é côncava (**Fig.4-e; Fig.5-b; Fig.28-d**).

Comentários taxonômicos: Assim como feito anteriormente por Kisielewski (1991), alguns dos espécimes brasileiros coletados no presente estudo foram identificados como *Chaetonotus polyspinosus* devido as seguintes semelhanças: cabeça constituída por cinco lóbulos; pleura anterior maior que a posterior; fileiras longitudinais oblíquas na porção final do tronco; no dorso da base da furca, quatro ou cinco espinhos maiores que os demais e no ventre um conjunto de pequenas escamas com espinhos; boca larga e envolta por cirros. A forma da escama dorsal do tronco mostra-se similar com a observada neste trabalho, mas as escamas constituintes da base da furca não foram representadas na ilustração de Kisielewski (1991), já no presente estudo, observou-se um nível de detalhamento nas estruturas que possibilitou a descrição da forma das escamas e dos espinhos da base da furca.

Por outro lado, foram observadas algumas diferenças, tais como o número de fileiras longitudinais alternadas, que nos espécimes de *Chaetonotus polyspinosus* deste estudo variaram de 23-45 fileiras com 25-40 escamas em cada uma. Já na descrição original, o autor descreve que as escamas dorsais estão distribuídas em 45 fileiras com 38 escamas em cada. Essa diferença pode ter ocorrido em função da posição do indivíduo analisado, que muitas vezes, não possibilitou a contagem do número total de escamas.

Ainda, ressalta-se que Kisielewski (1991) mediu apenas um indivíduo em seu estudo e que esses valores estão dentro dos intervalos de variação dos representantes analisados neste trabalho. Além disso, o autor considerou como “espinho” a parte que excede o limite da escama e neste estudo, definiu-se “espinho” desde sua origem na escama até o final da estrutura, que é a parte que excede o limite da escama. Assim, os valores dessa estrutura divergem entre os estudos.

Tabela 2. Características morfométricas de *Chaetonotus polyspinosus*, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Características	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	219 μm	346 μm	6
Comprimento total da furca	35 μm	46 μm	6
Comprimento da faringe	57 μm	93 μm	6
Comprimento das escamas dorsais do tronco	7 μm	8 μm	6
Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	8 μm	10 μm	6
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	4 μm	5 μm	6
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	6 μm	7 μm	6
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	14 μm	22 μm	5
Diâmetro do anel da boca	7 μm	19 μm	6
Comprimento do cefalion	17 μm	22 μm	6
Largura do cefalion	27 μm	34 μm	5
Número total de fileiras longitudinais alternadas	23	45	6
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	25	40	4
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	10	12	4
Comprimento do par que escamas terminais	11 μm	17 μm	5
Largura do par de escamas terminais	7 μm	10 μm	4
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	13 μm	19 μm	5
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	6 μm	9 μm	3
Comprimento da escama ventral da base da furca	6 μm	6 μm	1
Comprimento do espinho ventral da base da furca	7 μm	7 μm	1
Comprimento dos espinhos centrais	-	-	-
Largura da epipleura	13 μm	16 μm	6
Largura da hipopleura	10 μm	15 μm	6
Comprimento da escama da região interciliar	4 μm	7 μm	6
Comprimento do espinho da região interciliar	6 μm	6 μm	5

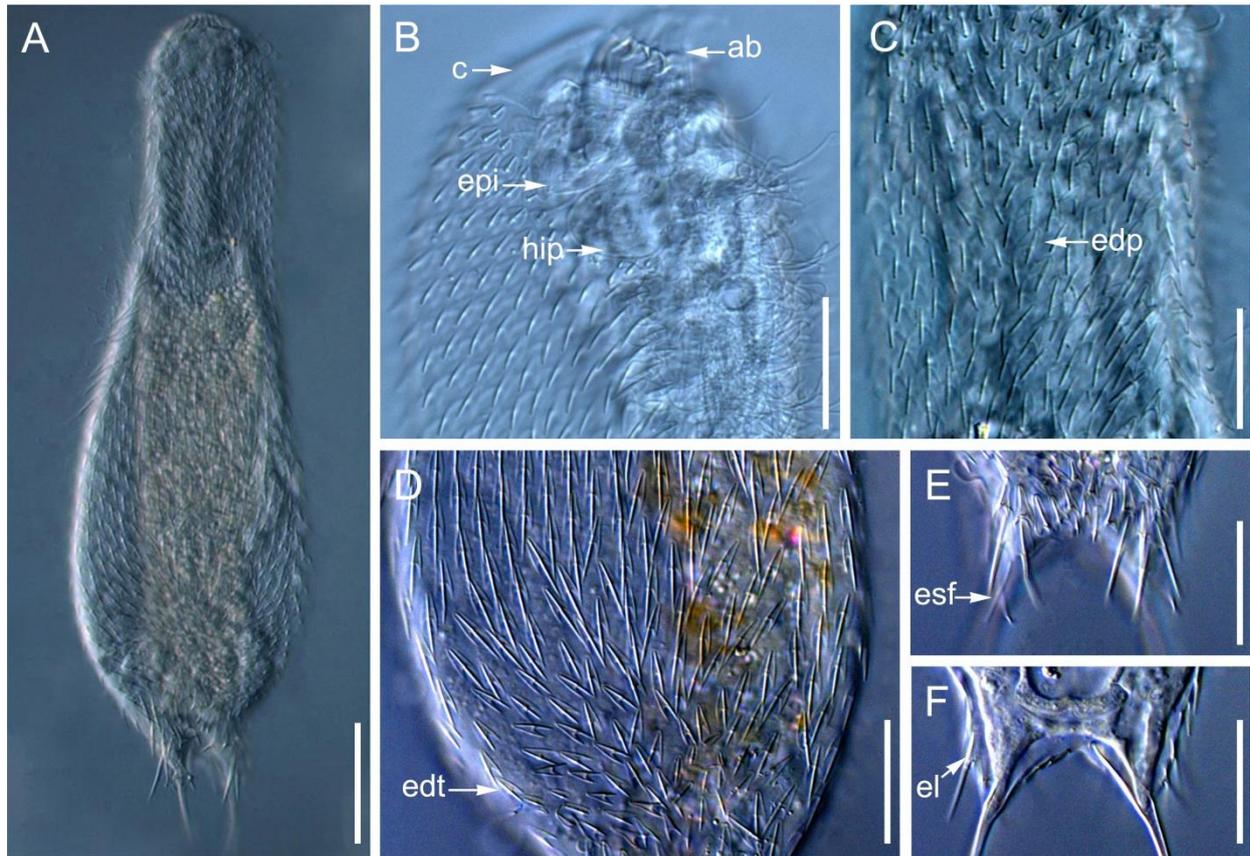


Figura 3. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Habitus, visão dorsal; **B** região cefálica visão dorsolateral; **C** região anterior visão dorsal; **D** região mediana do corpo visão dorsal; **E** região posterior vista dorsal; **F** região posterior visão interna. Legenda: **ab** anel bucal; **c** cefalium; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **el** espinho lateral; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. **Escalas** A 50 μm ; **B, C, D, E, F** 20 μm .

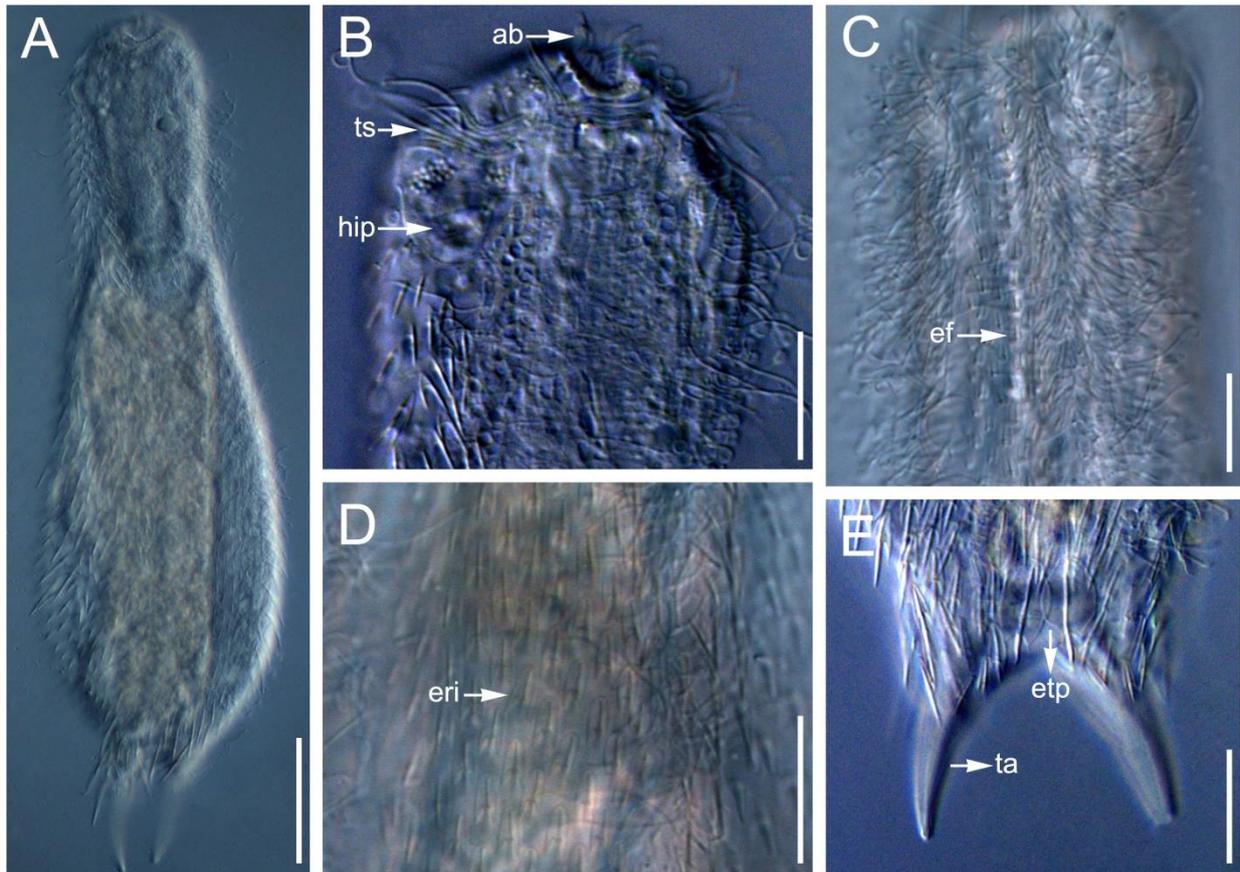


Figura 4. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Habitus, visão ventral; **B** região cefálica visão ventrolateral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior vista ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo; **ts** tufo sensorial. **Escalas** A 50 μm ; B, C 10 μm ; D, E 15 μm .

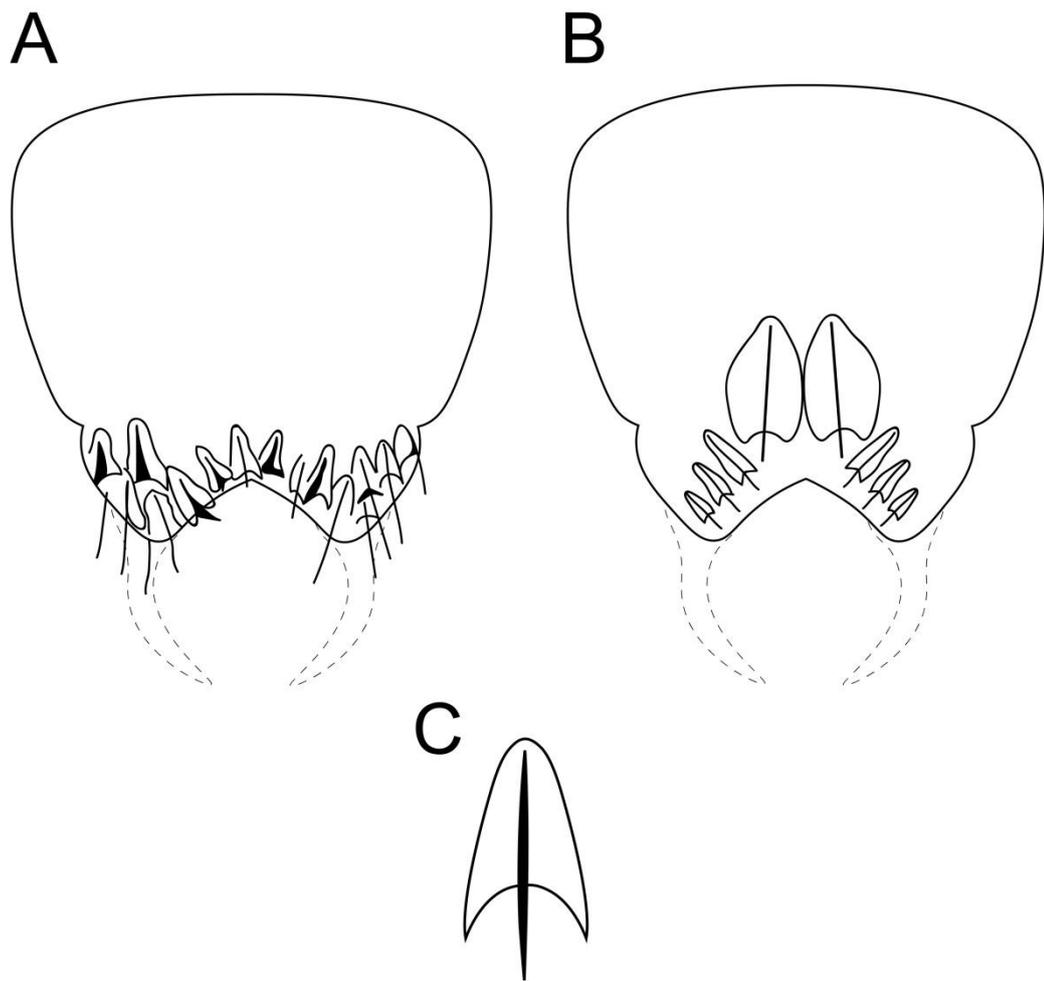


Figura 5. Ilustração esquemática de *Chaetonotus polyspinosus*. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e dois pares com três escamas menores, providas com espinhos que ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.

4.2. EC1

(Figs. 6 a-f; 7 a-d; 8 a-c; 9 a-c; 25 a; 26 b; 27 a; 28 b,e; 29 a; Tabela 3)

C. aff. Polyspinosus I - Kisielewski 1991, p. 21- 25, figs 12, 16, 20, 24, tab. 6

Material: Dois adultos coletados na Represa do Broa (substrato arenoso/rochoso) no ano de 2015, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Um adulto coletado em Diamantina no ano de 2016, no estado de Minas Gerais, Brasil. Três adultos coletados no ano de 2016, em

lagoa urbana da Faculdade de Educação Física da Unicamp, Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Seis espécimes coletados em lago (entre lodo) no ano de 1991 no estado do Pará, Brasil (Kisielewski, 1991).

Descrição

Habitus: Corpo com 186-233 μm de comprimento (**Fig.6-a; Tabela 3**). Cabeça formada por cinco lóbulos, sendo a hipopleura mais evidente que a epipleura, com 14-15 μm e 6-10 μm de comprimento, respectivamente (**Fig.6-b**). Cefalium com 13-18 μm de comprimento e 20-29 μm de diâmetro (**Fig.6-b; Fig.8-a**). Cabeça medindo 29-35 μm de diâmetro (U10). Presença de dois pares de tufo sensoriais.

Diâmetro do corpo medindo 21-36 no pescoço (U20) e 31-50 μm no meio do tronco (U57). Faringe com 51-60 μm de comprimento (U4-U31) e 10-11 μm de largura na região de U4 a U16 e 11-12 μm em U31, havendo uma pequena dilatação em sua porção posterior. Boca subterminal com 6-10 μm e envolta por cirros (**Fig.7-a; Fig.8-a; Fig.25-a**). Hipostômio com 8 μm de diâmetro (**Fig.7-a; Fig.8-a; Fig.25-a**). Ocelo ausente. Furca caudal com 27-35 μm de comprimento e com sutil contração (U85) (**Fig.8-c**).

Escamas: Escamas dorsais constituídas por três lóbulos (**Fig.6-c, d; Fig.8-b; Fig.9-c; Fig.26-b; Fig.27-a**), aumentando gradualmente de tamanho do pescoço ao tronco. A porção dorsal é recoberta por escamas com 4 μm de comprimento na região do pescoço (**Fig.6-c**) e 6-8 μm de comprimento no tronco (**Fig.6-d; Fig.8-b; Fig.26-b; Fig.27-a**). Presença de uma evidente contração no lóbulo anterior da escama com borda interna fortemente côncava (**Fig.9-c**). No tronco, estão distribuídas em 15-39 fileiras longitudinais paralelas alternadas, com 27-30 escamas em cada uma (**Tabela 3**).

Espinhos: Os espinhos originam-se no início das escamas, são retos, finos e apresentam a mesma espessura em toda a sua extensão (**Fig.9-c; Fig.26-b; Fig.27-a**). Há uma sobreposição do espinho de uma escama à região anterior da escama que o sucede.

Os espinhos do pescoço são curtos, com 4-5 μm de comprimento e aumentam na região do tronco, apresentando de 5-9 μm de comprimento.

Base da furca com 3 pares de espinhos dorsais, e um dorsolateral (3D+1DL+0V) (**Fig.6-e, f; Fig.9-a; Fig.28-b; Fig.29-a**) o maior apresenta 8-12 μm , todos ultrapassam o limite da base da

furca (**Fig.6-e, f; Fig.8-c**). O maior espinho dorsal da região interna da base da furca tem 4-8 μm de comprimento. Ausência de espinhos ventrais que ultrapassam o limite da base da furca.

Região interciliar: A região ventral tem duas bandas ciliares ao longo do corpo que termina com um par de escamas pareadas com 10-11 μm de comprimento, 6 μm de diâmetro e providas com quilhas de 8-13 μm de comprimento (**Fig.7-d; Fig.8-c; Fig.28-e; Fig.29-a**). O lóbulo anterior das escamas terminais é arredondado e a borda interna é sutilmente côncava (**Fig.9-b**).

As escamas da região da faringe têm 3 μm de comprimento (**Fig.7-b**) e as do campo intestinal apresentam 4-6 μm com espinhos de 5 μm de comprimento (**Fig.7-c**), estão distribuídas em 10 fileiras longitudinais alternadas (**Tabela 3**). São unilobadas, mais estreitas que as escamas dorsais, os espinhos são curtos e sem dentículos.

Comentários taxonômicos: EC1 difere das demais espécies candidatas, pois forma um padrão único com escama dorsal trilobada, estreita e com evidente contração no lóbulo anterior. Embora a configuração do conjunto de escamas e espinhos da base da furca, na visão ventral, seja similar a *Chaetonotus polyspinosus*, as escamas terminais pareadas têm o lóbulo anterior arredondado e sem contração, diferindo-os. Além disso, enquanto os espinhos dorsais da base da furca de *Chaetonotus polyspinosus* apresentam 14-22 μm de comprimento os da EC1 têm 8-12 μm . Entre as formas descritas por Kisielewski (1991), EC1 assemelhasse a forma I devido a presença de escamas dorsais mais estreitas, faringe delgada, espinhos dorsais que ultrapassam o limite da base da furca e ausência de espinhos ventrais na mesma região, campo intestinal formado por 10 fileiras longitudinais alternadas.

Em contrapartida, o autor define as escamas dorsais como unilobadas, formadas por um único lóbulo, contudo, observa-se que é contribuída na verdade, por três lóbulos.

Assim como com a forma tipo, Kisielewski (1991) mediu apenas um indivíduo em seu estudo e que esses valores estão dentro dos intervalos de variação dos representantes de EC1.

Tabela 3. Características morfométricas da EC1, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Característica	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	186 μm	233 μm	7
Comprimento total da furca	27 μm	35 μm	7
Comprimento da faringe	51 μm	60 μm	7
Comprimento das escamas dorsais do tronco	6 μm	8 μm	7

Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	5 μm	9 μm	7
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	4 μm	4 μm	6
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	4 μm	5 μm	6
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	8 μm	12 μm	6
Diâmetro do anel da boca	6 μm	10 μm	7
Comprimento do cefalion	13 μm	18 μm	7
Largura do cefalion	20 μm	29 μm	7
Número total de fileiras longitudinais alternadas	15	39	7
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	27	30	5
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	10	10	3
Comprimento do par que escamas terminais	10 μm	11 μm	7
Largura do par de escamas terminais	6 μm	6 μm	6
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	8 μm	13 μm	7
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	4 μm	8 μm	6
Comprimento da escama ventral da base da furca	5 μm	5 μm	6
Comprimento do espinho ventral da base da furca	6 μm	6 μm	6
Comprimento dos espinhos centrais	-	-	-
Largura da epipleura	6 μm	10 μm	6
Largura da hipopleura	14 μm	15 μm	6
Comprimento da escama da região interciliar	4 μm	6 μm	4
Comprimento do espinho da região interciliar	5 μm	5 μm	3

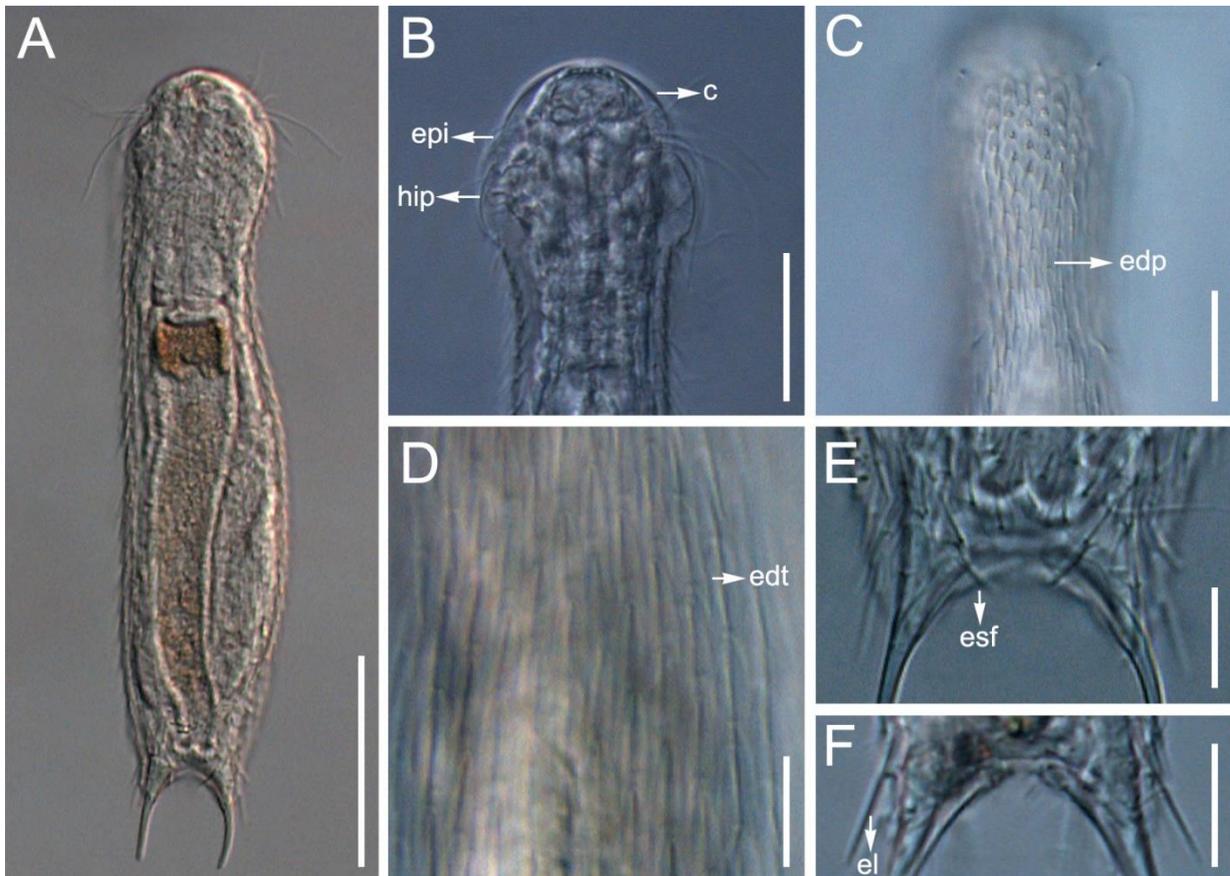


Figura 6. Micrografia de luz - DIC da EC1. **A** Habitus, visão dorsal; **B** região cefálica visão interna; **C** região anterior visão dorsal; **D** região mediana do corpo visão dorsal; **E** região posterior vista dorsal;

F região posterior visão interna. Legenda: **c** cefalio; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **el** espinho lateral; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. Escalas **A** 50 μm ; **B** 20 μm ; **C, D** 15 μm ; **E, F** 10 μm .

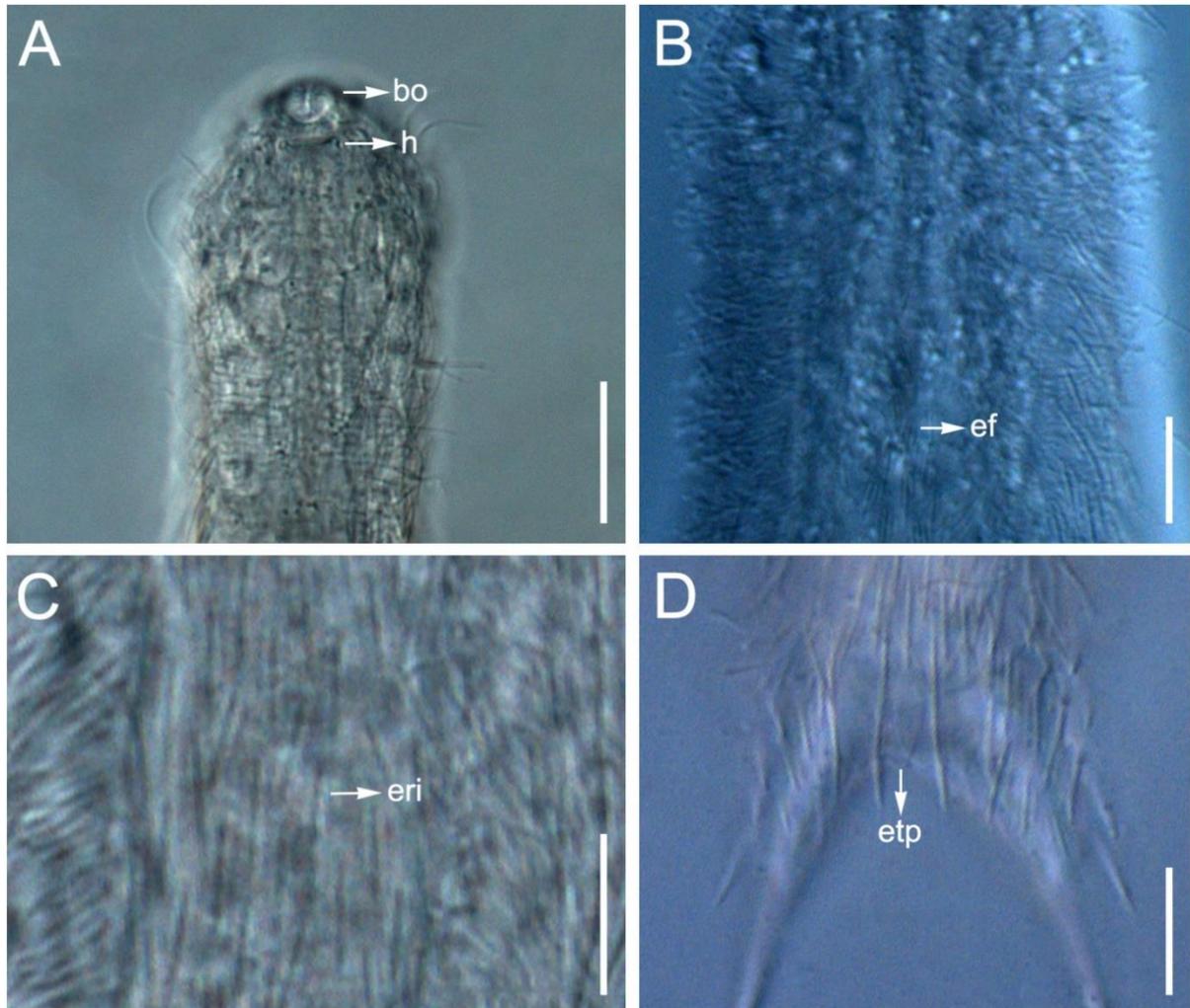


Figura 7. Micrografia de luz - DIC da EC1. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior vista ventral. Legenda: **bo** boca; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. Escalas **A** 15 μm ; **B, C, D** 10 μm .

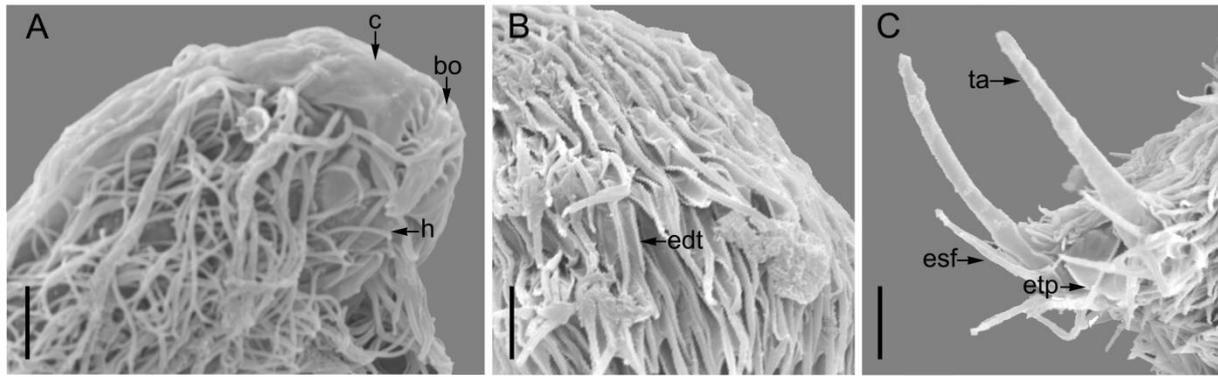


Figura 8. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC1. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalium; **bo** boca; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio; **ta** tubo adesivo. Escalas **A, B, C** 5 μm .

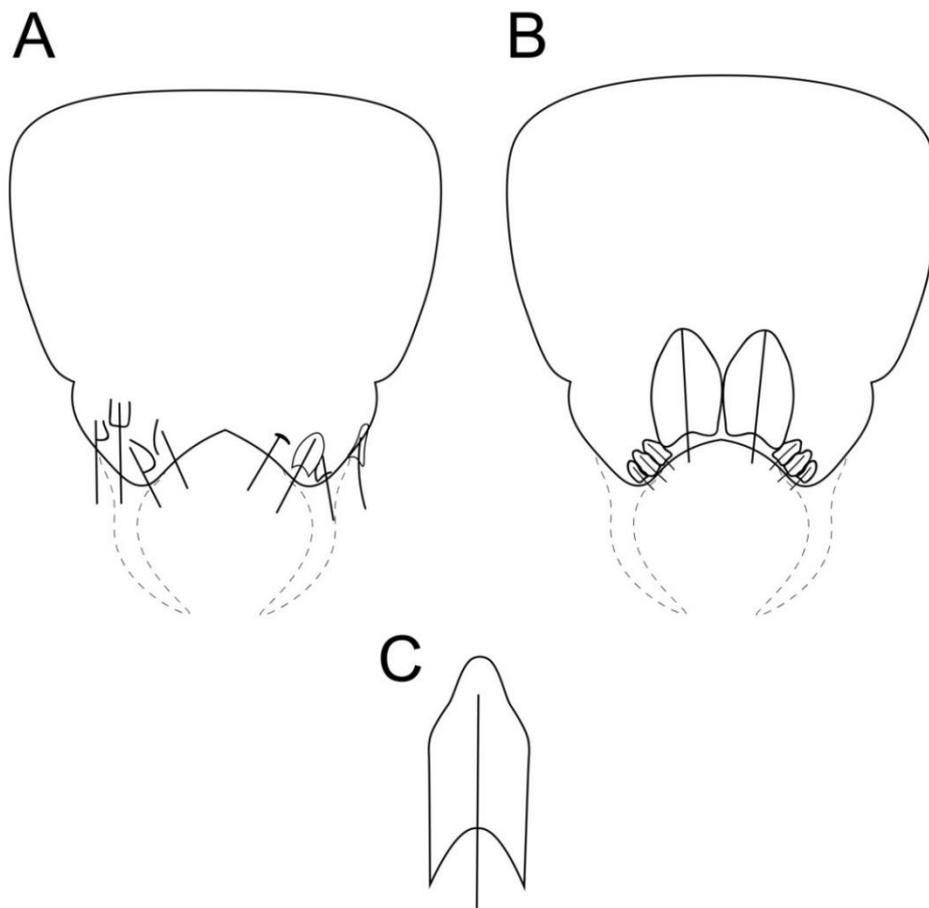


Figura 9. Ilustração esquemática da EC1. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e dois pares com três escamas menores, providas com

espinhos que ultrapassam seu limite, visão ventral; C escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.

4.3. EC2

(Figs. 10 a-d; 11 a-e; 12 a-c; 13 a-c; 25 b; 26 c; 27 b; 28 c,f,g; 29 b; Tabela 4)

C. aff. Polyspinosus II - Kisielewski 1991, p. 21- 25, figs 13, 17, 21, 25, tab. 6

Material: Dois adultos coletados em Diamantina no ano de 2016, no estado de Minas Gerais, Brasil. Dois adultos coletados na Represa do Broa (substrato arenoso/rochoso) no ano de 2017, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Um espécime coletado no ano de 1991, em um reservatório (entre areia) na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil (Kisielewski,1991).

Descrição

Habitus: Corpo com 210-253 μm de comprimento e 47-69 μm de diâmetro (U54), cabeça com 33-42 μm de diâmetro (U8) e pescoço com 23-41 μm (U20) (**Fig.10-b**). Cabeça constituída por cinco lóbulos, com cefalion de 17-20 μm de comprimento e 27-32 μm de largura (**Fig.10-a**). Epipleura pouco evidente com comprimento de 8-10 μm (**Fig.12-a; Fig.25-b**) e hipopleura com 10-12 μm (**Fig.10-a; Fig.12-a; Fig.25-b**). Faringe atingindo 52-72 μm de comprimento (U4-U29) e 11-15 μm de diâmetro na região de U4, 11-13 μm em U17 e 11-15 μm em U29. Um anel bucal subterminal com 8-10 μm de diâmetro (**Fig.11-a; Fig.12-a; Fig.25-b**). Hipostômio de 10 μm (**Fig.11-a**). Ocelo ausente. Cerdas sensoriais anteriores e posteriores presentes. Furca com 27-40 μm de comprimento total. Tubos adesivos se tornam mais finos nas pontas e dobrados dentro (**Fig.10-d; Fig.12-c**). Presença de evidente constrição na base da furca (U84).

Escamas: O dorso é coberto por escamas quilhadas, alongadas e de três lóbulos (**Fig.10-b, c; Fig.12-b; Fig.13-c; Fig.26-c; Fig.27-b**), sendo o lóbulo anterior arredondado e o posterior fortemente côncavo. Estão distribuídas em 33-63 fileiras longitudinais com 33-42 escamas em cada (**Tabela 4**). Na região do pescoço tem de 3-4 μm de comprimento (**Fig.10-b**) e no tronco 4-5 μm (**Fig.10-c; Fig.26-c; Fig.27-b**).

Na visão interna, no centro da base da furca, há de um pequeno par de quilhas providas com espinhos longos, situado no centro da base (**Fig.11-d; Fig.13-a; Fig.28-f**), com cerca de 5 μm de comprimento cada uma (U90).

Espinhos: O espinho “projeção espinhosa” tem origem no início da quilha, são finos, retos, paralelos ao corpo e ultrapassa pouco o limite da escama (**Fig.12-b; Fig.13-c**). Os espinhos dorsais da região do pescoço têm de 4-5 μm (**Fig.10-b**) e no tronco atingem 5-6 μm de comprimento (**Fig.10-c; Fig.26-c; Fig.27-b**).

Base da furca provida com 3 pares de espinhos dorsais que ultrapassam pouco o seu limite, com 6-7 μm (U94) (**Fig.10-d; Fig.12-c; Fig.13-a; Fig.28-c; Fig.29-b**). Na região interna da base da furca os espinhos maiores medem 4-8 μm de comprimento, não ultrapassando seu limite. Ausência de espinhos longos na região ventral (3D+0V) (**Fig.13-b**).

Região interciliar: A região é preenchida, no campo intestinal, por escamas unilobadas, estreitas e alongadas, medem 4 μm de comprimento, são providas com espinhos de 5 μm (**Fig.11-c**) e estão distribuídas em 14 fileiras longitudinais alternadas (**Tabela 4**). Na região da faringe as escamas têm espinhos que medem cerca de 3 μm de comprimento (**Fig.11-b**).

A região interciliar termina com 2 pares de escamas maiores e ovais de 10-14 μm de comprimento, 7-9 μm de diâmetro e com quilhas com de 7-11 μm de comprimento (**Fig.28-g**). Existe um conjunto de cinco pequenas quilhas, com espinhos, localizadas a baixo do par de escamas terminais do ventre, esses espinhos não ultrapassam o limite da escama (**Fig.11-e; Fig.13-b**). Existem duas bandas ciliares que se estendem ao longo do corpo.

Comentários taxonômicos: EC2 se assemelha com as características descritas para a forma II de Kisielewski (1991), pelas seguintes características: para seu tamanho corporal, o cefalion é maior, enquanto o a pleura anterior (epipleura) é menor e ligeiramente deslocada para dentro; as escamas são mais curtas e com borda interna profundamente côncava, no entanto a forma típica da escama citada pelo autor é unilobada, e as escamas observadas nos espécimes analisados são de três lóbulos, sem expansão no lóbulo anterior ou posterior, caracterizando-se como “suavemente trilobada”; a região interciliar, no campo intestinal, é constituída por 14 fileiras longitudinais alternadas; a base da furca não exhibe espinhos maiores que outras regiões do corpo; região interciliar termina com um par de quilhas sem espinhos que ultrapassam seu limite.

EC2 difere das demais espécies candidatas analisadas nesse estudo, em função do conjunto de escamas e espinhos da base da furca. Na visão interna, é possível observar um par de pequenas escamas, dotadas de longos espinhos que se situam no centro da base da furca. Essa característica não foi observada em nenhum dos outros espécimes analisados. Além disso, o campo ventral termina com um par de escamas terminais claramente ovais e sem espinhos que excedam o seu limite. Logo abaixo delas, há dois pares de cinco pequenas escamas com espinhos que não ultrapassam seu limite, o que a difere da EC1 e EC3 e assemelha-se a EC4.

Tabela 4. Características morfométricas da EC2, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Característica	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	210 μm	253 μm	5
Comprimento total da furca	27 μm	40 μm	5
Comprimento da faringe	52 μm	72 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do tronco	4 μm	5 μm	5
Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	5 μm	6 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	3 μm	4 μm	4
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	4 μm	5 μm	4
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	6 μm	7 μm	4
Diâmetro do anel da boca	8 μm	10 μm	5
Comprimento do cefalio	17 μm	20 μm	4
Largura do cefalio	27 μm	32 μm	5
Número total de fileiras longitudinais alternadas	33	63	5
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	33	42	3
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	14	14	4
Comprimento do par que escamas terminais	10 μm	14 μm	4
Largura do par de escamas terminais	7 μm	9 μm	4
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	7 μm	11 μm	5
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	4 μm	8 μm	3
Comprimento da escama ventral da base da furca	5 μm	7 μm	4
Comprimento do espinho ventral da base da furca	5 μm	7 μm	4
Comprimento dos espinhos centrais	-	-	-
Largura da epipleura	8 μm	10 μm	3
Largura da hipopleura	10 μm	12 μm	5
Comprimento da escama da região interciliar	4 μm	4 μm	1
Comprimento do espinho da região interciliar	5 μm	5 μm	1

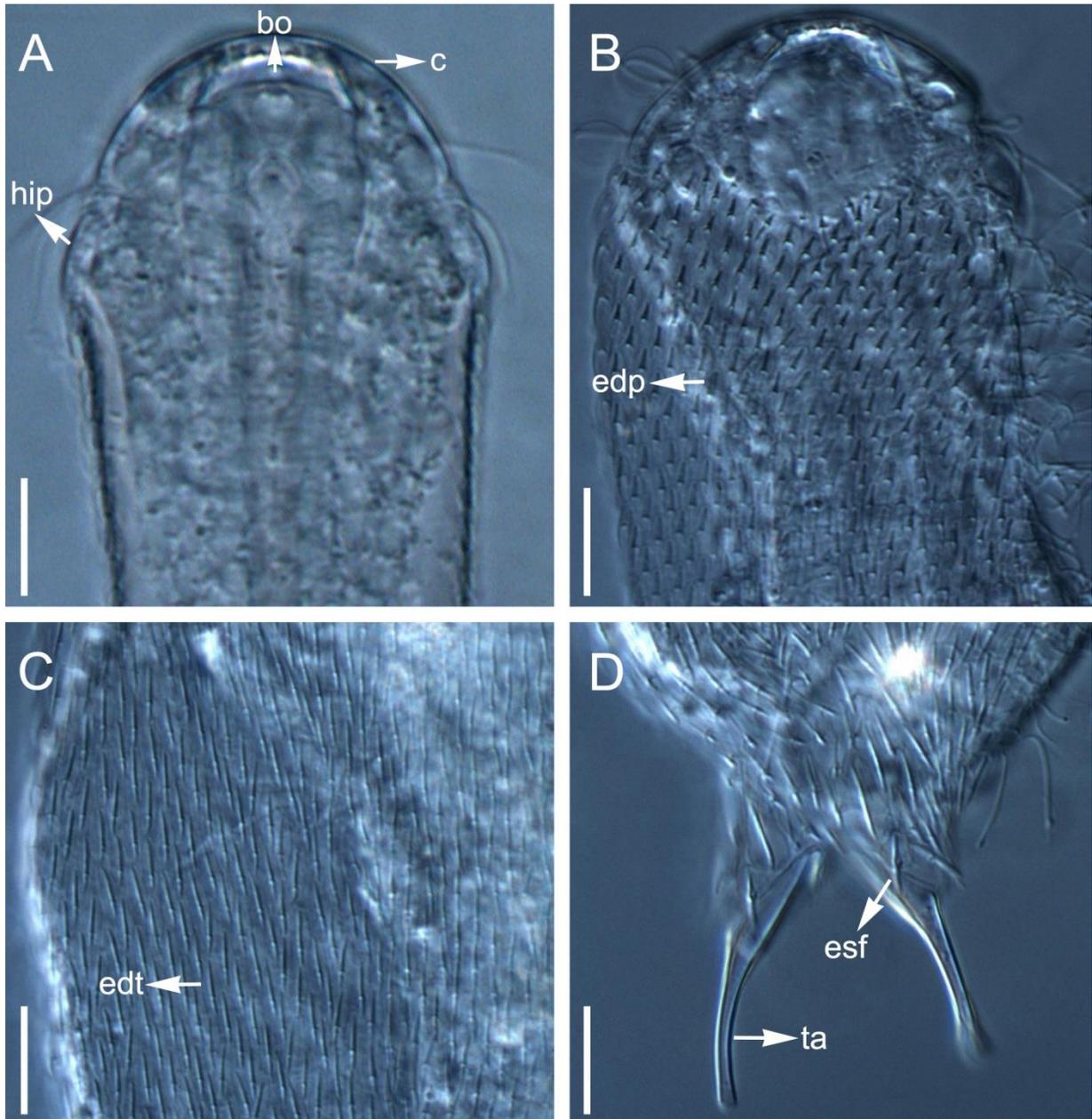


Figura 10. Micrografia de luz - DIC da EC2. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região posterior vista dorsal. Legenda: **bo** boca; **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C, D** 10 μm .

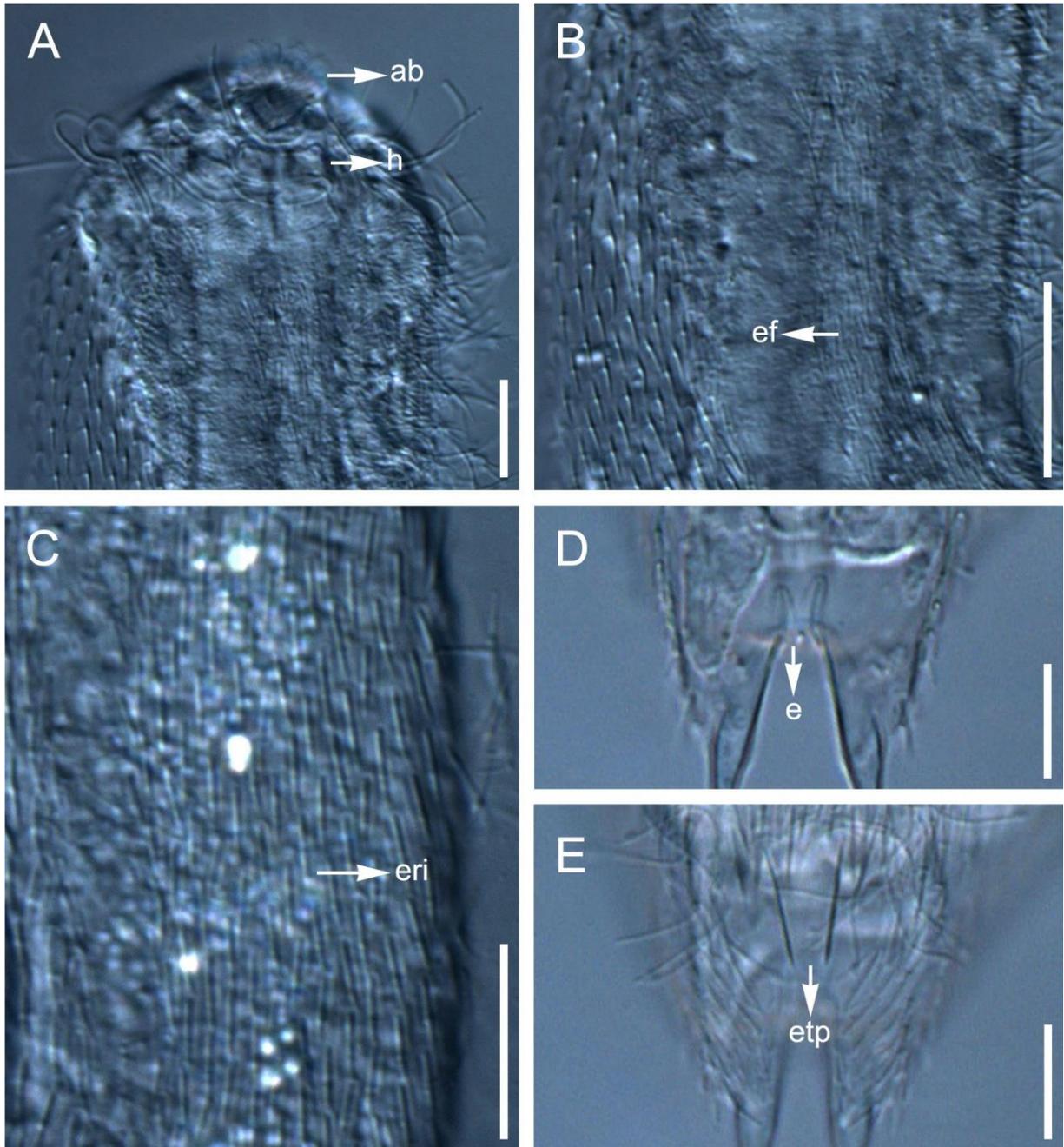


Figura 11. Micrografia de luz - DIC da EC2. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior visão interna; **E** região posterior visão ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **e** -escama- par de escamas localizadas no centro da base da furca, providas com espinhos longos; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. **Escala**s A, D, E 10 μ m; B, C 20 μ m.

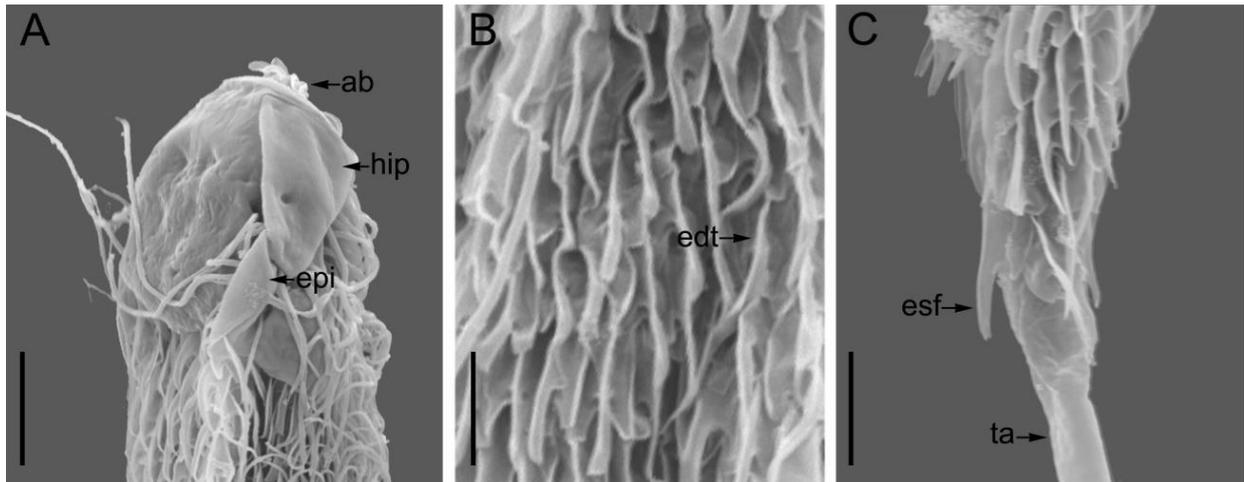


Figura 12. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC2. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior vista dorsolateral. Legenda: **ab** anel bucal; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escala**s A, B, C 5 μ m.

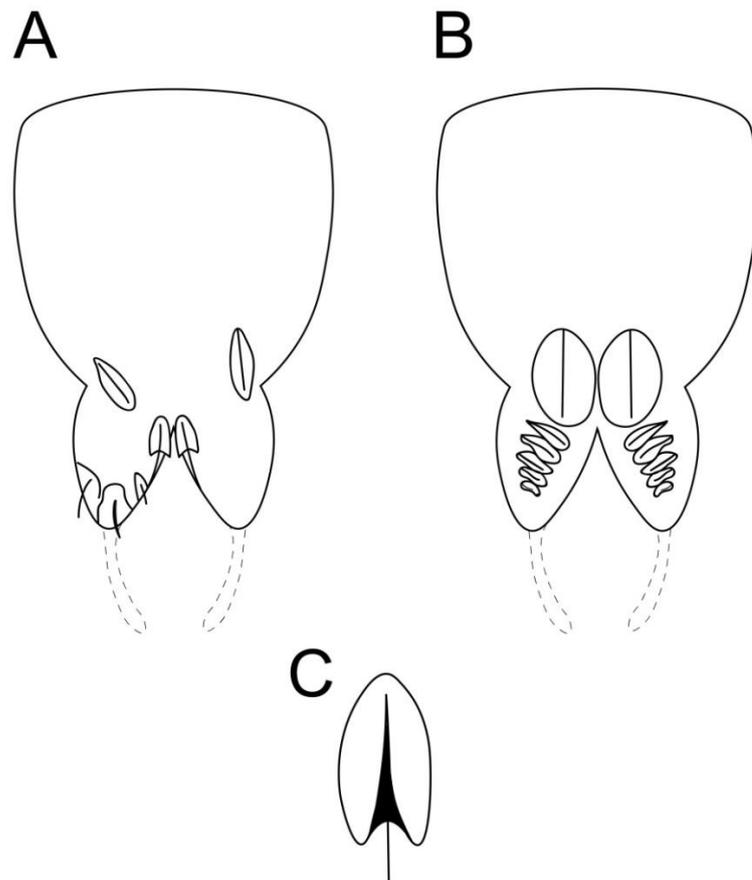


Figura 13. Ilustração esquemática da EC2. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal e par de escamas com espinhos no centro da base da furca, visão interna; **B** Escamas

terminais pareadas e dois pares com cinco escamas menores providas com espinhos que não ultrapassam seu limite, visão ventral; C escama dorsal. Em tracejado: tubos adesivos.

4.4. EC3

(Figs. 14 a-d; 15 a-f; 16 a-b; 17 a-d; 25 c; 26 d; 27 c; 28 h,k,l; Tabela 5)

Material: Seis adultos coletados na Represa do Broa (substrato arenoso/rochoso) nos anos de 2015, 2016 e 2017 na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil.

Descrição

Habitus: Corpo com 187-218 μm de comprimento e 42-44 μm de largura (U60) (**Fig.15-a**). Pentalobado, com cabeça de 32-34 μm de diâmetro (U10) e 2 pares de tufo ciliares presentes. Cefalion com 23-27 μm de largura e 16-18 μm de comprimento (**Fig.16-a; Fig.25-c**). Epipleura (**Fig.14-a; Fig.16-a; Fig.25-c**) e hipopleura (**Fig.14-a**) com 7-14 μm e 9-14 μm de diâmetro respectivamente. Furca caudal com 24-30 μm de comprimento. Constrição sutil presente na base da furca caudal (U87).

Pescoço com 24-32 μm de diâmetro (U20). A faringe tem 64-74 μm de comprimento (U5-U41), na região U5 têm 14-16 μm de largura, em U24 e U41 apresentam 15-17 e 17-18 μm de diâmetro, respectivamente. Um anel bucal subterminal com 8-12 μm (**Fig.15-b**). Hipostômio com 10 μm (**Fig.15-b**). Ocelo ausente. Par anterior e posterior de cerdas sensoriais presentes.

Escamas: A porção dorsal do tronco é recoberta por escamas de quilha distribuídas em 14-34 fileiras longitudinais alternadas, com 38 escamas cada (**Tabela 5**), dispostas em ângulo oblíquo. No pescoço, as escamas dorsais têm de 3-4 μm de comprimento (**Fig.14-b**) e na região do tronco apresentam 4 μm (**Fig.14-c; Fig.16-b; Fig.26-d; Fig.27-c**). As escamas dorsais têm seu ângulo de abertura “fechado”, com 5 pontos formando seu contorno (escama pentalobada) a região posterior é fortemente côncava (**Fig.14-b, c; Fig.16-b; Fig.17-c**).

No ventre da base da furca, há um conjunto de 6 escamas menores, 3 pares, com espinhos que ultrapassam seu limite, elas saem logo abaixo do par de escamas terminais (**Fig.15-e; Fig.17-b**).

Espinhos: Originam-se no início da escama, curvam-se sutilmente em direção ao corpo e são espessos (**Fig.17-c**). Os espinhos dorsais do pescoço (**Fig.14-b**) têm de 4-5 μm e no tronco 5-6 μm de comprimento (**Fig.14-c; Fig.16-b; Fig.26-d; Fig.27-c**).

Na base da furca há 3 pares de espinhos dorsais que ultrapassam o seu limite, sendo um par dorsolateral (2D+1DL). Eles são longos, o maior apresenta 10-15 μm de comprimento, o maior espinho dorsal da região interna apresenta 6-7 μm (**Fig.14-d; Fig.17-a; Fig.28-h**).

No centro da base da furca, na visão interna estão situadas 6 pequenas escamas providas com espinhos que ultrapassam seu limite, com 6 μm de comprimento cada (U90) (**Fig.15-f; Fig.17-b; Fig.28-l**).

Região interciliar: A região apresenta 2 bandas ciliares separadas e é coberta por 10-12 fileiras longitudinais (**Tabela 5**), é composta por escamas com espinhos de 3 μm de comprimento na região da faringe e por escamas e espinhos de 4-5 μm de comprimento no campo intestinal (**Fig.15-d**), elas são estreitas, alongadas e unilobadas (**Fig.17-d**).

Termina com 2 pares de escamas maiores, com 9-12 μm de comprimento e 4-6 μm de diâmetro, providas com quilhas de 10-12 μm de comprimento (**Fig.15-e; Fig.17-b; Fig.28-k**).

Comentários taxonômicos: EC3 apresenta similaridade com a forma II de Kisielewski (1991), por apresentar lóbulo cefálico anterior menos evidente que posterior; escamas dorsais mais curtas e com borda interna profundamente côncava. O autor descreve a escama dorsal da forma II como unilobada e as escamas observadas nos espécimes representantes de EC3 são de cinco lóbulos, sendo o único padrão que apresenta essa característica. Embora haja semelhanças, a forma II não foi incluída em EC3, pois a forma descrita por Kisielewski (1991) aparenta-se mais com a EC2.

Além da escama pentalobada, EC3 é caracterizada por apresentar espinhos longos no dorso da base da furca. No ventre, as escamas terminais são providas com espinhos que ultrapassam seu limite, há também dois pares de três pequenas escamas com espinhos que excedem seu limite, como ocorre na EC1. A presença de seis pequenos espinhos centrais na base da furca é uma característica exclusiva da EC3. Esse padrão morfológico o sustenta como espécie candidata.

Tabela 5. Características morfométricas da EC3, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Característica	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	187 μm	218 μm	5
Comprimento total da furca	24 μm	30 μm	5
Comprimento da faringe	64 μm	74 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do tronco	4 μm	4 μm	6
Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	5 μm	6 μm	6
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	3 μm	4 μm	6
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	4 μm	5 μm	6
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	10 μm	15 μm	6
Diâmetro do anel da boca	8 μm	12 μm	5
Comprimento do cefalion	16 μm	18 μm	4
Largura do cefalion	23 μm	27 μm	4
Número total de fileiras longitudinais alternadas	14	34	6
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	38	38	1
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	10	12	6
Comprimento do par que escamas terminais	9 μm	12 μm	5
Largura do par de escamas terminais	4 μm	6 μm	5
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	10 μm	12 μm	5
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	6 μm	7 μm	3
Comprimento da escama ventral da base da furca	4 μm	6 μm	5
Comprimento do espinho ventral da base da furca	5 μm	7 μm	5
Comprimento dos espinhos centrais	6 μm	6 μm	3
Largura da epipleura	7 μm	14 μm	5
Largura da hipopleura	9 μm	14 μm	5
Comprimento da escama da região interciliar	4 μm	5 μm	6
Comprimento do espinho da região interciliar	4 μm	5 μm	6

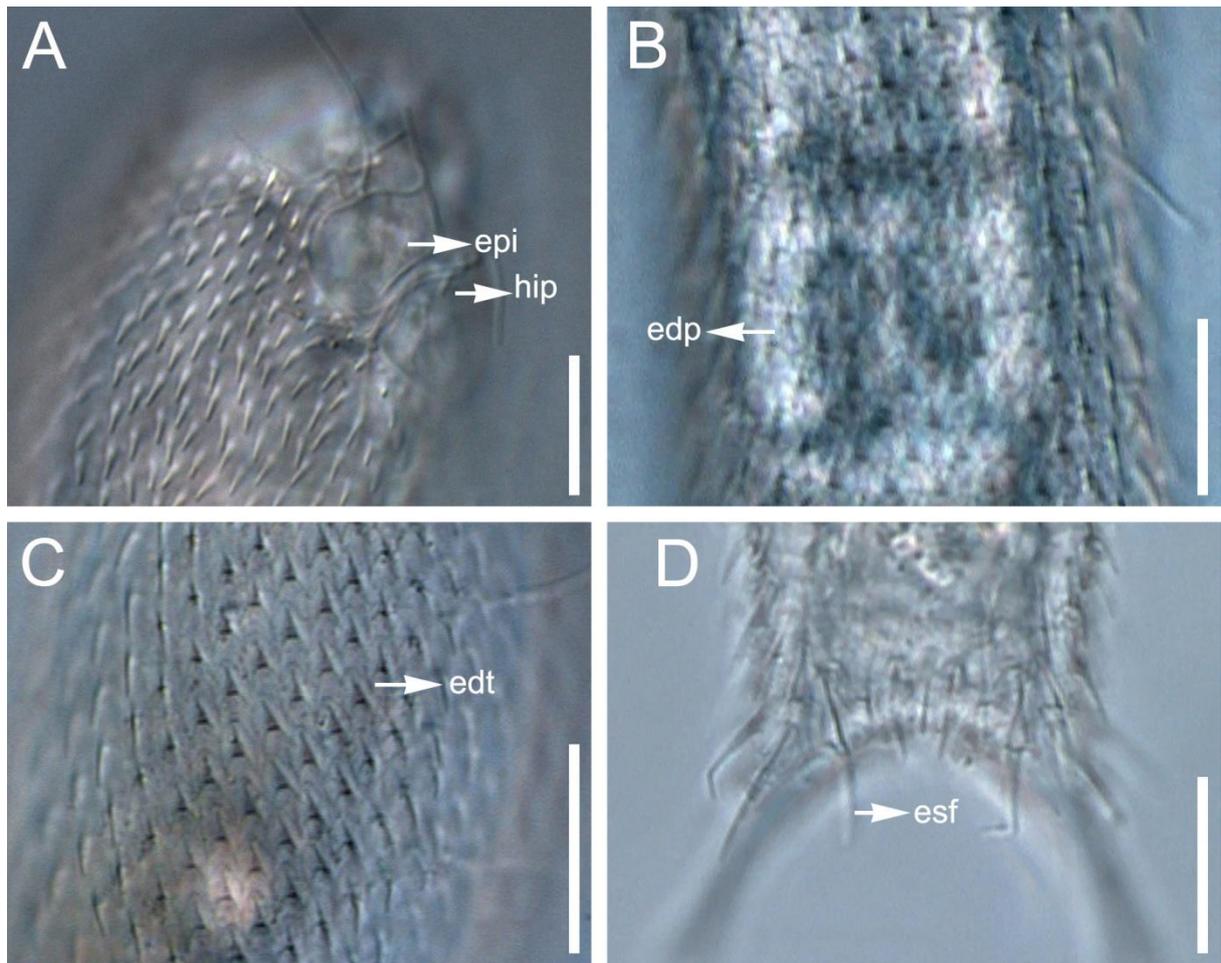


Figura 14. Micrografia de luz - DIC da EC3. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região posterior vista dorsal. Legenda: **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. Escalas **A, B, C, D** 15 μ m.

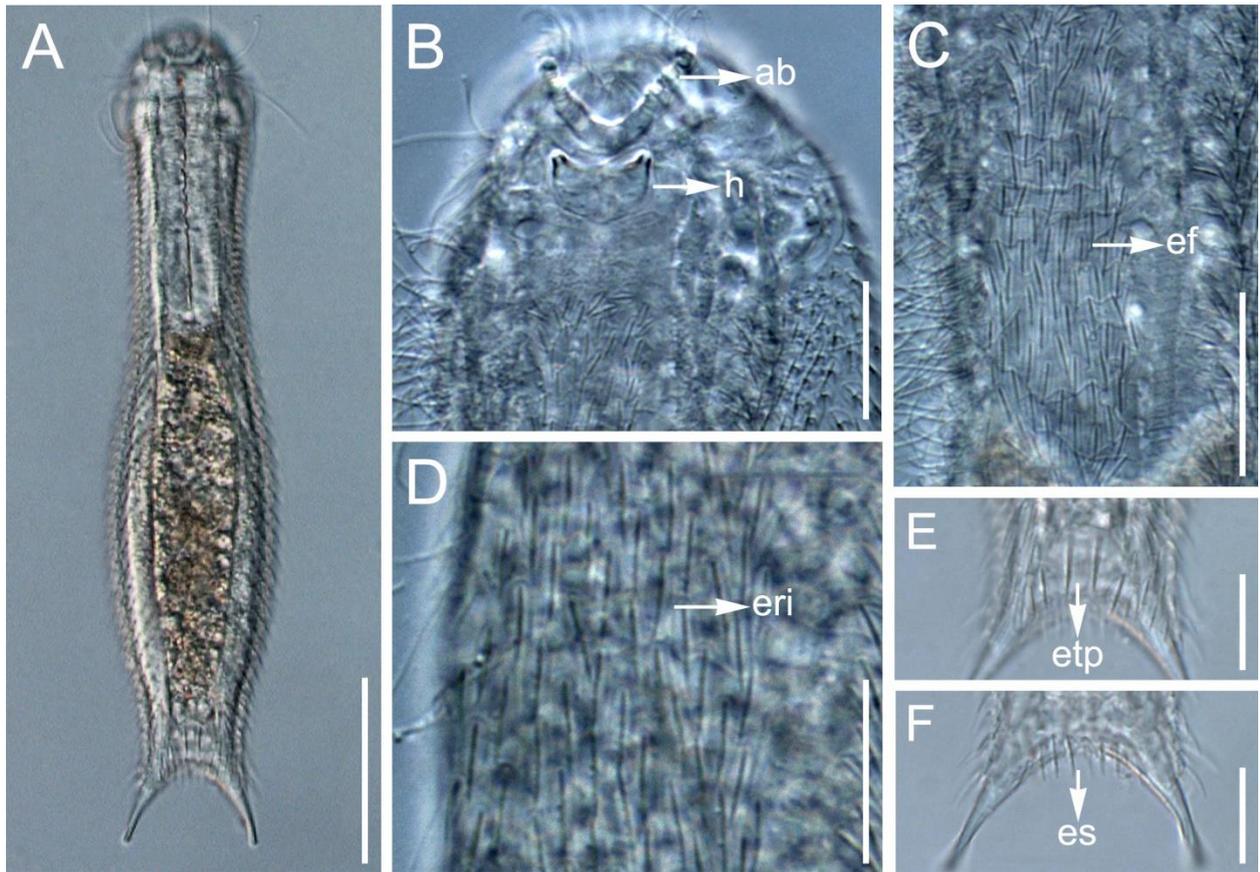


Figura 15. Micrografia de luz - DIC da EC3. **A** habitus; **B** região cefálica visão ventral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior visão ventral; **F** região posterior visão interna. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **esp** -espinho- seis pequenas escamas providas com espinhos que ultrapassam seu limite; **etp** escama terminal pareada; **h** hipostômio. **Escalas** A 50 μm ; B, E, F 15 μm ; C, D 20 μm .

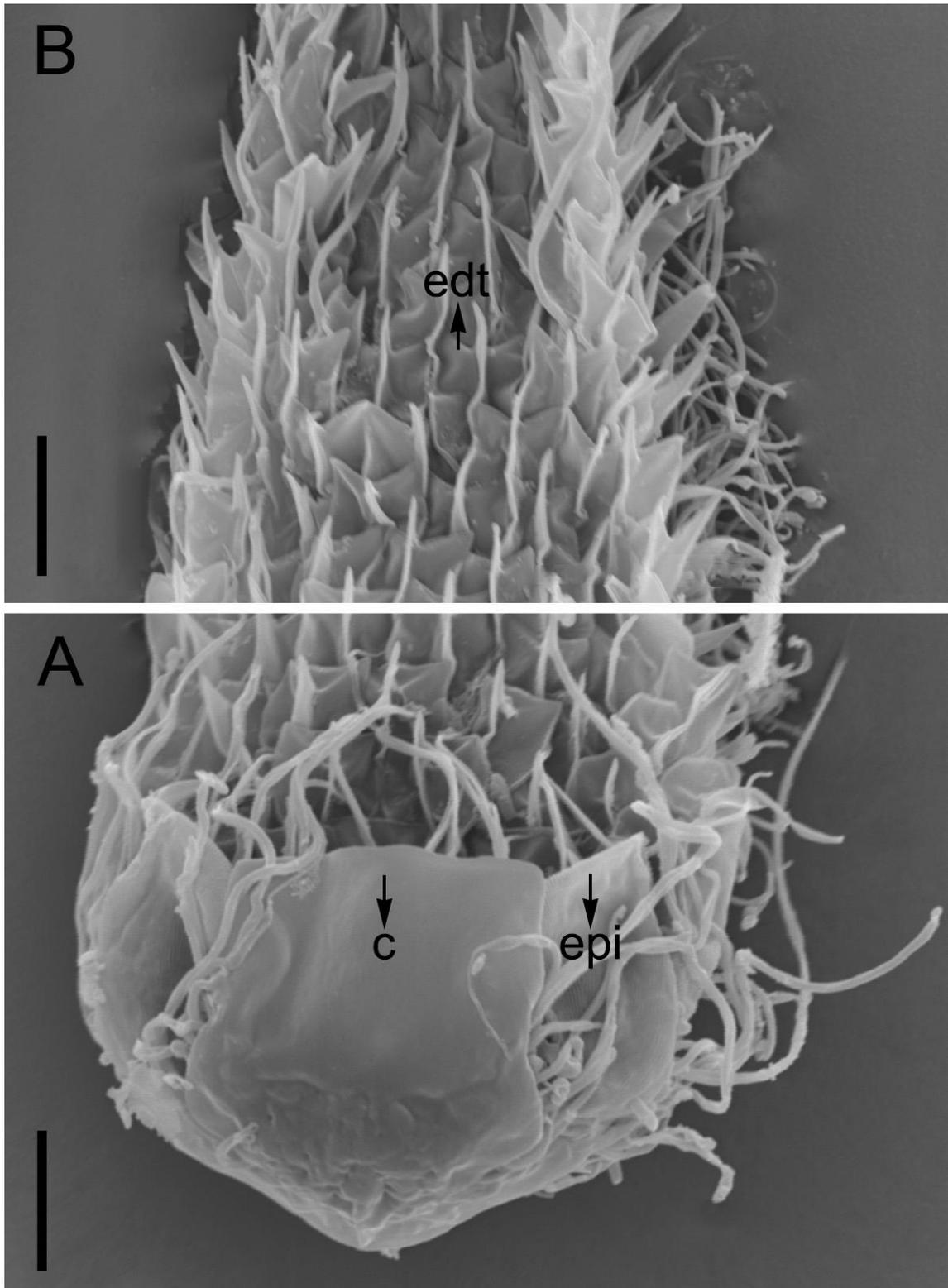


Figura 16. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV da EC3. **A** região cefálica visão dorsal; **B** região mediana do corpo visão dorsal. Legenda: **c** cefalium; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura. Escalas **A, B** 5 μ m.

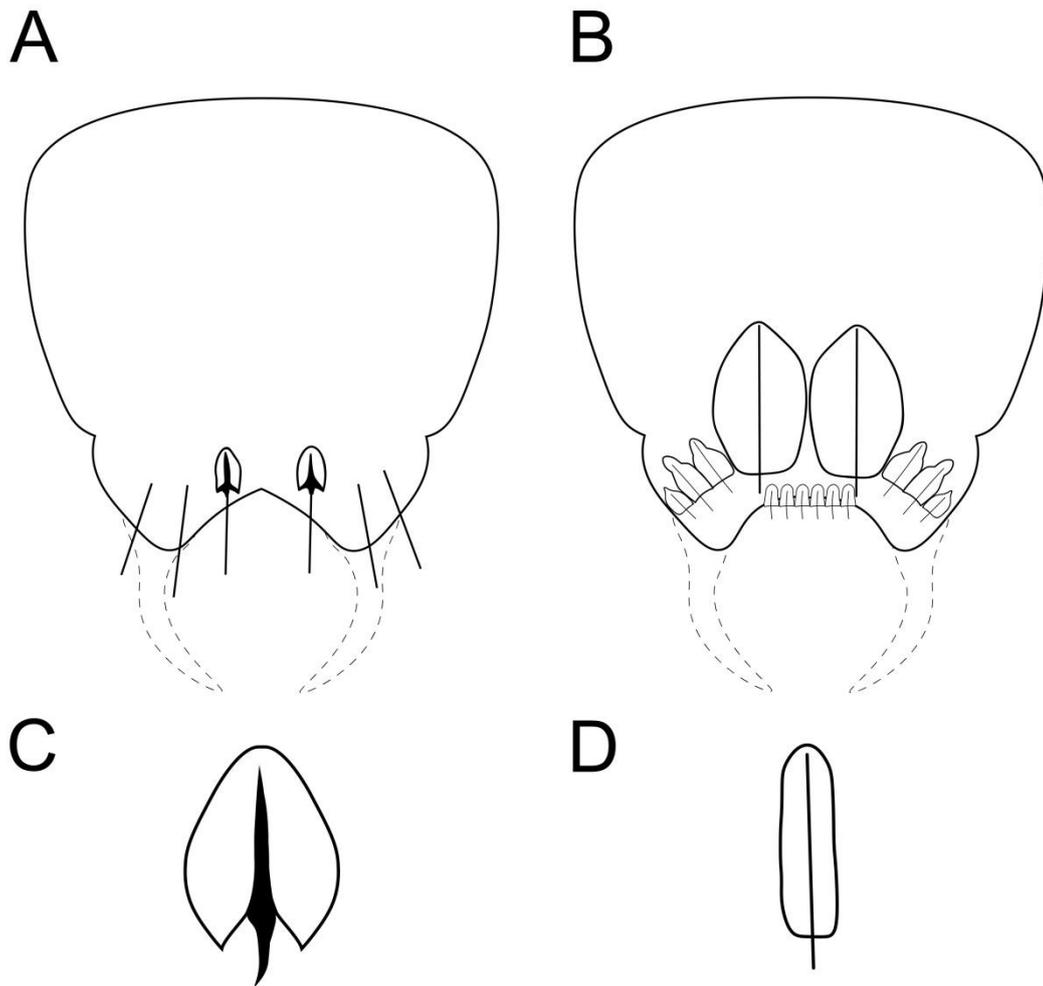


Figura 17. Ilustração esquemática da EC3. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas seguidas com dois pares de três escamas, visão ventral; presença de seis pequenas escamas menores providas com espinhos que ultrapassam seu limite, visão interna; **C** escama dorsal; **D** escama da região interciliar, do campo intestinal. Em tracejado: tubos adesivos.

4.5. EC4

(Figs. 18 a-e; 19 a-e; 20 a-d; 26 e; 28 i,m; Tabela 6)

C. aff. polyspinosus III- Kisielewski 1991, p. 21- 25, figs 14, 18, 22, 26, tab. 7

Material: Três adultos coletados em sedimento, em setembro de 2017, na bacia do rio Paraguaçu, no Município de Mucugê, estado da Bahia, Brasil. Oito espécimes coletados no ano de 1991, em um reservatório (entre areia) na região de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil (Kisielewski, 1991).

Descrição

Habitus: Corpo delgado, com 256-346 μm de comprimento e 74 μm de largura (U52) (**Fig.19-a**). Cabeça constituída por cinco lóbulos, todavia, apenas a o cefalion e a hipopleura formam seu contorno, dando um aspecto trilobado. A cabeça apresenta 45-49 μm de largura (U8) e 2 pares de tufo ciliados, próximos um do outro. Cefalion com 31-38 μm de diâmetro e 21-24 μm de comprimento. Epipleura com 5-9 μm e hipopleura com 14-18 μm de comprimento (**Fig.18-a**). Pescoço com 42-44 μm de largura (U23) (**Fig.18-b**). Faringe com 73-82 μm de comprimento (U5-U33) (**Fig.18-a**), na região de U5 a faringe apresenta 16-20 μm de diâmetro, em U20 e U33 têm 14-15 μm e 15-18 μm de largura, respectivamente. Anel bucal é subterminal, com 12-21 μm de comprimento e envolta por cirros (**Fig.19-b**). Ocelo ausente. Presença de um par posterior e um anterior de cerdas sensoriais.

Furca caudal com 34-42 μm de comprimento. Base da furca com evidente contração (U85) e ausência de espinhos ventrais que ultrapassam seu limite. Os tubos adesivos são finos nas pontas e dobrados para dentro.

Escamas: O dorso é recoberto por escamas formadas por três lóbulos -trilobadas- distribuídas em 35-56 fileiras longitudinais paralelas alternadas, com 39-42 escamas em cada (**Tabela 6**). No pescoço apresentam 3 μm de comprimento (**Fig.18-b**) e de 4-5 μm no tronco (**Fig.18-c; Fig.26-e**). As escamas têm o lóbulo anterior arredondado e a borda interna profundamente côncava (**Fig.18-b, c; Fig.20-c; Fig.26-e**).

Espinhas: Se originam no início da escama, são retos e finos e ultrapassam o limite da escama (**Fig.18-b, c; Fig.20-c**). Os espinhas dorsais da região do pescoço apresentam 4-5 μm (**Fig.18-b**) e no tronco medem 6-8 μm de comprimento (**Fig.18-c; Fig.26-e**). Na base da furca, os espinhas da região interna e mais externa atingem de 4-6 μm de comprimento, eles não ultrapassam o limite da base da furca (**Fig.18-d, e; Fig.20-a; Fig.28-i**). Ausência de espinhas longos dorsais e ventrais (**Fig.20-a, b**).

Região intercililar: A região tem 2 bandas ciliares separadas e é coberta por 13-18 fileiras longitudinais (**Tabela 6**) compostas por escamas e espinhas de 5 μm de comprimento, no campo

intestinal (**Fig.19-d**). Na região da faringe os espinhos medem 3.5 μm (**Fig.19-c**). As escamas são similares às do dorso, contudo, são mais estreitas e a borda interna é suavemente côncava (**Fig.20-d**).

A região interciliar termina com um par de escamas de quilha, com 12-16 μm de comprimento, 9 μm de largura e com quilhas de 9-11 μm de comprimento (U85) (**Fig.19-e; Fig.20-b; Fig.28-m**).

Comentários taxonômicos: Os espécimes de EC4 são caracterizados por terem: cabeça provida com cinco lóbulos, no entanto, apenas o cefalion e o lóbulo posterior formam seu contorno; cefalion largo; tubos adesivos finos e com as pontas viradas para dentro; as escamas que recobrem o corpo têm forma similar no dorso, lateral e ventro-lateral, são estreitas e mostram bordas posteriores profundamente côncavas; boca incomumente larga. Essas características são semelhantes às da forma III de Kisielewski (1991), portanto, essa forma foi incluída em EC4. Os valores medidos dos representantes de EC4 estão de acordo com os relatados pelo gastrotricológico.

A evidente constrição na base da furca; as escamas terminais e o conjunto de escamas no ventre, que é desprovido de espinhos que excedam o seu limite, são características morfológicas que o aproxima da EC2.

Tabela 6. Características morfométricas da EC4, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Característica	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	256 μm	346 μm	5
Comprimento total da furca	34 μm	42 μm	5
Comprimento da faringe	73 μm	82 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do tronco	4 μm	5 μm	5
Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	6 μm	8 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	3 μm	3 μm	3
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	4 μm	5 μm	3
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	4 μm	6 μm	3
Diâmetro do anel da boca	12 μm	21 μm	5
Comprimento do cefalion	21 μm	24 μm	3
Largura do cefalion	31 μm	38 μm	5
Número total de fileiras longitudinais alternadas	35	56	5
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	39	42	4
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	13	18	5
Comprimento do par que escamas terminais	12 μm	16 μm	4
Largura do par de escamas terminais	9 μm	9 μm	2
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	9 μm	11 μm	5
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	4 μm	6 μm	3
Comprimento da escama ventral da base da furca	5 μm	4 μm	2

Comprimento do espinho ventral da base da furca	5 μm	4 μm	2
Comprimento dos espinhos centrais	-	-	-
Largura da epipleura	5 μm	9 μm	5
Largura da hipopleura	14 μm	18 μm	5
Comprimento da escama da região interciliar	5 μm	5 μm	1
Comprimento do espinho da região interciliar	5 μm	5 μm	1

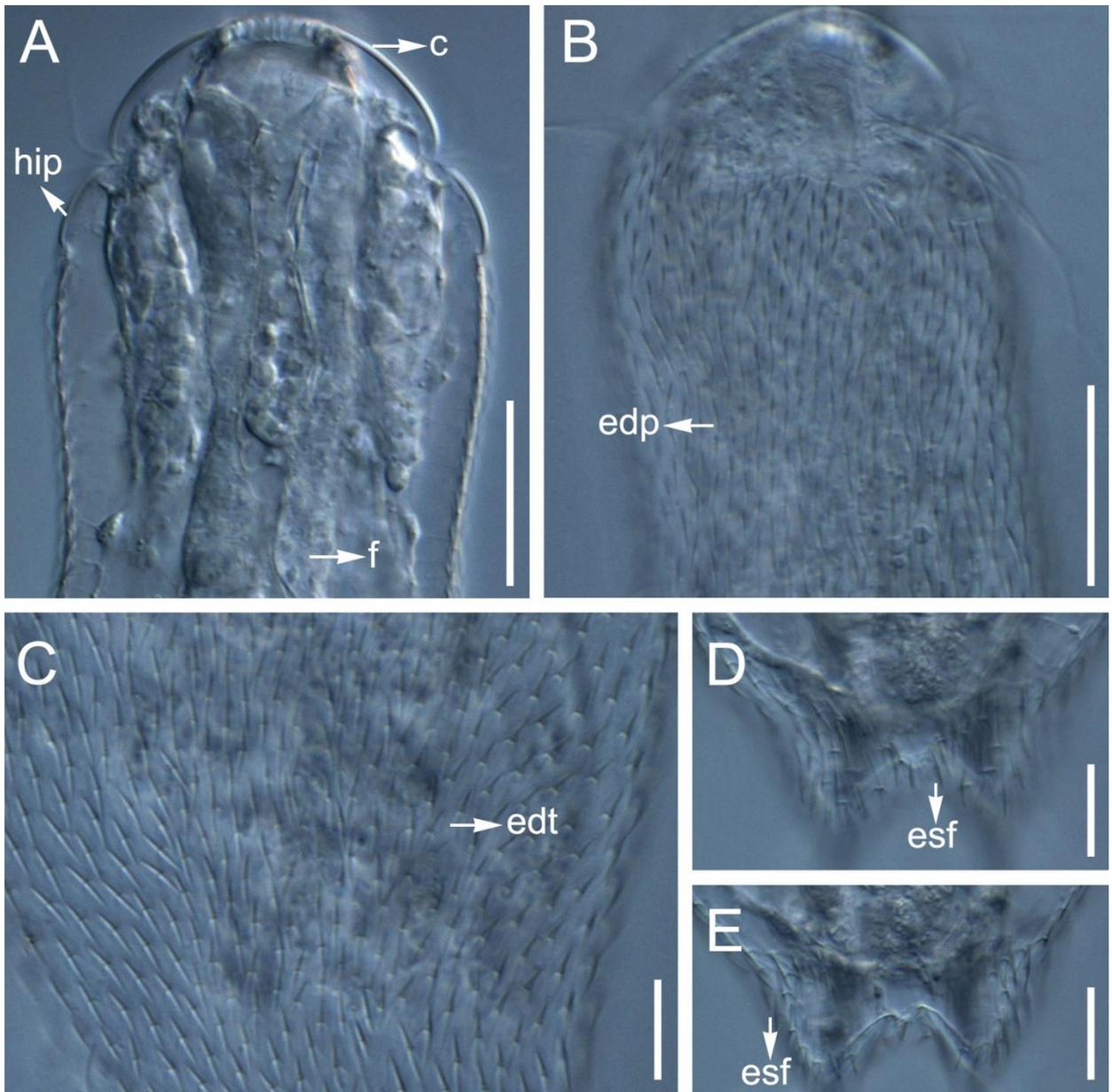


Figura 18. Micrografia de luz - DIC da EC4. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D, E** região posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalio; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **esf** espinho furcal; **f** faringe; **hip** hipopleura. **Escalas A, B** 20 μm ; **C, D, E** 10 μm .

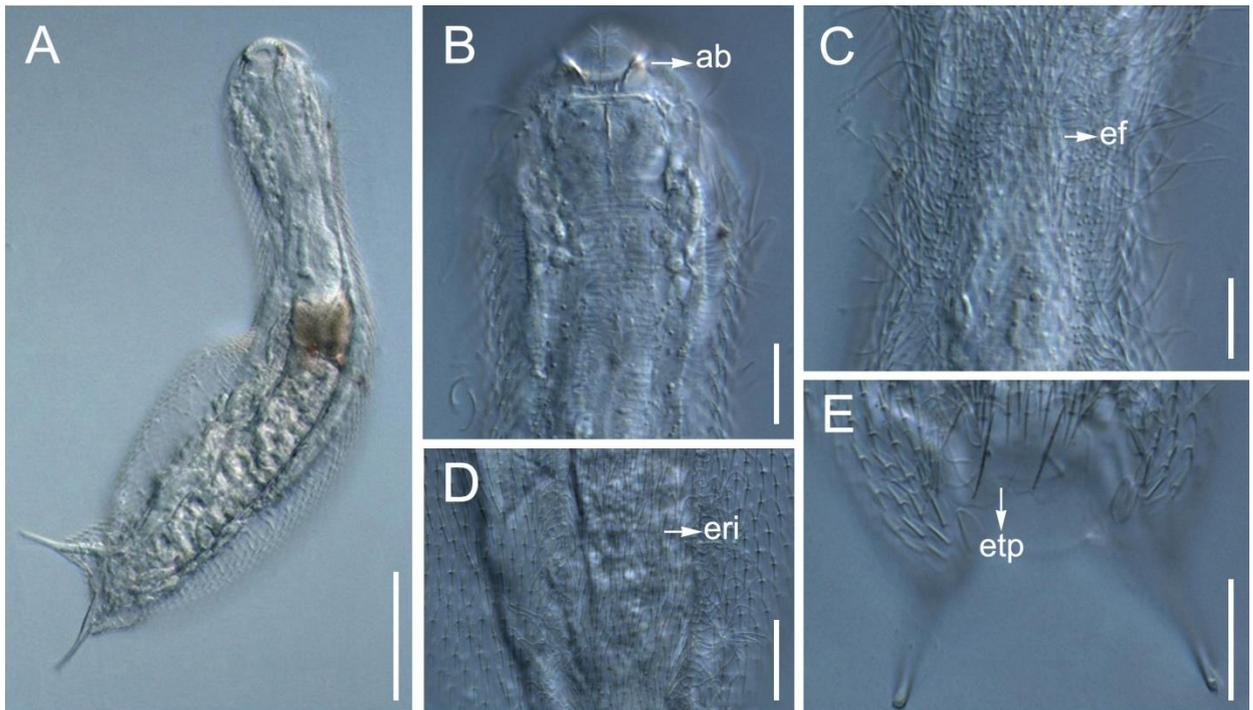


Figura 19. Micrografia de luz - DIC da EC4. **A** habitus; **B** região cefálica visão ventral; **C** região anterior visão ventral; **D** região mediana do corpo vista ventral; **E** região posterior visão ventral. Legenda: **ab** anel bucal; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **etp** escama terminal pareada. Escalas **A** 50 μm ; **B**, **C**, **D** 10 μm ; **E** 15 μm .

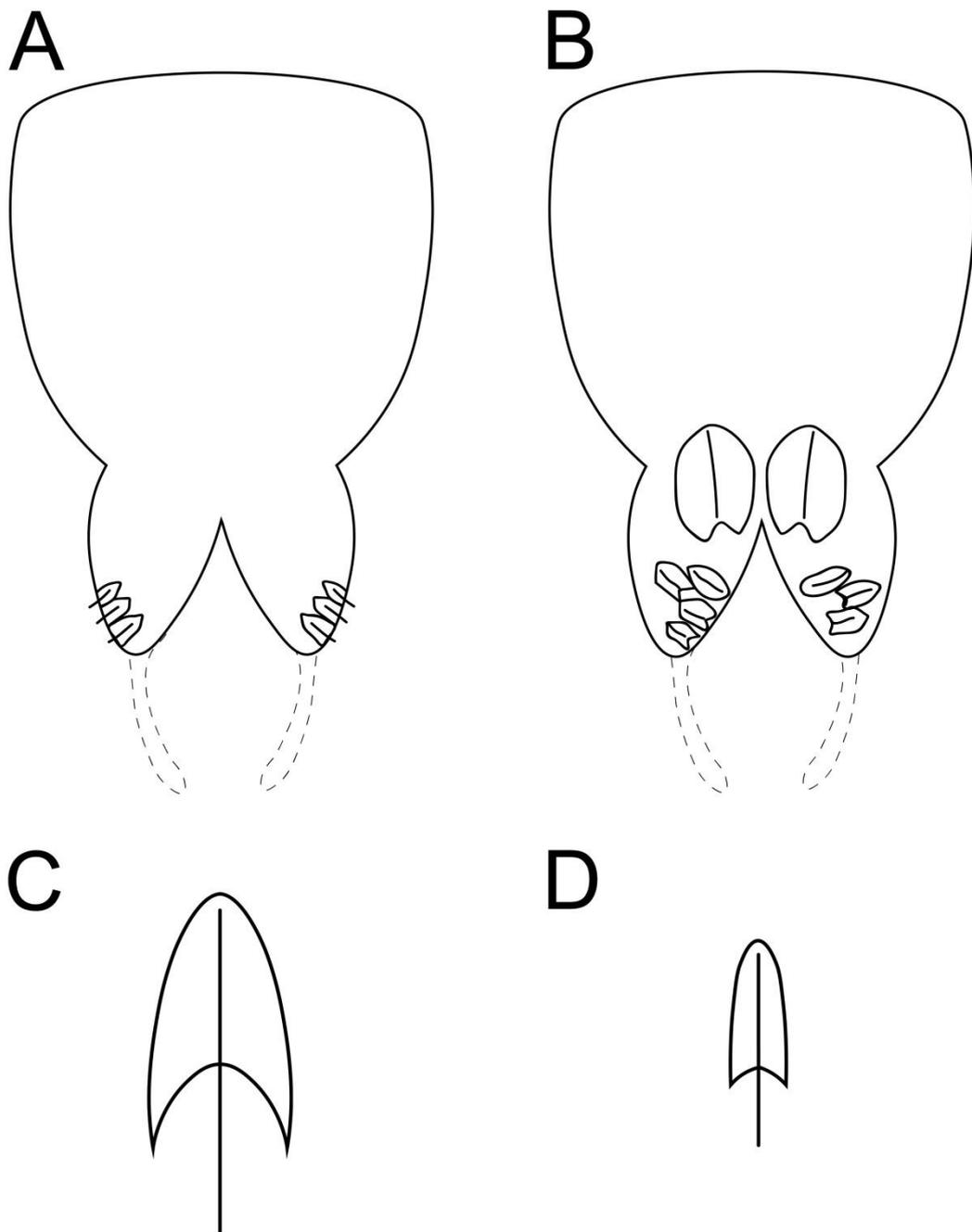


Figura 20. Ilustração esquemática da EC4. **A** Conjunto de escamas da base da furca, visão dorsal; **B** Escamas terminais pareadas e pequenas escamas com espinhos que não ultrapassam seu limite, visão ventral; **C** escama dorsal; **D** escama da região interciliar, do campo intestinal. Em tracejado: tubos adesivos.

4.6. *Chaetonotus ventrochaetus* (Kisielewski, 1991)

(Figs. 21 a-d; 22 a-d; 23 a-c; 24 a-c; 25 d; 26 f; 27 d; 28 j,n; 29 c; Tabela 7)

C. ventrochaetus- Kisielewski 1991, p. 47- 50, figs 60- 62, tab. 17

Material: Três adultos coletados em substrato associado a raízes de *Echhornia* sp. nos anos de 2016 e 2017 em um lago urbano no município de Paulínia, estado de São Paulo, Brasil. Dez espécimes coletados no ano de 1991, em manguezal do Rio Guaraú (entre lodo e areia) na Reserva da Juréia, estado de São Paulo, Brasil (Kisielewski, 1991).

Descrição

Habitus: Corpo com 151-311 μm de comprimento, sendo o diâmetro do corpo de 46 μm (U56). Faringe atingindo 49-81 μm (U5-U28) com uma dilatação posterior. Pentalobado. Cabeça com 46 μm de diâmetro (U8). Cefalion de 19 μm de comprimento e 15-29 μm de diâmetro. Epipleura com 8-11 μm e hipopleura com 10-13 μm (Fig.21-a; Fig.23-a; Fig.25-d). A boca é subterminal e tem 6-15 μm de diâmetro (Fig.22-a; Fig.23-a; Fig.25-d).

Pescoço com 33 μm de largura na região U26. Presença de um par posterior e um anterior de cerdas sensoriais. Ocelo ausente. Furca caudal com 31-48 μm de comprimento e com constrição (U79), os tubos adesivos são longos e finos (Fig.23-c).

Escamas: As escamas dorsais são quilhadas, constituídas de três lóbulos -trilobadas- com ângulo de abertura “aberto”, constrição evidente na região central da escama e tem região posterior fortemente côncava (Fig.21-b, c; Fig.23-b; Fig.24b; Fig.26-f; Fig.27-d).

O dorso é coberto por escamas que apresentam 4-6 μm de comprimento no pescoço (Fig.21-b) e 7-8 μm no tronco (Fig.21-c; Fig.23-b; Fig.26-f; Fig.27-d). Estão dispostas em 14-37 fileiras longitudinais alternadas com 38-42 escamas em cada fileira (Tabela 7), elas encostam umas nas outras.

Espinhas: Os espinhos “projeções espinhosas” se originam no início da escama e elevam-se em sua região central, são grossos, retos e ultrapassam um pouco o limite da escama (Fig.23-b; Fig.24b). No pescoço (Fig.21-b) os espinhos apresentam 4-8 μm e no tronco 4-10 μm de comprimento (Fig.21-c; Fig.23-b; Fig.26-f; Fig.27-d).

No dorso da furca há 3 pares de espinhos grossos e muito longos que atingem 17-23 μm de comprimento (U84) (Fig.21-d; Fig.23-c; Fig.24-a; Fig.28-j; Fig.29-c). Na região interna da

base da furca o maior espinho tem 10 μm de comprimento. No ventre há 2 pares de espinhos longos (3D+2V) (**Fig.22-d; Fig.24-a; Fig.28-n**).

Região interciliar: O campo interciliar é recoberto por 8-10 fileiras longitudinais alternadas (**Tabela 7**). Na região da faringe, da primeira a terceira fileira transversal as escamas têm 2 μm de comprimento, da quarta até a nona fileira apresentam 2,5 μm e na décima fileira 3 μm de comprimento, aumentando gradualmente ao longo do corpo. Os espinhos das escamas da faringe não ultrapassam seu limite (**Fig.22-b; Fig.24-c**). O campo intestinal é coberto por escamas de 5 μm e espinhos de 6 μm de comprimento (**Fig.22-c**). A região termina com um par de escamas de quilhas com 11-14 μm de comprimento, diâmetro de 5-7 μm e quilhas de 14-17 μm de comprimento.

Comentários taxonômicos: Os espécimes analisados, portadores das características: tubos adesivos grossos e retos; base da furca com três espinhos com base espessa; ventre e lateral da base da furca providos com espinhos do mesmo comprimento que os espinhos dorsais ou um pouco mais curtos, porém mais finos e campo interciliar formado por oito fileiras longitudinais alternadas foram identificados como representantes da espécie *Chaetonotus ventrochaetus* descrita por Kisielewski (1991).

O gastrotricológico cita que *Chaetonotus ventrochaetus* parece estar próxima de *Chaetonotus polyspinosus* pelos espinhos conspícuos dorsais da base da furca, fileiras longitudinais dispostas de forma oblíqua na região posterior do tronco, bem como as escamas com espinhos no campo ventral. Contudo, a diferença de comprimento entre os espinhos dorsais do tronco e da base da furca não é substancial em *Chaetonotus ventrochaetus*, em contraste com *Chaetonotus polyspinosus*.

Ainda, relata que o formato de nenhuma escama foi estudado satisfatoriamente, no entanto, a aparência de sua borda posterior côncava sugere que a escama é formada por um lóbulo. Foi observado, no presente estudo, que a escama dorsal se constitui de três lóbulos e apresenta uma evidente constrição em sua região central.

Tabela 7. Características morfométricas de *Chaetonotus ventrochaetus*, N= número total de indivíduos medidos. Medidas fornecidas em micrômetros (μm).

Característica	Mínimo	Máximo	N
Comprimento do corpo	151 μm	311 μm	5
Comprimento total da furca	31 μm	48 μm	5
Comprimento da faringe	49 μm	81 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do tronco	7 μm	8 μm	3
Comprimento dos espinhos dorsais do tronco	4 μm	10 μm	5
Comprimento das escamas dorsais do pescoço	4 μm	6 μm	3
Comprimento dos espinhos dorsais do pescoço	4 μm	8 μm	5
Comprimento do maior espinho dorsal da base da furca	17 μm	23 μm	3
Diâmetro do anel da boca	6 μm	15 μm	5
Comprimento do cefalion	19 μm	19 μm	1
Largura do cefalion	15 μm	29 μm	3
Número total de fileiras longitudinais alternadas	14	37	3
Número de escamas em uma única fileira longitudinal	38	42	2
Número de fileiras longitudinais da região interciliar (campo intestinal)	8	10	3
Comprimento do par que escamas terminais	11 μm	14 μm	3
Largura do par de escamas terminais	5 μm	7 μm	3
Comprimento das quilhas do par de escamas terminais	14 μm	17 μm	3
Maior espinho interno da base da furca (dorso)	10 μm	10 μm	2
Comprimento da escama ventral da base da furca	-	-	-
Comprimento do espinho ventral da base da furca	-	-	-
Comprimento dos espinhos centrais	-	-	-
Largura da epipleura	8 μm	11 μm	3
Largura da hipopleura	10 μm	13 μm	5
Comprimento da escama da região interciliar	5 μm	5 μm	1
Comprimento do espinho da região interciliar	6 μm	6 μm	1

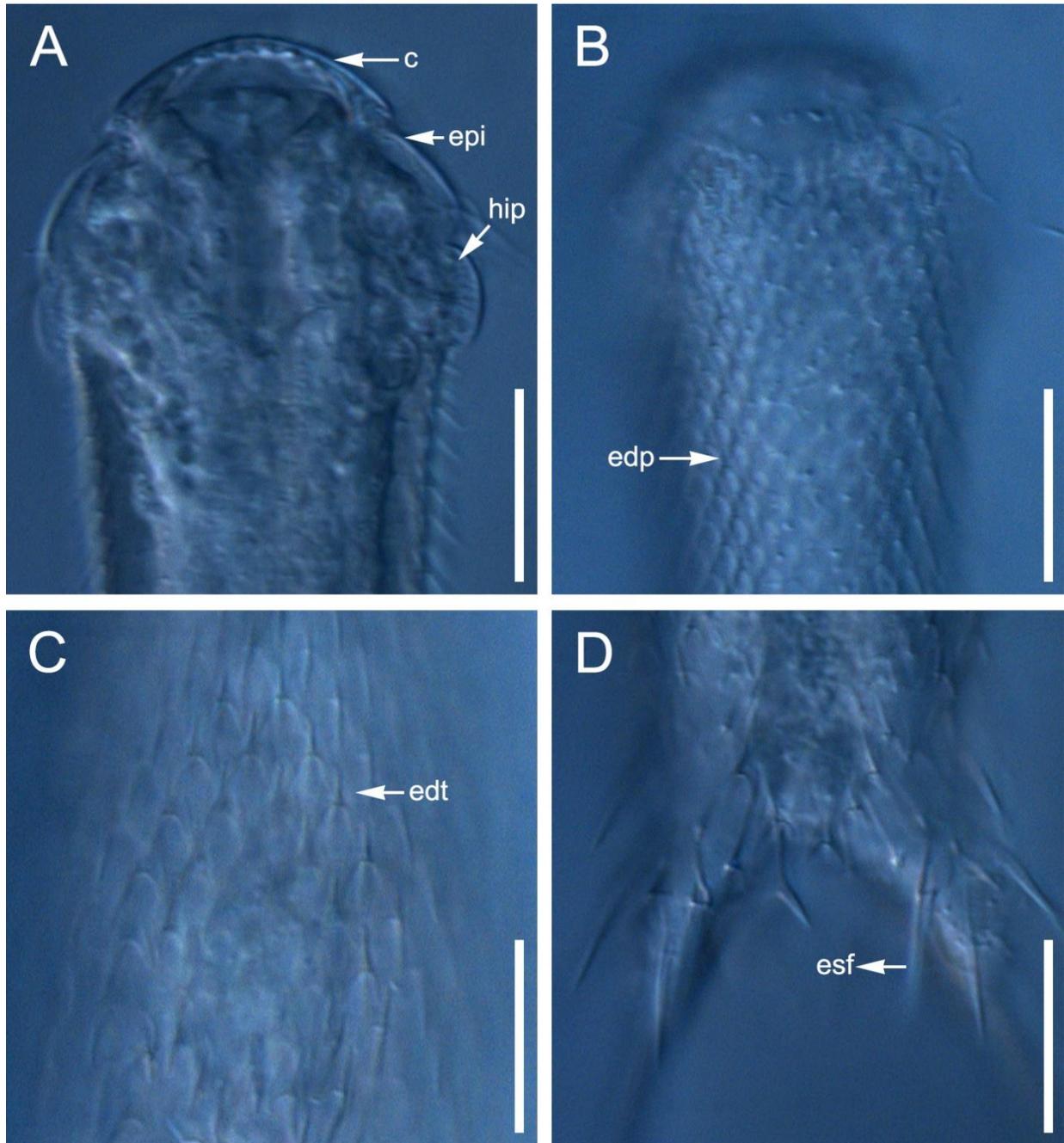


Figura 21. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão interna; **B** região anterior visão dorsal; **C** região mediana do corpo visão dorsal; **D** região posterior vista dorsal. Legenda: **c** cefalion; **edp** escama dorsal do pescoço; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura. Escalas **A, B, C, D** 20 μm .

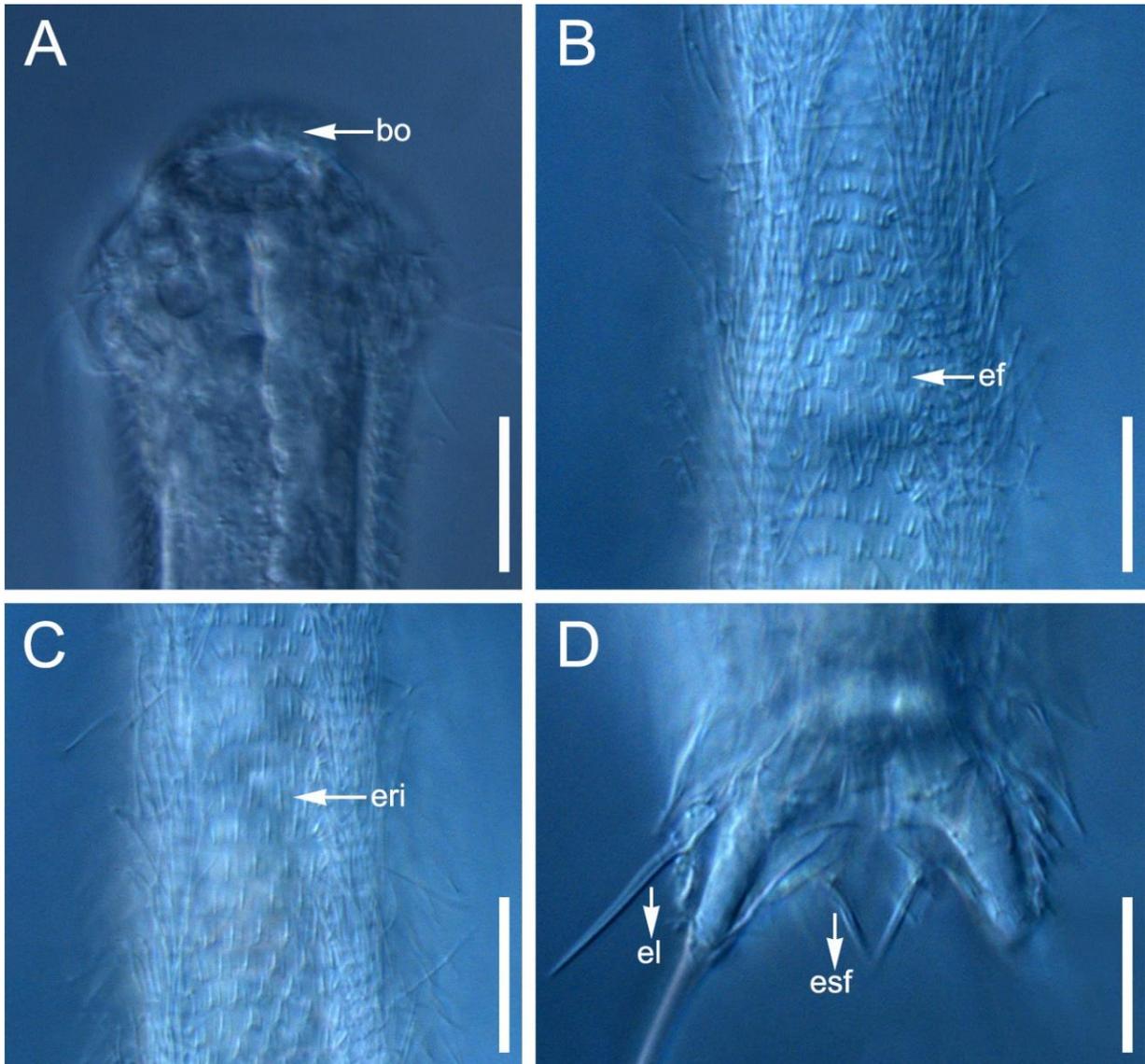


Figura 22. Micrografia de luz - DIC *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão ventral; **B** região anterior visão ventral; **C** região mediana do corpo vista ventral; **D** região posterior visão ventral. Legenda: **bo** boca; **ef** escama da faringe; **eri** escama da região interciliar; **el** espinho lateral; **esf** espinho furcal. **Escalas A, B, C, D** 15 μm .

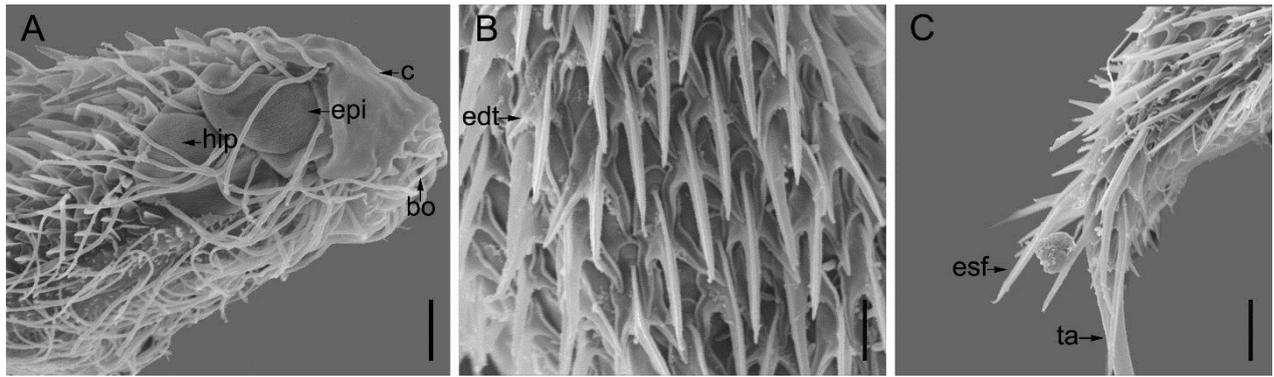


Figura 23. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** região cefálica visão dorsolateral; **B** região mediana do corpo visão dorsal; **C** região posterior visão dorsolateral. Legenda: **bo** boca; **c** cefalion; **edt** escama dorsal do tronco; **epi** epipleura; **esf** espinho furcal; **hip** hipopleura; **ta** tubo adesivo. **Escalas A, B, C** 5 μ m.

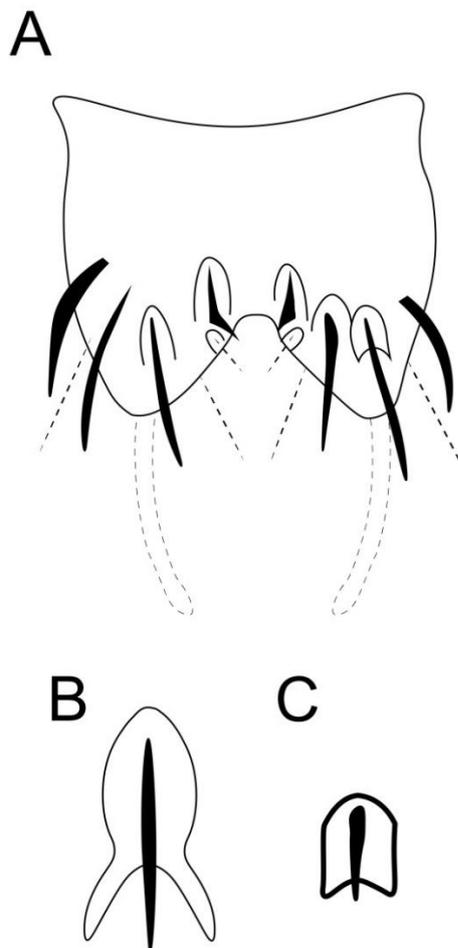


Figura 24. Ilustração esquemática de *Chaetonotus ventrochaetus*. **A** Conjunto de escamas e espinhos dorsais e ventrais da base da furca; **B** escama dorsal; **C** escama da região interciliar, da faringe. Em tracejado: espinhos ventrais da base da furca e tubos adesivos.

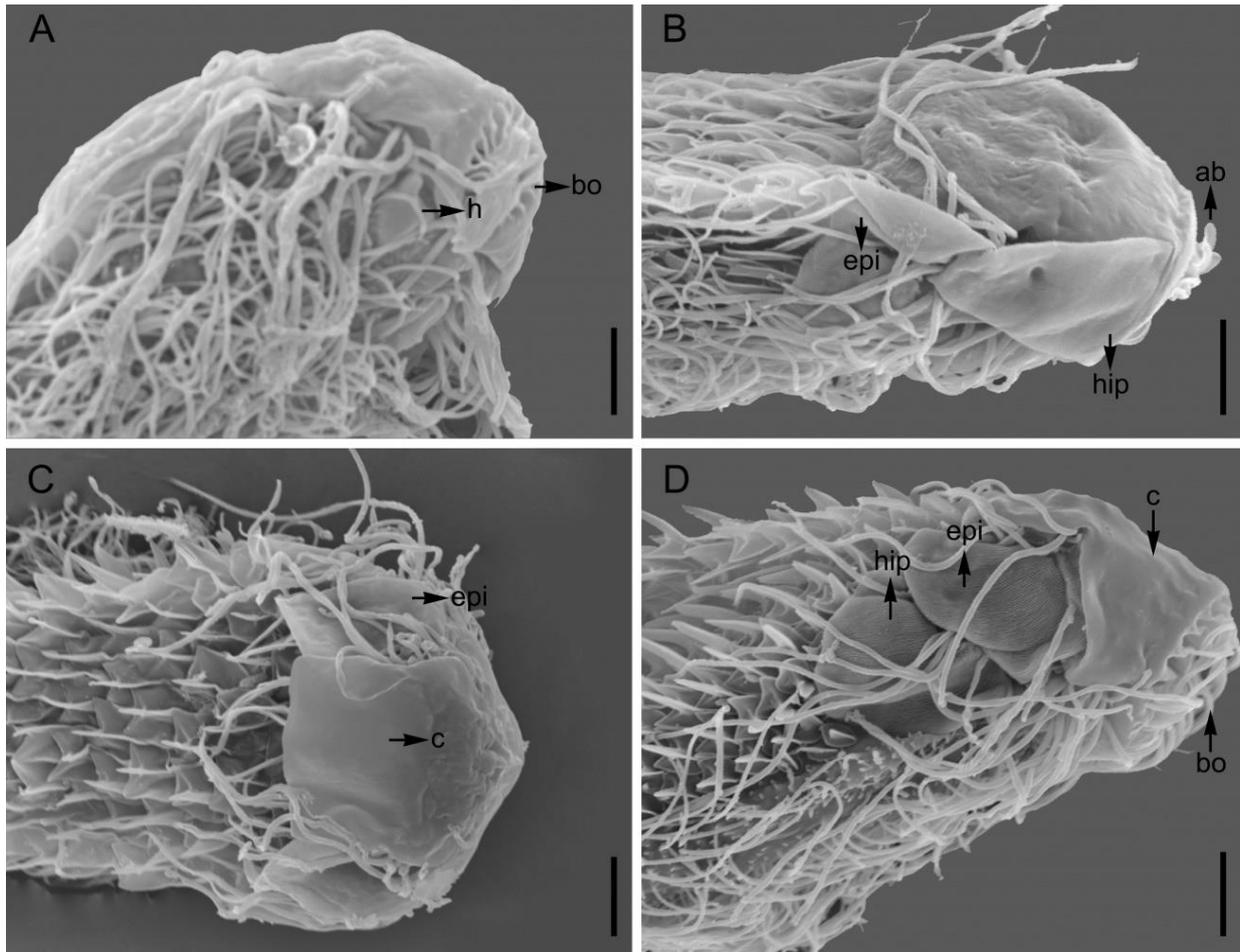


Figura 25. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região cefálica. **A** EC1, visão dorsolateral; **B** EC2, visão dorsolateral; **C** EC3, visão dorsal; **D** *Chaetonotus ventrochaetus*, visão dorsolateral. Legenda: **ab** anel bucal; **bo** boca; **c** cefalion; **epi** epipleura; **hip** hipopleura; **h** hipostômio. Escalas **A, B, C, D** 5 μm .

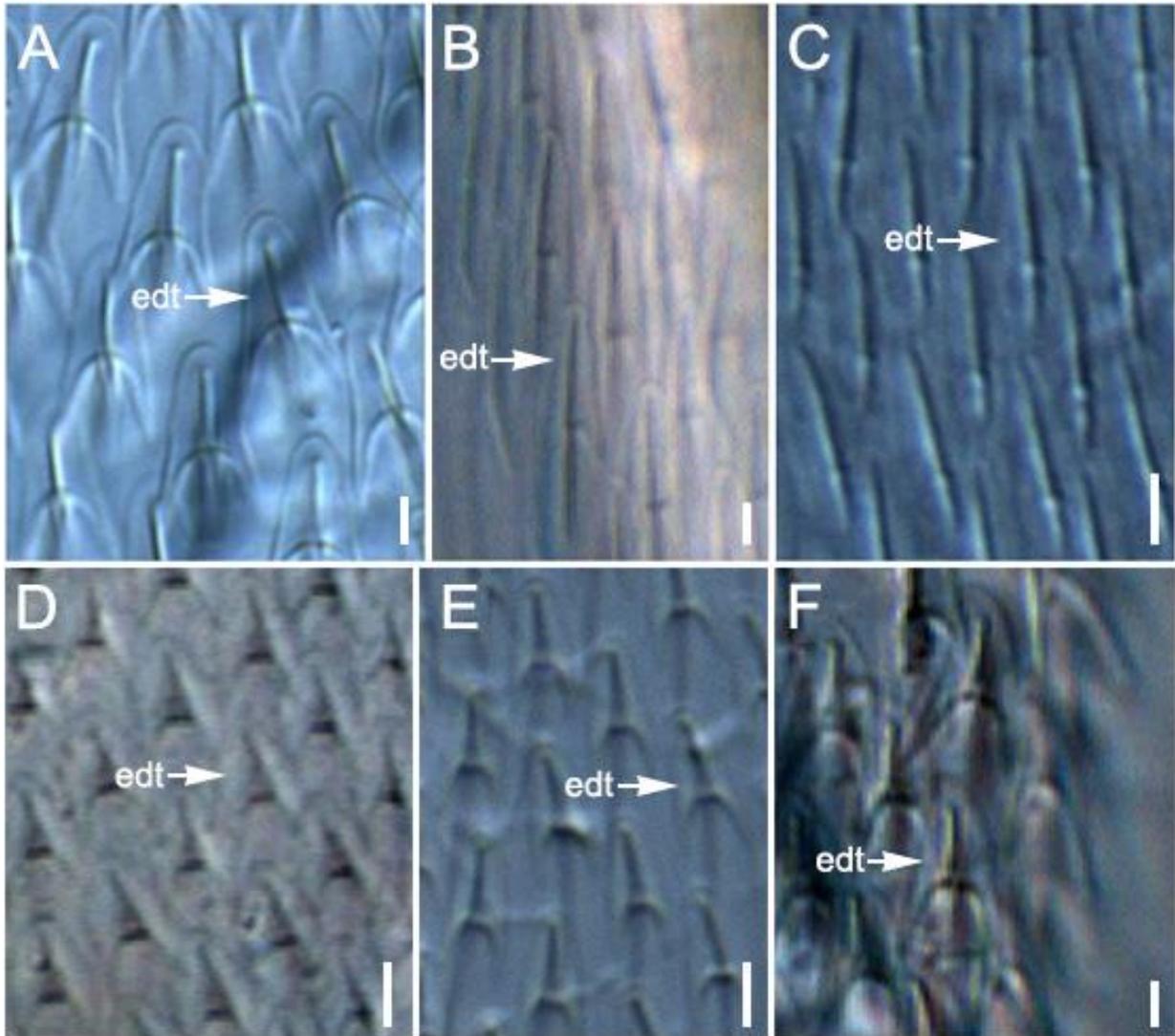


Figura 26. Micrografia de luz – DIC Região mediana do corpo, visão dorsal. **A** *Chaetonotus polypinosus*; **B** EC1; **C** EC2; **D** EC3; **E** EC4; **F** *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **edt** escama dorsal do tronco. **Escala** **A, B, C, D, E, F** 2 µm.

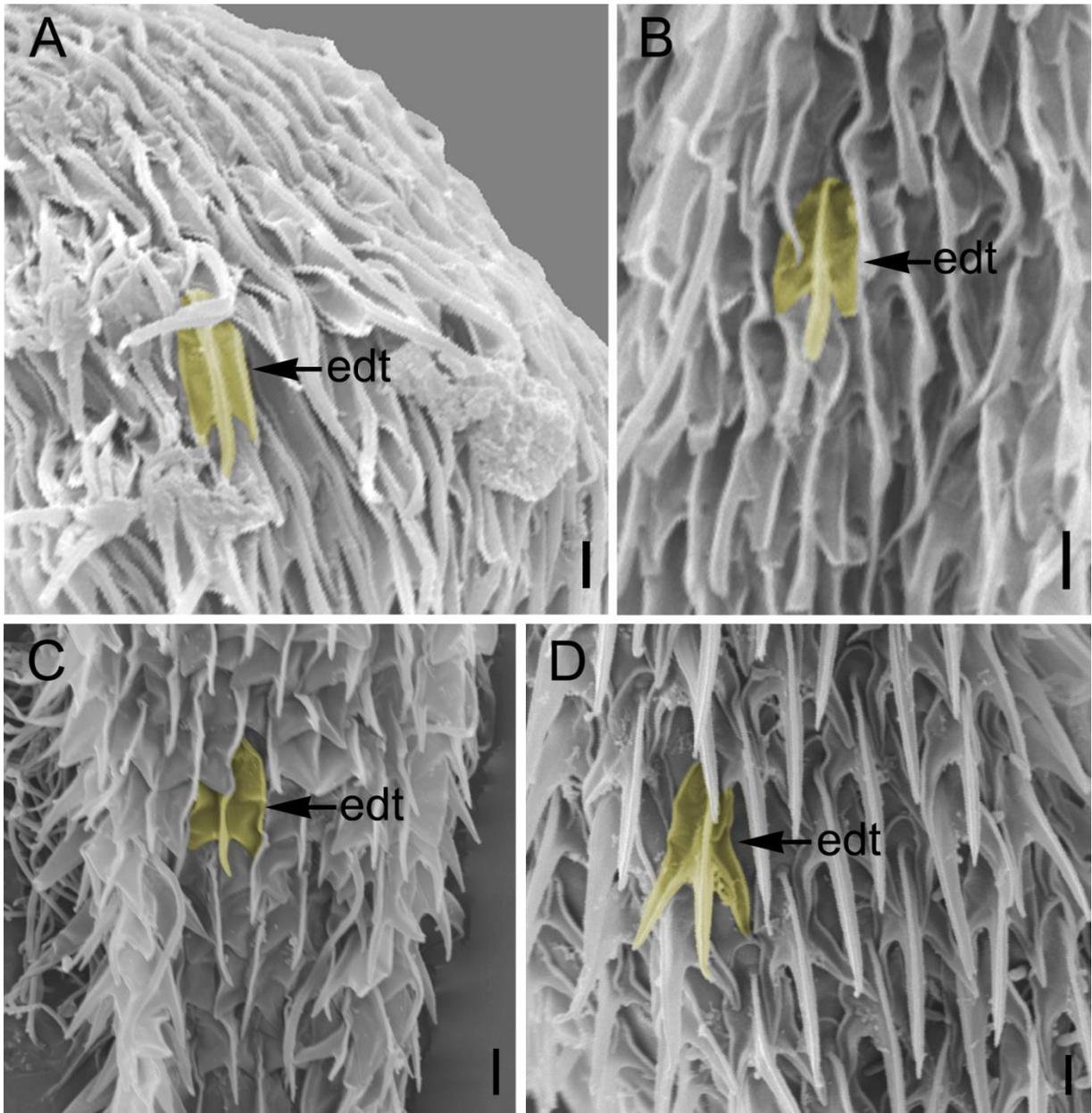


Figura 27. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região mediana do corpo, visão dorsal. **A** EC1; **B** EC2; **C** EC3; **D** *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **edt** escama dorsal do tronco. **Escalas** **A, B, C, D** 2 µm. Colorido artificialmente.

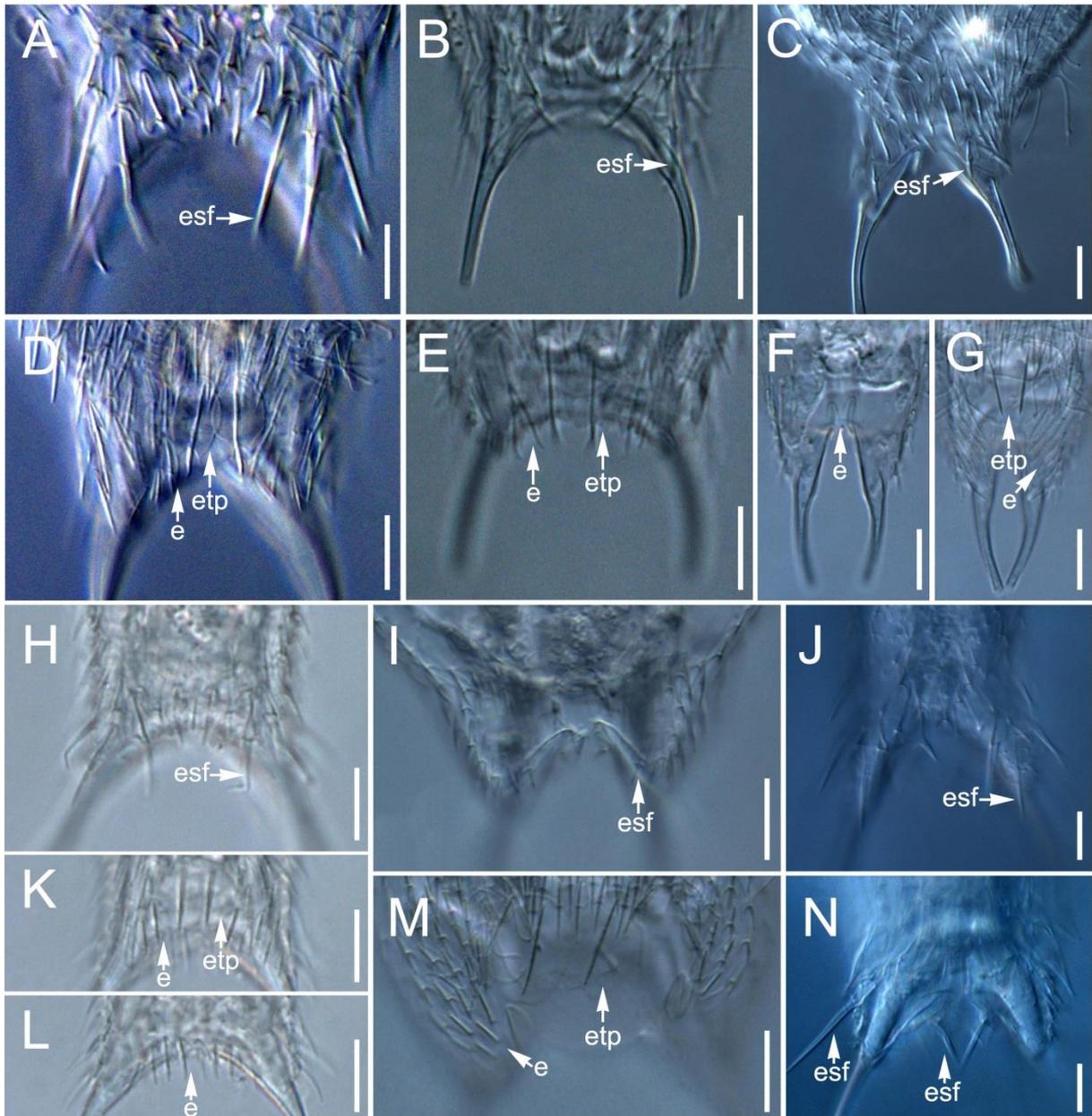


Figura 28. Micrografia de luz - DIC Região posterior do corpo. **A** espinho furcal visão dorsal *Chaetonotus polyspinosus*; **B** espinho furcal visão dorsal, EC1; **C** espinho furcal visão dorsal, EC2; **D** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, *Chaetonotus polyspinosus*; **E** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, EC1; **F** par de escamas quilhadas localizadas no centro da base da furca visão interna, EC2; **G** escama terminal pareada e dois pares com cinco pequenas escamas, EC2; **H** espinho furcal visão dorsal, EC3; **I** espinho furcal visão dorsal, EC4; **J** espinho furcal visão dorsal, *Chaetonotus ventrochaetus*; **K** escama terminal pareada e dois pares com três escamas menores visão ventral, EC3; **L** seis pequenas escamas providas com espinhos que ultrapassam seu limite, localizadas no centro da base da furca visão interna, EC3; **M** escama terminal pareada e conjunto de pequenas escamas visão ventral, EC4; **N** espinho furcal visão ventral, EC3.

N espinho furcal visão ventral, *Chaetonotus ventrochaetus*. Legenda: **e** escama; **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada. Escalas **A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N** 10 μm .

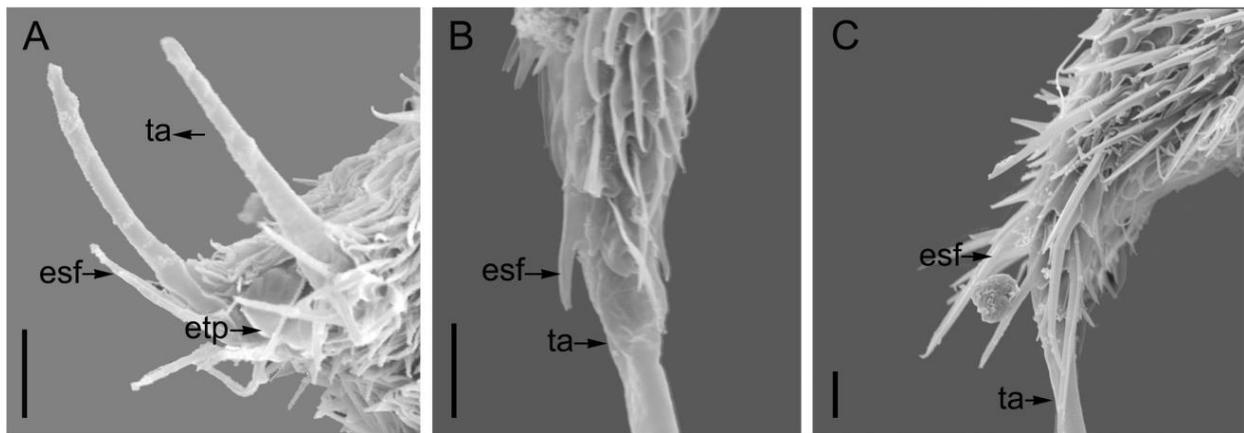


Figura 29. Micrografia Eletrônica de varredura- MEV Região posterior. **A** EC1, visão dorsal; **B** EC2, visão dorsolateral; **C** *Chaetonotus ventrochaetus*, visão dorsolateral. Legenda: **esf** espinho furcal; **etp** escama terminal pareada; **ta** tubo adesivo. Escalas **A, B, C** 5 μm .

4.7. Análise morfométrica

Foram utilizadas medidas de 42 espécimes sendo 27 espécimes brasileiros e 15 espécimes retirados da literatura, dos quais 7 indivíduos eram do G1, 6 do G2, 5 do G3, 6 do G4, 5 do G5, 5 do G6, 4 do G7, 2 do G8 e 2 do G9. O LDA usou 23 das 25 características inseridas na análise, pois os valores de d1 e d20 estavam altamente correlacionados, assim foram excluídos.

O primeiro e o segundo eixos discriminantes lineares descreveram 42% e 23,43% da variação morfológica entre os grupos, respectivamente.

O comprimento do espinho dorsal do pescoço (d7) e o comprimento da escama da região interciliar, no campo intestinal (d24) foram as características morfológicas com os maiores valores positivos para o primeiro vetor de discriminação (LD1), indicando uma grande contribuição dos valores desses dois caracteres nesse modelo de separação multivariada (**Fig. 30**). Essas variáveis separaram os espécimes em cinco grupos: **I**: 2 e 4; **II**: 5; **III**: 7; **IV**: 8; **V**: 1, 3, 6 e 9.

Os maiores coeficientes negativos foram o comprimento da escama dorsal do tronco (d4) e o diâmetro do anel da boca (d9), separando principalmente G8 dos demais.

Alternativamente, o segundo vetor discriminante (LD2) teve o comprimento dos espinhos da região interciliar (d25) como o maior coeficiente positivo e o comprimento das escamas da região interciliar (d24) como o maior valor negativo, separando G5, G7 e G8 dos demais grupos.

Portanto, as espécies candidatas que foram agrupadas da mesma forma que os estabelecidos com base na morfologia são os representantes europeus de *Chaetodonotus polyspinosus* (G7), *Chaetodonotus ventrochaetus* (G5) e *Chaetodonotus pseudopolyspinosus* (G8) retiradas da literatura. As espécies candidatas não identificadas foram as constituintes de G1, G2, G3, G4 e G6 representantes das populações brasileiras, que necessitam de mais dados para serem definitivamente separadas. G9, representado por *Chaetodonotus breviacanthus* também não foi discriminado.

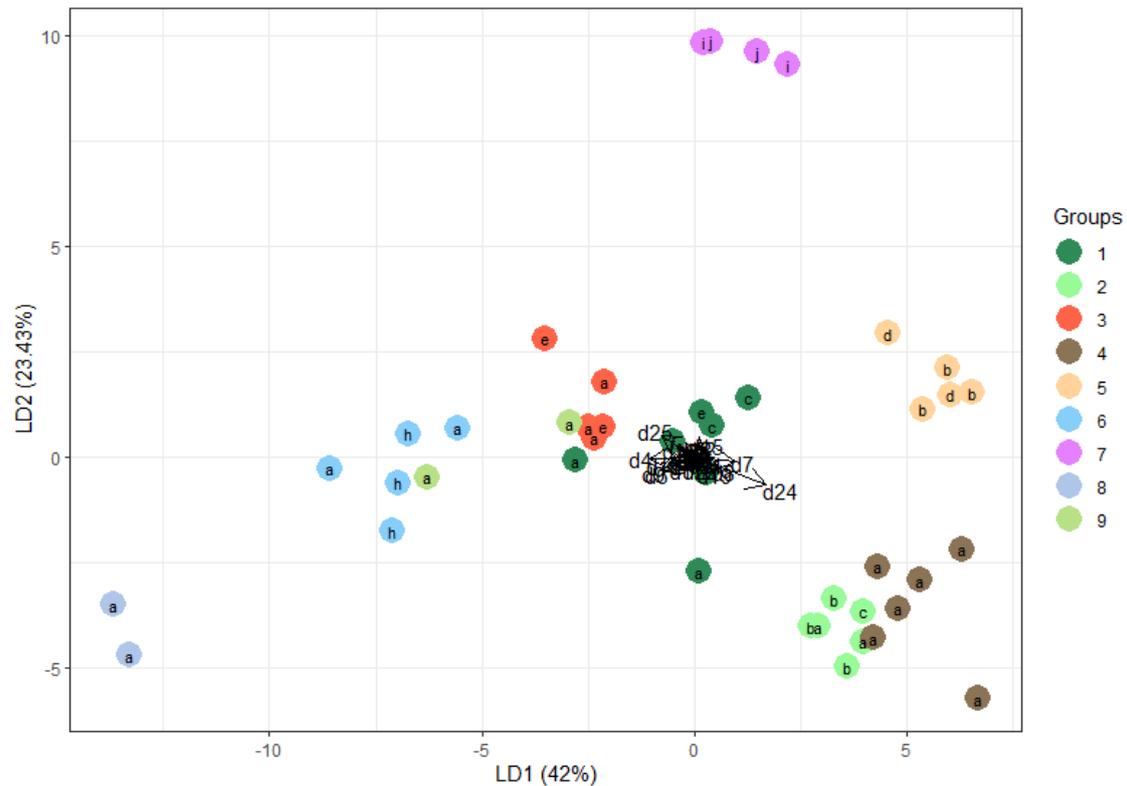


Figura 30. Gráfico da Análise de Discriminantes Lineares: Eixos 1 e 2 da análise baseada em vinte e três características morfológicas, utilizando espécimes brasileiros e europeus (Ver Material e Métodos para a definição das características morfológicas e Material Suplementar 2 para a análise morfométrica). Grupo 1 EC1 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* I; grupo 2 *Chaetonotus polyspinosus* do Brasil; grupo 3 EC2 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* II; grupo 4 EC3; grupo 5 *Chaetonotus ventrochaetus*; grupo 6 EC4 e *Chaetonotus* aff. *polyspinosus* III; grupo 7 *Chaetonotus polyspinosus* da Europa; grupo 8 *Chaetonotus pseudopolyspinosus*; grupo 9 *Chaetonotus breviacanthus*. **Localidades:** **a** São Carlos; **b** Paulínia; **c** Campinas; **d** Reserva da Juréia; **e** Diamantina; **f** Pará; **g** Mato Grosso do Sul; **h** Mucugê; **i** Polônia; **j** Suécia.

5. DISCUSSÃO

Cosmopolitismo é um conceito atribuído a espécies que são distribuídas por todo o mundo (Spellerberg & Sawyer, 1999), fenômeno reconhecido nos principais táxons meiofaunais (Leasi & Todaro, 2009). Apesar do frequente relato, o grande número de espécies com “distribuição mundial”, foi questionado entre os organismos meiofaunais, devido a características do ciclo de vida desses metazoários, que são pequenos, com movimentação limitada, ciclo de vida curto e sem estágio larval, sugerindo ter uma distribuição geográfica restrita, esse fenômeno ficou conhecido como o “paradoxo da meiofauna” (Todaro *et al.*, 1996; Giere, 2009).

Porém, a questão central sobre essa “ampla distribuição” diz respeito à identificação das espécies. Desde o início do século XIX, os grupos de pequenos invertebrados foram reconhecidos através de dados morfológicos, no entanto, críticos questionam a confiabilidade das identificações de espécies relatadas em áreas geograficamente distantes, ainda mais quando realizada por diferentes pesquisadores usando técnicas diferentes, geralmente microscopia de baixa qualidade óptica (Todaro *et al.*, 1996). Atualmente, alguns estudos relatam a possibilidade do agrupamento de espécies morfológicamente similares, mas evolutivamente distintas, em morfoespécies únicas e artificialmente cosmopolitas (Klautau *et al.*, 1999). Um estudo com *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 demonstra que a distribuição da espécie pelo globo é uma consequência da tradição taxonômica que causava agrupamentos e, na verdade, a espécie representa complexos de espécies morfológicamente semelhantes, mas distinguíveis (Kawauchi & Giribet, 2013).

Sob outra perspectiva, o estudo de Amato e Weiss (1982) relatou que em *Lepidodermella squamata* (Dujardin, 1841), a cutícula de revestimento forma padrões que variam entre os clones, o que pode ser explicado pela flexibilidade do desenvolvimento da cutícula. Ainda, apresentam uma ampla distribuição, pesquisas usando técnicas altamente reprodutíveis (por exemplo, microscopia de vídeo de alta resolução) confirmaram que o cosmopolitismo parece ser um fenômeno difundido entre certos grupos meiofaunais (Hummon, 1994; Todaro *et al.*, 1995), indicando que são representantes do mesmo táxon, porém com plasticidade fenotípica.

No caso do filo Gastrotricha, as primeiras descrições de espécies de água doce iniciaram-se nos séculos XVIII-XIX (Balsamo *et al.*, 2008) e parte dessas descrições

carecem de informações que hoje são essenciais para um diagnóstico confiável de delimitação de espécies (Kieneke & Nikoukar, 2017). A taxonomia de Gastrotricha ainda se baseia principalmente em características da morfologia externa, como a forma e o tamanho das regiões corporais e das ornamentações da cutícula externa (escamas, espinhos, tubos adesivos etc.). Essas características parecem frequentemente variáveis em nível específico e, em alguns casos, também em nível genérico, tornando uma identificação taxonômica segura muito difícil (Balsamo *et al.*, 2009). Embora a variação morfológica intraespecífica em Gastrotricha seja grande, parte da morfologia, bem como os dados morfométricos de diferentes táxons, pode ser explicado por erros de identificação que obscureceu os limites das espécies (Kånneby & Todaro, 2012).

Algumas dificuldades taxonômicas dizem respeito a questões ainda atuais, como a ausência da prática de se fixar os gastrótricos examinados, outras, remontam aos séculos passados, como: o uso de equipamentos ópticos rudimentares utilizados nas primeiras descrições; ao baixo conhecimento da gastrotricrofauna da época; e as descrições sucintas e desenhos simplificados. Esses fatores geram um problema taxonômico, pois hoje nos deparamos com dificuldades em distinguir espécies, pela ausência ou insuficiência de relatos das variações morfológicas em suas respectivas descrições (Garraffoni & Melchior, 2015; Kieneke & Nikoukar, 2017).

Kånneby e Todaro (2012) revelaram casos de espécies crípticas, duas ou mais espécies distintas que foram classificadas como uma única espécie devido à sua similaridade morfológica (Pfenninger & Schwenk, 2007), em representantes dulcícolas da Suécia, através de uma filogenia molecular com genes ribossomais (18S e 28S) e mitocondriais (COI). Sugerindo que o crescente relato de espécies crípticas pode mostrar que o “paradoxo da meiofauna” é apenas uma consequência de uma compreensão incompleta da diversidade dos organismos do meiobentos (Kieneke *et al.*, 2012).

No cenário atual, o emprego de técnicas avançadas permite maior detalhamento da morfologia, promovendo um aumento da familiaridade biológica que pode mostrar que o que antes era considerado uma única espécie é, na verdade, várias espécies morfológicamente semelhantes (Winston, 1999). Os esforços combinados dos métodos tradicionais e moleculares provavelmente revelarão que existe uma uniformidade muito menor no nível de espécie ou gênero de organismos do meiobentos

que se supõe até agora, e assim, resolverá parcialmente o paradoxo da meiofauna em relação às amplas distribuições de muitas “espécies” (Giere, 2009).

Como exemplo, a espécie *Chaetonotus polyspinosus*, reportada no Brasil por Kisielowski (1991), foi associada a outras três formas semelhantes, descritas pelo gastrotricológico (ver introdução para descrição da morfologia).

No presente trabalho, observamos que os cinco morfotipos encontrados, dos quais quatro tratam-se das espécies candidatas, embora se assemelhem em nível morfológico, diferenças anatômicas foram detectadas a partir de análises detalhadas provenientes de técnicas como microscópio equipado com DIC e MEV, além da análise morfométrica, LDA.

Espécimes de *Chaetonotus polyspinosus* foram reportadas para a América do Norte (Canadá), América do Sul (Brasil), Europa (França, Grã-Bretanha, Itália, Polônia, Romênia, Rússia, Suíça) e Ásia (Israel e Coreia) (Grilli *et al.*, 2010) e diversos estudos taxonômicos sobre a espécie citam a alta variabilidade do táxon (Remane, 1927; Roszcak, 1968; Kisielowski, 1980; Schwank, 1990; Kolicka *et al.*, 2013), porém, a minoria apresenta detalhes morfológicos obtidos por microscópio equipado com DIC e MEV. Fazendo-se necessário a revisão de *Chaetonotus polyspinosus*, com o auxílio dessas técnicas, para o aumento da familiaridade biológica da espécie e para diagnosticar a presença ou não de criptismo, sob a perspectiva molecular, entre a forma tipo do Brasil e da Europa ou a existência de um complexo de espécie, contendo pelo menos duas espécies diferentes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o uso de uma abordagem múltipla baseada na conjunção da morfologia e morfometria dos espécimes de *Chaetnotus polyspinosus*, demonstrou a existência de uma variação morfológica maior do que as descritas anteriormente na literatura, representando um importante passo rumo ao futuro da taxonomia, que tende a incorporar cada vez mais técnicas complementares para um minucioso estudo da biodiversidade e melhor delimitação das unidades evolutivas (Dayrat, 2005).

Com as informações obtidas foi possível estabelecer seis morfotipos, com quatro espécies candidatas, de acordo com a análise morfológica, mas ainda é necessário a perspectiva molecular para afirmarmos que se tratam de unidades evolutivas diferentes. Portanto, adiante, o propósito é utilizar os dados deste trabalho para complementar estudos moleculares e a partir da incorporação dessa ferramenta ter maior suporte em confirmar a validade dos grupos brasileiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalão, R. S; Roberg, R. A. P. (1999). Complexo *Littorina ziczac* (Gmelin) (Mollusca, Gastropoda, Caenogastropoda) no litoral fluminense: análise morfométrica, distribuição vertical e bioquímica. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (2): 381-395.
- Amato, A. J. & Weiss, M. J. (1982). Developmental flexibility in the cuticular pattern of a cell-constant organism, *Lepidodermella squammata* (Gastrotricha). *Transactions of the American Microscopical Society*, 101: 229–240.
- Balsamo, M. & Todaro, M. A. (2002). Gastrotricha. In: *Freshwater meiofauna: Biology and ecology*. Rundle, S. D., Robertson, A. & Schmidt-Araya, J. (eds). Backhuys Publishers, p. 45–61.
- Balsamo, M; d'Hondt J. L; Kisielewski, J. & Pierboni, L. (2008). Global diversity of gastrotrichs (Gastrotricha) in fresh waters. *Hydrobiologia*, 595: 85–91.
- Balsamo, M; d'Hondt, J. L; Pierboni, L. & Grilli, P. (2009). Taxonomic and nomenclatural notes on freshwater Gastrotricha. *Zootaxa*, 2158: 1-19.
- Balsamo, M; Grilli, P; Guidi, L. & d'Hondt, J.L. (2014). *Gastrotricha - Biology, ecology and systematics. Families Dasydytidae, Dichaeturidae, Neogosseidae, Proichthyidiidae. Identification guides to the plankton and benthos of inland waters*. Weikersheim: Backhuys Publishers.
- D'Hondt, J.L. (1967). Effets de quelques anesthésiques sur les Gastrotriches. *Spezialia*. p. 1025-1026.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85:407-415.
- De queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species, *PNAS*, v., 102, pg. 6600 – 6607.
- Dytham, C. (2011). *Choosing and using statistics: a biologist's guide*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 298 pp.
- Forneris, L. (1985). *Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas*. Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo, p.1-16.

Garraffoni, A.R.S; Araújo, T.Q; Lourenco, A.P. & Balsamo, M. (2010). New data on freshwater psammic Gastrotricha from Brazil. *Zookeys*, 60: 1-12.

Garraffoni, A.R.S. & Melchior, M.P. (2015). New species and new records of freshwater Heterolepidoderma (Gastrotricha: Chaetonotidae) from Brazil with an identification key to the genus. *Zootaxa*, 4057: 551–568.

Garraffoni, A.R.S; Araújo, T.Q; Lourenco, A.P; Guidi, L. & Balsamo, M. (2017). A new genus and new species of freshwater Chaetonotidae (Gastrotricha: Chaetonotida) from Brazil with phylogenetic position inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Systematics And Biodiversity*, 15: 49-62.

Garraffoni, A.R.S; Araújo, T.Q; Lourenco, A.P; Guidi, L. & Balsamo, M. (2019)a. Integrative taxonomy of a new Redudasys species (Gastrotricha: Macrodasysida) sheds light on the invasion of fresh water habitats by macrodasysids. *Scientific Reports*, 9: 2067.

Garraffoni, A. R. S; Kieneke, A; Kolicka, M; Corgosinho, P. H. C; Prado, J; Nihei, S. S. & Freitas, A. V. L. (2019)b ICZN Declaration 45: a remedy for the nomenclatural and typification dilemma regarding soft-bodied meiofaunal organisms? *Marine Biodiversity*, 49, 2199-2207.

Giere, O. (2009). *Meiobenthology: The microscopic motile fauna of aquatic sediments*. 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Greuter, A. (1917). Beitrage zur Systematik der Gastrotrichen in der Schweiz. *Rev. Suisse Zool*. 25: 35-76.

Grilli, P; Kristensen, M. & Balsamo, M. (2010) Contribution to the knowledge of freshwater Gastrotricha from Denmark. *Steenstrupia*, 32 (1): 79–92.

Higgins, R.P. & Thiel, H. (1988). *Introduction to the Study of Meiofauna*. Smithsonian Institution Press London. 488p.

Hochberg, R. & Litvaitis, M. K. (2000). Hexamethyldisilazane for scanning electron microscopy of Gastrotricha. *Biotechnic & Histochemistry*, 75, p. 41–44.

Hochberg, R. & Litvaitis, M. K. (2000)a. Phylogeny of Gastrotricha: a morphology-based framework of Gastrotrich relationships. *Biological Bulletin*, 198: 299–305.

Hochberg, R. & Litvaitis, M. K. (2000)b. Hexamethyldisilazane for Scanning Electron Microscopy of Gastrotricha. *Biotechnic and Histochemistry*, 75: 41-44.

Hummon, W.D; Balsamo, M, & Todaro, M.A. (1992). Italian marine Gastrotricha: I. Six new and one redescribed species of Chaetonotida. *Bollettino di Zoologia*, 59: 499- 516.

Hummon, W. D. (1994). Trans and Cis-Atlantic distribution of three marine heterotardigrades. *Trans Am Microsc Soc* 113:333–342. doi:10.2307/3226627.

Kånneby, T. (2011). New species and new records of freshwater Chaetonotida (Gastrotricha) from Sweden. *Zootaxa*. 3115: 29–55.

Kånneby, T. & Todaro, M.A. (2012). A phylogenetic approach to species delimitation in freshwater Gastrotricha from Sweden. *Hydrobiologia*. 683:185–202.

Kånneby, T. (2013). New species and new records of freshwater Chaetonotida (Gastrotricha) from Sweden. *Zootaxa* 3115: 29–55.

Kånneby T; Todaro M.A. & Jondelius U. (2013). Phylogeny of Chaetonotidae and other Pau-citubulatina (Gastrotricha: Chaetonotida) and colonization of aquatic ecosystems. *Zoologica Scripta*, 42, 88-105. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2012.00558.x>

Kånneby, T. & Todaro, M. A. (2015). The phylogenetic position of Neogosseidae (Gastrotricha: Chaetonotida) and the origin of planktonic Gastrotricha. *Springer. Organisms Diversity & Evolution*, p.1-11.doi 10.1007/s13127-015-0223-9.

Kawauchi, G. Y. & Giribet, G. (2013). *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 (Sipuncula): cosmopolitan or a group of pseudo-cryptic species? An integrated molecular and morphological approach. *Marine Ecology, Cambridge*, p. 478–491.

Kieneke, A; Riemann, O. & Ahlrichs, W.H. (2008). Novel implications for the basal internal relationships of Gastrotricha revealed by an analysis of morphological characters. *Zoologica Scripta*, 37: 429-460.

Kieneke, A; Arbizu, P. M. M. & Fontaneto, D. (2012). Spatially structured populations with a low level of cryptic diversity in European marine Gastrotricha. *Molecular Ecology*, 21(5), 1239-1254.

- Kieneke, A. & Nikoukar, H. (2017). Integrative morphological and molecular investigation of *Turbanella hyalina* Schultze, 1853 (Gastrotricha: Macrotrichida), including a redescription of the species. *Zoologischer Anzeiger*, 267: 168–186.
- Kisielewski, J. (1980). Gastrotricha from raised and transitional peat bogs in Poland. *Monogr. Fauny Pol.* 11.
- Kisielewski, J. (1991). Inland-water Gastrotricha from Brazil. *Annales Zoologici*, 43, p. 1-168.
- Klautau, M; Russo, C. A. M; Lazoski, C; Esnault, N. B; Thorpe, J. P. & Cava, A. M. S. (1999). Does Cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution*, v. 53, p.1414-1422.
- Kolicka, M; Kisielewski, J; Nesteruk, T. & Zawierucha, K. (2013). Gastrotricha from the Poznan Palm House one new subgenus and three new species of freshwater Chaetonotida (Gastrotricha). *Zootaxa*, 3717: 231-279.
- Kolicka, M; Dabert, M; Dabert, J; Kånneby, T. & Kisielewski, J. (2016). *Bifidochaetus*, a new Arctic genus of freshwater Chaetonotida (Gastrotricha) from Spitsbergen revealed by an integrative taxonomic approach. *Invertebrate Systematics*, 30, 398–419.
- Kolicka, M. (2017). New Arctic Gastrotricha—Three Chaetonotus (Chaetonotidae) from Longyearbyen (Spitsbergen, Svalbard Archipelago). In *Annales Zoologici* (Vol. 67, No. 1, pp. 131-180). Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences.
- Leasi F. & Todaro M.A. (2009). Meiofaunal cryptic species revealed by confocal microscopy: the case of *Xenotrichula intermedia* (Gastrotricha). *Marine Biology*.
- Mayr, E. (1982). *The Growth of Biological Thought Diversity, Evolution and Inheritance*, Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press.
- Mayr, E. (2005). *Biologia, ciência única: reflexões sobre a autonomia de uma disciplina científica*. São Paulo. Companhia das letras. 266p.
- Pfenninger, M. & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*. 7:121 doi:10.1186/1471-2148-7-121.

- Platnick, N.I. (1979) Filosofia e transformação de cladística. *Systematic Zoology*, 28, p. 537-546.
- Rao, G. C. & Clausen, C. (1970). *Planodasys marginalis* gen. et. sp. nov. and *Planodasyidae* fam. nov. (Gastrotricha Macrodasyoidea). *Sarsia*, 42, p. 73-82.
- Remane, A. (1925). Organisation und systematische Stellung der aberranten Gastrotrichen. *Verhandlungen der Deutsche Zoologischer Gesellschaft*, 30, p. 121-128.
- Remane, A. (1927). Beitrage zur Systematik der Susswassergastrotrichen. *Zool. Jahrb. (Syst. Oekol. Geogr. Tiere)* 53: 269-320.
- Ruppert, E.E. (1991). Gastrotricha. In Harrison, F. W. and Ruppert, E. E. (Eds): *Microscopic Anatomy of Invertebrates Aschelminthes*, vol. 4, p. 41-109. Wiley-Liss, New York.
- Schwank, P. (1990). Gastrotricha. In: Schwoerbel, J. & Zwick, P. (Eds.), *Süsswasserfauna von Mitteleuropa, Band 3. Gastrotricha und Nemertini*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, p. 1-252.
- Sites, J. W. Jr. & Marshall, J. C. (2003). Operational criteria for delimiting species. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 35: 199- 227.
- Sokal, R. R., & Sneath, P. H. A. (1963). *Principles of numerical taxonomy* San Francisco. WH Friedman and Company, 359.
- Souza, H. L. (2007). Darwin e Kardec, um diálogo possível. 2.ed, p.1-235.
- Spellerberg I. F. & Sawyer, J. W. D. (1999). *An Introduction to Applied Biogeography*. Cambridge University Press, Cambridge:260.
- Todaro, M. A; Fleeger, J. W.& Hummon, W. D. (1995). Marine gastrotrichs from the sand beaches of the northern Gulf of Mexico: species list and distribution. *Hydrobiologia*, P. 107-117.
- Todaro, M. A; Fleeger, J. W; Hu, Y. P; Hrinkevich, A. W. & Foltz, D. W. (1996). Are meiofaunal species cosmopolitan? Morphological and molecular analysis of *Xenotrichula intermedia* (Gastrotricha: Chaetonotida). *Marine Biology*, 125(4), 735-742.

Todaro, M. A; Telford, M. J; Lockyer, A. E. & Littlewood, D. T. J. (2006). Interrelationships of the Gastrotricha and their place among the Metazoa inferred from 18S rRNA genes. *Zoologica Scripta*, 35(3), 251-259.

Todaro, M.A. (2020). In: Todaro, M.A. (Ed.), Freshwater. In *Gastrotricha World Portal*. [available on internet at <http://www.gastrotricha.unimore.it/freshwater.htm>]. Accessed 03/Mai/2020.

Weiss, M. J. & Levy D.P. (1979). Sperm in Parthenogenetic freshwater gastrotrichs. *Science*.205: 302-303.

Weiss, M. (2001). Widespread hermaphroditism in freshwater gastrotrichs. *Invertebrate Biology*, 120: 308–431.

Wheeler, Q.D. (2007). Invertebrate systematics or spineless taxonomy. *Zootaxa*, 1668: 11-18.

Winston, J. E. (1999). *Describing species: practical taxonomic procedures for biologists*. New York, Columbia University Press. 518p.

8.ANEXOS

8.1. Anexo 1 - Declaração de Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 Universidade Estadual de Campinas
 Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
 Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética, Biossegurança e acesso ao Patrimônio Genético, declaro que o conteúdo de minha , intitulada “**Morfologia integrativa e revisão taxonômica de populações brasileiras de *Chaetonotus polyspinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: _____

Nome do (a) aluno (a): Patrícia Pereira de Andrade

Assinatura: _____

Nome do (a) orientador (a): André Rinaldo Senna Garraffoni

Data: 01/05/2019

8.2. Anexo 2 - Declaração de Direitos Autorais

DECLARAÇÃO

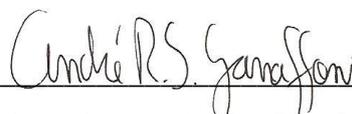
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que contam na minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Morfologia integrativa e revisão taxonômica de populações brasileiras de *Chaetonotus polypinosus* Greuter, 1917 (Gastrotricha: Chaetonotida: Chaetonotidae)**, não infringem os dispositivos da Lei nº. 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de novembro de 2020

Assinatura:  _____

Nome do (a) autor (a): **Patrícia Pereira de Andrade**

RG nº. 41.988.242-X

Assinatura:  _____

Nome do (a) orientador (a): **André Rinaldo Senna Garraffoni**

RG nº. 24.707.631-4

Material suplementar 1. Características morfológicas de *Chaetonothus polyspinosus* do Brasil, das espécies candidatas (EC1, EC2, EC3 e EC4) e de *Chaetonothus ventrochaetus*.

Características	Ch.poly	EC1	EC2	EC3	EC4	Ch.ventro
<i>Número de lóbulos</i>	Pentalobado	Pentalobado	Pentalobado	Pentalobado	Pentalobado (contorno trilobado)	Pentalobado
<i>Construção do pescoço</i>	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Região anterior da escama dorsal (tronco)</i>	Ângulo de abertura “aberto”: lóbulo arredondado	Ângulo de abertura “fechado”: clara constricção no lóbulo anterior	Ângulo de abertura “aberto”; arredondada e com contorno suave	Ângulo de abertura “fechado”, com 5 pontos formando seu contorno	Ângulo de abertura “aberto”; arredondada	Ângulo de abertura “aberto”; constricção evidente na região central da escama
<i>Região posterior da escama dorsal (tronco)</i>	Fortemente côncava	Fortemente côncava	Fortemente côncava	Sutilmente côncava	Fortemente côncava	Fortemente côncava
<i>Escama interciliar (campo intestinal)</i>	Forma semelhante as escamas dorsais; borda da escama finaliza junto ao espinho	Estreita, forma difere das escamas dorsais	Estreita, forma difere das escamas dorsais	Estreita, forma difere das escamas dorsais	Estreita; forma semelhante as escamas dorsais	Escamas quilhadas que aumentam gradualmente ao longo do corpo; difere muito das escamas dorsais
<i>Espinho da escama dorsal (tronco)</i>	Forma uma quilha que ultrapassa o limite da escama; longo	Curto	Forma uma quilha; Curto	Forma uma quilha; Curto	Longo	Forma uma quilha; bem longo
<i>Espinho da escama interciliar (campo intestinal)</i>	Não ultrapassa o limite da escama	Longo	Longo	Longo	Longo	Curto, torna-se mais longo conforme a escama aumenta
<i>Tipo de escama</i>	Trilobada	Trilobada	Trilobada	Pentalobada	Trilobada	Trilobada

<i>Escamas dorsais (sobreposição)</i>	Sobrepõe a ponta da escama subsequente; há um espaço entre as escamas	Sobrepõe a região anterior da escama subsequente	Sobrepõe a ponta da escama subsequente; escamas encaixam-se como “telhas”	Sobrepõe a região central da escama subsequente	Sobrepõe a ponta da escama subsequente	Sobrepõe a região central da escama subsequente
<i>Espinhas terminais (tamanho)</i>	Espinhas longas	Espinhas longas	Espinhas curtas; não ultrapassam o limite da base da furca	Espinhas longas	Espinhas curtas; não ultrapassam o limite da base da furca	Espinhas longas
<i>Espinhas terminais do dorso (número)</i>	4 pares	3 pares	3 pares *2 pares de escamas quilhadas na visão interna	3 pares	Ausência de espinhas terminais que ultrapassam a base da furca	3 pares
<i>Espinhas terminais dorsolaterais (número)</i>	1 par	1 par	Ausência	Ausência	Ausência	1 par
<i>Conjunto de escamas e espinhas ventrais (número)</i>	Ausência de espinhas que ultrapassam a base da furca	3 pares de escamas com pequenos espinhas, ao lado do par de escamas terminais	Ausência *4 pares de escamas quilhadas sem espinhas, no ventre	*3 pares de pequenos espinhas no centro da furca (visão interna) *3 pares de pequenas escamas com espinhas, abaixo do par de quilhas do ventre	Conjunto de escamas quilhadas, sem espinhas a baixo do par de escamas terminais	2 pares
<i>Base da furca caudal (forma)</i>	Com sutil constrição	Com sutil constrição	Com evidente constrição	Com sutil constrição	Com evidente constrição	Com sutil constrição

Material suplementar 2. Morfometria de *Chaetonothus polyspinosus* do Brasil, das espécies candidatas (EC1, EC2, EC3 e EC4), *Chaetonothus ventrochaetus* brasileiros, e representantes da literatura.

Indivíduos	Local	Grupo	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	d23	d24	d25
Ind1 EC1	c	1	186	32	54	7	8	4	5	12	7	17	27	35	30	10	11	6	12	8	5	6	0	0	14	4	5
Ind3 EC1	a	1	189	27	57	8	9	4	5	8	6	14	22	15	30	0	10	6	13	5	5	6	0	8	15	0	0
Ind4 EC1	e	1	199	27	57	7	6	4	4	9	7	13	20	15	0	0	10	6	8	4	5	6	0	6	14	4	5
Ind5 EC1	c	1	233	35	60	6	7	4	5	12	10	13	24	15	27	0	10	6	12	8	5	6	0	8	15	0	0
Ind7 EC1	c	1	215	30	51	6	7	4	5	11	7	18	29	15	0	0	10	6	9	5	5	6	0	8	0	0	0
Ind9 EC1	a	1	187	27	52	7	8	4	5	12	8	14	20	23	30	10	10	6	12	8	5	6	0	10	14	4	5
Forma I Kiw91	f	1	206	27	59	7	5	0	0	0	9	15	23	39	27	10	10	0	9	0	0	0	0	8	15	6	0
Ind1 C poly	c	2	219	35	57	7	10	5	7	14	7	18	28	23	25	10	11	7	13	7	6	7	0	15	15	4	6
Ind2 C poly	b	2	335	44	86	7	8	5	6	22	16	20	34	28	38	0	17	10	19	6	0	0	0	15	12	5	6
Ind3 C poly	b	2	280	39	80	7	9	5	7	16	12	17	27	24	0	12	12	7	13	0	0	0	0	13	10	5	6
Ind4 C poly	b	2	288	42	88	8	10	5	6	20	15	21	0	29	40	0	15	9	17	0	0	0	0	16	13	6	6
Ind5 C poly	a	2	346	46	93	7	9	5	6	19	19	20	34	43	0	12	0	0	0	9	0	0	0	16	12	5	6
Forma Tipo Kiw91	a	2	341	40	92	7	10	4	6	0	14	22	31	45	38	12	16	0	19	0	0	0	0	15	15	7	0
Ind1 EC2	e	3	230	40	60	5	6	4	5	7	9	20	31	48	0	14	14	7	10	6	6	6	0	0	10	0	0
Ind2 EC2	e	3	251	39	67	4	5	3	4	6	9	20	30	52	38	14	14	7	11	4	6	6	0	9	12	0	0
Ind4 EC2	a	3	210	29	52	4	5	3	4	6	8	17	27	33	0	0	10	7	9	0	5	5	0	8	11	0	0
Ind5 EC2	a	3	253	37	72	5	6	4	5	7	10	20	32	42	42	14	14	9	11	8	7	7	0	0	11	4	5
Forma II Kiw91	a	3	241	27	55	4	6	0	0	0	9	0	27	63	33	14	10	0	7	0	0	0	0	10	10	0	0
Ind4 EC3	a	4	193	30	67	4	5	3	4	10	9	17	25	32	0	10	9	4	10	0	6	7	6	7	9	4	4
Ind5 EC3	a	4	218	25	64	4	6	3	4	12	8	18	26	32	38	12	10	5	11	6	5	6	6	8	9	4	5
Ind6 EC3	a	4	187	24	67	4	6	3	5	15	8	16	23	14	0	12	12	6	12	0	5	7	6	12	14	4	5
Ind7 EC3	a	4	202	27	74	4	6	3	5	12	12	0	0	24	0	12	0	0	0	6	0	0	0	14	14	4	5
Ind8 EC3	a	4	189	28	73	4	6	3	5	14	10	17	27	34	0	12	10	6	11	7	5	6	0	12	12	4	5

Ind9 EC3	a	4	0	0	0	4	6	4	5	10	0	0	0	20	0	12	11	6	12	0	4	5	0	0	0	5	5	
Ind1 C ventro	b	5	262	46	81	8	10	6	8	18	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
Ind2 C ventro	b	5	311	48	81	7	9	5	7	17	15	19	29	14	0	8	0	0	0	10	0	0	0	11	13	5	6	
Ind3 C ventro	b	5	267	45	80	8	9	4	6	23	13	0	0	0	0	14	7	17	10	0	0	0	0	10	0	0		
C ventro1 Kiw91	d	5	151	31	49	0	4	0	4	0	6	0	15	37	38	8	11	5	14	0	0	0	0	8	10	0	0	
C ventro2 Kiw91	d	5	186	31	56	0	8	0	6	0	8	0	21	37	42	8	11	5	14	0	0	0	0	8	10	0	0	
Ind1 EC4	h	6	256	34	77	4	7	3	4	4	14	24	35	56	0	18	14	9	11	4	5	5	0	5	14	5	5	
Ind2 EC4	h	6	289	42	79	4	6	3	5	6	13	21	31	35	42	18	12	9	10	6	4	4	0	9	14	0	0	
Ind3 EC4	h	6	261	40	79	4	6	3	4	6	12	24	38	56	42	18	0	0	11	5	0	0	0	9	15	0	0	
Forma III Ind1 Kiw91	a	6	294	41	73	4	8	0	0	0	17	0	33	47	39	13	12	0	9	0	0	0	0	9	18	0	0	
Forma III Ind2 Kiw91	a	6	346	41	82	5	8	0	0	0	21	0	38	47	39	15	16	0	9	0	0	0	0	9	18	0	0	
C poly1 europeu Ki1980	i	7	194	42	55	4	6	3	4	0	7	0	0	38	47	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C poly2 europeu Ki1980	i	7	296	71	87	7	12	4	8	0	19	0	0	33	47	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C poly1 europeu Ka2013	j	7	183	25	57	2	2	1	1	0	10	0	0	25	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C poly2 europeu Ka2013	j	7	197	27	60	2	4	2	2	0	10	0	0	28	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C pseudopoly1 Kiw91	a	8	229	28	70	7	11	7	7	0	17	21	28	43	28	11	11	5	14	0	0	0	0	9	9	5	5	
C pseudopoly2 Kiw91	a	8	257	28	70	11	11	7	7	0	17	21	28	61	28	11	15	5	14	0	0	0	0	9	9	7	5	
C brevicanthus1 Kiw91	a	9	154	17	45	7	8	4	6	7	9	15	19	31	21	8	9	0	7	0	0	0	0	4	9	4	5	
C brevicanthus2 Kiw91	a	9	166	17	50	8	8	7	6	7	10	20	20	35	25	9	10	0	7	0	0	0	0	4	9	5	5	