

Maximiliano Manuel Maronna

Análise filogenética de Leptothecata  
(Hydrozoa; Hydroidolina) e evolução da  
metagênese

Phylogenetic Analysis of Leptothecata  
(Hydrozoa; Hydroidolina) and evolution of  
metagenesis

São Paulo

2014

Maximiliano Manuel Maronna

Análise filogenética de Leptothecata  
(Hydrozoa; Hydroidolina) e evolução da  
metagênese

Phylogenetic Analysis of Leptothecata  
(Hydrozoa; Hydroidolina) and evolution of  
metagenesis

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de  
São Paulo, para a obtenção de  
Título de Doutor em Ciências, na  
Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio  
Carlos Marques

São Paulo

2014

# Ficha Catalográfica

---

Maronna, Maximiliano Manuel  
Análise filogenética de  
Leptothecata (Hydrozoa; Hydroidolina)  
e evolução da metagênese  
195pp.

Tese (Doutorado) -  
Instituto de Biociências da Universidade  
de São Paulo. Departamento de  
Genética e  
Biologia Evolutiva.

1. Leptothecata 2.  
Sistemática Filogenética 3.  
Metagênese I. Universidade de São  
Paulo. Instituto de Biociências.  
Departamento de Genética e Biologia  
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a)

---

Prof. Dr. Antonio Carlos Marques  
Orientador

## Dedicatória

---

Aos meus pais, Vilma e José Luis (*in  
memoriam*), sem os quais nada seria  
possível

## Epígrafe

---

¡Piu Avanti!

No te des por vencido, ni aun vencido,  
no te sientas esclavo, ni aun esclavo;  
trémulo de pavor, piénsate bravo,  
y arremete feroz, ya mal herido.

Ten el tesón del clavo enmohecido  
que ya viejo y ruin, vuelve a ser clavo;  
no la cobarde intrepidez del pavo  
que amaina su plumaje al menor ruido.

Procede como Dios que nunca llora;  
o como Lucifer, que nunca reza;  
o como el roble, cuya grandeza  
necesita del agua y no la implora...

Que muerda y vocifere vengadora,  
ya rodando en el polvo, tu cabeza!

Almafuerte

# Agradecimentos

---

Ao meu orientador Tim Marques pela orientação, propostas e ideias de sempre, além de superar os obstáculos.

À FAPESP pela bolsa de doutorado direto e reserva técnica concedida (Proc. 2006/56211-6).

À Instituição Santander Banespa pelo bolsa concedida pelo Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional.

Aos meus pais VILMA e JOSÉ LUIS (*in memoriam*), pelo seu respeito e paciência; aos meus irmãos LISANDRO, PABLO e NICOLAS por todas as situações vividas com meus pais em todos estos anos. Também para as alegrias de todos os dias nas nossas vidas: Sandro, Dante e Valentino!

À JULIANA, por todo su carinho e ENORME PACIÊNCIA, não só comigo mas também com a própria tese. Também sou MUITO agradecido com meus irmãos da vida Mauro, Rivi, Janice e Marcus, Mateus, Vero, Pati, Lula, Will, Judney, Thiago, Luciano, Carla, Inés, Tamara, Tania, Aline, Rodrigo, Marcela, Manel, Perro, la Hormiga, Paco..... tanta gente maravilhosa que conheci ao longo dos anos na cidade de São Paulo e Valência! Estou esquecendo de quase todos!

A todo o grupo do lab de Medusozoa (Vanessa, Val, Otto, Mauricio, Ezequiel, Elaine, Nathalia, Maria, Lucilia, Amanda, Juliana, Camila, Mariana, Marina e toda a nova turma!). Especialmente sou muito agradecido por toda a dedicação de Thais P. Miranda para me ensinar sobre taxonomia dos Leptothecata! Também sou agradecido ao Dr. Álvaro Peña Cantero pela possibilidade de realizar minha experiência *offshore* no seu laboratório na Espanha, com os difíceis leptotecados antárticos! A Marcos Barbeitos por todas as opiniões para melhorar em todo o possível a tese; a Álvaro Migotto e Gabriel Genzano pelo acesso a tecidos, e um agradecimento especial para André Morandini e Sérgio Stampar, por tantas conversas e apoio. Também não quero me esquecer do pessoal do lab de biomol como Almir, Fernando, Pancho, Antoine, Felipe, Manuel e todo os demais membros e técnicos que formam o grupo Profissional do Departamento de Zoologia, onde de fato fiz as minhas principais experiências do meu doutorado. Também um reconhecimento pela amizade para toda a turma do Museu de Zoologia!

A todos meus queridos amigos da Argentina, que sempre me acompanham quando estou por lá, e também à distância. Dos amigos de "Genética" como Cris, Vero, Agus, Alonso, PP, Huguito, Flavia, Ale, Dardo, Elio, Cabeza, Marito, Mecano, Andre & Martín, Deni, Juli, Fer, Elisa, Nuri, Paola e tantos mais que estou esquecendo neste momento....De Teodelina, bom, seria quase todo o povoado! Patito, Fede, Ignacio, Miancho, Nico, Meme, Emi, Ani, Anita, Flavia, Flor, Mauro, Nari, Andre, Romi, Aldo, Betina, Vero...no mínimo gracias! Aos meus alunos de espanhol fantásticos! Bárbara, Bianca, Lemão, Ale, Jonathan e Luana, gracias por todo el apoyo! A todos aquellos que se merecen un agradecimiento, pero no recuerdo sus nombres en este ¡brevísimo! instante.....y bue', ¡cosas que pasan!

# Índice

---

<b>CAPÍTULO 1 - Uma introdução geral à taxonomia dos Hydrozoa com ênfase em Leptothecata .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Uma análise crítica sobre dados, suportes e critério de validação analítica em filogenias de Hydroidolina .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Uma nova classificação taxonômica dos Leptothecata (Hydrozoa).....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Considerações finais e perspectivas futuras .....</b>	<b>181</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>187</b>
<b><i>Abstract</i>.....</b>	<b>188</b>

# CAPÍTULO 1

## Uma introdução geral à taxonomia dos Hydrozoa com ênfase em Leptothecata

---

### Histórico da taxonomia

A biologia tem alcançado um amadurecimento destacado nas últimas décadas. Na área marinha relacionada a invertebrados do bentos e pélagos, há um aprimoramento constante da taxonomia pelo acréscimo de informações morfológicas, ecológicas e genéticas (e.g., McQuaid 2010; Karsenti et al. 2011; Mock & Kirkham 2011). Como consequência, propostas históricas em sistemática têm sido apresentadas a partir da metade do século XX (Halanych 2004; Jenner 2004). Paralelamente, o desenvolvimento de teoria e métodos em sistemática aprimoram formas de identificar, avaliar, apresentar e discutir padrões filogenéticos, e inferir mecanismos e processos evolutivos que geram estes padrões ao longo do tempo (Wägele & Stefen 2005). Os novos padrões contrastam com hipóteses já estabelecidas, sejam aquelas sem aproximação analítica, ou mesmo aquelas que são analíticas e baseadas na sistemática filogenética (e.g., “cladística Hennigiana”; Kitching et al. 1998; Wheeler 2012).

Neste cenário, os Cnidaria e, em especial, os Hydrozoa, são um grupo que representa este processo histórico de transição (e.g., propostas de Naumov 1969; Bouillon 1985; Collins 2000). A maioria dos agrupamentos supragenéricos de Hydrozoa foram propostos durante o século XIX, assim como a maioria dos gêneros (Bouillon et al. 2006). Tradicionalmente, Hydrozoa englobava sete linhagens principais: Anthoathecata (“Anthomedusae, Athecatae”), Leptothecata (“Leptomedusae, Thecatae”), Siphonophorae, Narcomedusae, Trachymedusae, Laingiomedusae e Limnomedusae (Bouillon 1985). Há várias propostas de relacionamento entre os subgrupos de Hydrozoa, inclusive as que não consideram a classe como monofilética (histórico em Collins 2000). Em seu âmago, estas propostas são diferentes por divergências na ênfase e na interpretação da rica diversidade de biológicas e no desconhecimento dos ciclos de vida, questões intimamente associadas.



A questão de um sistema dual de classificação não é trivial. Neste sistema, há ênfase em uma ou outra fase do ciclo de vida, “pólipo” ou “medusa”, em especial devido ao desconhecimento de uma destas em diversos grupos (e.g., Rees 1957; Brinkmann-Voss 1970; Millard 1975). Evidentemente, esse desconhecimento dificulta estabelecer “propostas-consenso” de conexão filogenética entre as famílias dos diferentes grupos de hidrozoários (Cornelius 1995). A necessidade de sistemas taxonômicos baseados nos ciclos de vida como um todo é reconhecida há mais de meio século (Naumov 1960, 1969), mas eram poucas as tentativas neste sentido (e.g., Millard 1975; Petersen 1990).

O trabalho compilatório de Bouillon (1995) representa um marco na tentativa de resolver o sistema dual de taxonomia. Subsequentemente, propostas gerais de organização para os Hydrozoa foram apresentadas, algumas sem base analítica-científica e apenas baseadas na tradição do grupo (e.g., Hydroidomedusae; Bouillon et al. 1992; veja comentários em Marques 2001). O início de estudos moleculares para os Hydrozoa é marcado por testes de hipóteses taxonômicas anteriores e por propostas de novos padrões (Collins 2000), sendo simultaneamente impulsionado por abordagens morfológicas mais amplas e estritas (Marques 2001; Marques & Collins 2004). A maior parte do conhecimento atualmente aceito em filogenia e taxonomia de Medusozoa advém de estudos integrativos de morfologia e fósseis (Van Iten et al. 2006) e moleculares (Collins et al. 2006), inclusive superando dicotomias impostas por dados de naturezas diferentes, como morfológicos e moleculares. Subsequentemente, alguns trabalhos importantes refinaram a taxonomia em níveis menos inclusivos, organizando de forma mais adequada o conhecimento sobre os Hydrozoa e, inclusive, propondo novas linhagens (e.g., Leclère et al. 2007; Cartwright et al. 2008; Collins et al. 2008; Cartwright & Nawrocki 2010). Trabalhos focados em genômica mitocondrial (mitogenômica) e nuclear estão aportando interessantes informações sobre o padrão evolutivo dos genomas nos Medusozoa (e.g., Chapman et al. 2010; Kayal et al. 2011; Siebert et al. 2011), com propostas de mecanismos que teriam gerado o processo evolutivo (e.g., Smith et al. 2013); entretanto, na área de sistemática (filogenômica) são recentes e limitados a escala de grandes grupos (Kayal et al. 2013).

Um dos subgrupos de Hydrozoa, os Leptothecata (anteriormente denominados Leptomedusae ou Thecata, ver Cornelius 1995), passaram por

um desenvolvimento taxonômico semelhante ao observado na classe. Os Leptothecata formam o grupo mais rico dentre os Medusozoa, com cerca de 2.000 espécies descritas (Tabela 1). A sinapomorfia mais conspícua do grupo é uma estrutura de perissarco rígido e quitinoso ao redor dos zooides (hidroteca, gonoteca ou nematoteca) (Vervoort 1987; Marques 2001; Marques & Collins 2004). A taxonomia dos Leptothecata é debatida há mais de um século, dificultada pela indefinição de “critérios e regras” para sua classificação, por classificações duais baseadas em apenas parte do ciclo de vida (“pólipos” ou “medusas”), ou por enfatizar poucos caracteres morfológicos “selecionados” (e.g., Bouillon 1995; Figura 1). Mais recentemente, isso tem sido modificado por uma série de inferências filogenéticas nos Hydrozoa, incluindo grupos de leptotecados (Govindarajan et al. 2006; Marques et al. 2006; Leclère et al. 2007, 2009; Peña Cantero et al. 2010; Moura et al. 2011a, 2011b, 2012). Dentre estes, a inferência mais abrangente, focada em Leptothecata (Leclère et al. 2009), é incongruente com a hipótese tradicional de Bouillon (1995) em diversos pontos.

Tabela 1. Resumo dos principais grupos taxonômicos de Hydrozoa, seu número de famílias e espécies (segundo Daly et al. 2007), com destaque para Leptothecata (em negrito). O asterisco (\*) indica grupos não-monofiléticos *sensu stricto* nos estudos moleculares; [%] destaca a porcentagem aproximada de espécies em relação ao total de espécies em Hydrozoa (3.365).

SUBCLASSE	Ordem	Subordem	Famílias	Espécies [%]
HYDROIDOLINA			93	3.215 [95]
	Anthoathecata*		48	1.140 [34]
		Filifera*	22	765
		Capitata*	26	375
	<b>Leptothecata</b>		<b>33</b>	<b>1.920 [57]</b>
		<b>Conica*</b>	<b>30</b>	<b>1.770</b>
		<b>Proboscoida*</b>	<b>3</b>	<b>150</b>
	Siphonophorae		15	155 [4]
		Calycophorae	6	100
		Cystonectae	2	5
	Physonectae	7	50	
TRACHYLINA			15	150 [5]
	Actinulida		2	12
	Limnomedusae		4	47
	Narcomedusae		4	40
	Trachymedusae*		5	51
<b>TOTAL</b>			<b>111</b>	<b>3.365</b>

Os trabalhos filogenéticos listados incluem diferentes espécies e dados biológicos dos tecados, sendo uma porção reduzida das mesmas questões que envolvem os Hydrozoa como um todo (e.g., Bouillon et al. 1992 vs Collins 2000): “conflito” entre as propostas tradicionais baseadas em morfologia e aquelas resultantes de análises moleculares. E, novamente, os padrões moleculares, ainda que sem uma representação de todos os táxons, indicam novas relações e novos grupos entre as grandes linhagens de Leptothecata, além do eventual não-monofiletismo de alguns dos táxons aceitos na taxonomia clássica. À medida que novos dados e análises são aportados, nosso conhecimento filogenético geral sobre o grupo é aprimorado assim como, conseqüentemente, uma compreensão global sobre sua diversidade.

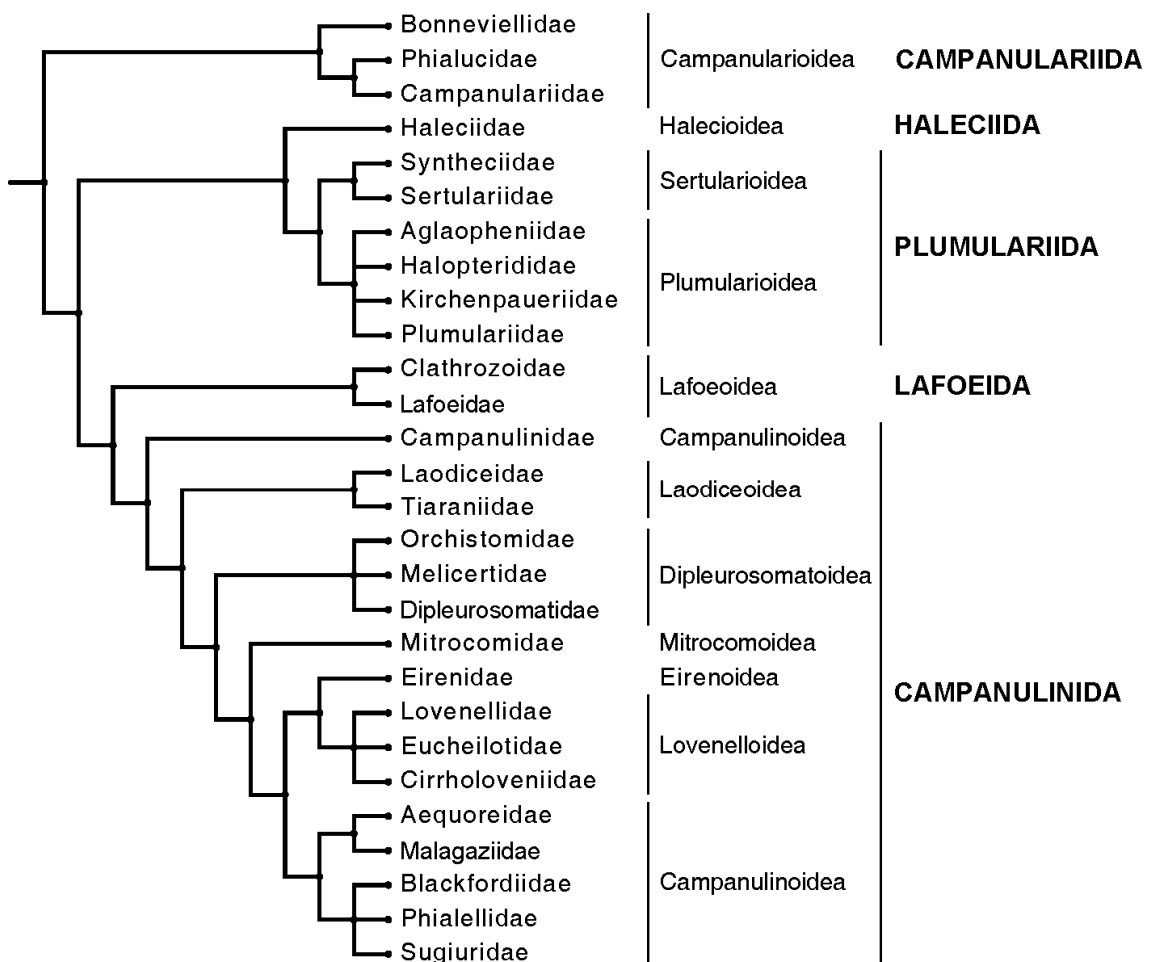


Figura 1. Relações filogenéticas dos Leptothecata propostas por Bouillon (1995).

Embora haja avanços na geração de novas informações, algumas relações entre os grandes grupos de Hydrozoa ainda não são conclusivas (e.g.,

Collins 2002; Marques & Collins 2004; Collins et al. 2006; Cartwright et al. 2008), o mesmo ocorrendo para os Leptothecata, especialmente devido aos diversos grupos ainda não amostrados.

### **Morfologia e ciclos de vida**

As características do ciclo de vida de Hydrozoa fazem com que sejam considerados, por alguns autores, como o táxon mais pedomórfico dentre os animais (Bouillon & Boero 2005), se é que comparar subjetivamente o grau de pedomorfismo entre linhagens tão desiguais faça sentido. Os Hydrozoa têm uma morfologia simples, com poucos tipos celulares e apenas dois epitélios simples, presumidamente sem atingir um nível organogênico de construção. Paradoxalmente, os hidrozoários apresentam ciclos de vida complexos (Figura 2). Há linhagens com redução ou perda da fase bentônica (e.g., Trachylina), com redução ou perda de fase pelágica (e.g., Eudendriidae), com re-expressão de uma fase análoga à polipoide (e.g., Narcomedusae), com perda da fase adulta reprodutiva de medusa acompanhada por um aumento da complexidade das colônias (e.g., Siphonophorae), com reproduções assexuadas diversas nas fases polipoide e/ou medusoide, etc. A relação destas variações na biologia com a evolução das diferentes linhagens permanece uma incógnita.

Uma discussão recorrente aborda a repetida supressão da fase de medusa observada em linhagens de Hydrozoa (cf. Cartwright & Nawrocki 2010), em leptotecados (cf. Campanulariidae, Govindarajan et al. 2006; Plumularioidea, Leclère et al. 2007; Leptothecata como um todo, Leclère et al. 2009) e antoatecados (e.g., Tubulariidae, Petersen 1990, Marques & Migotto 2001; Hydractiniidae, Cunningham & Buss 1993; Miglietta & Cunningham 2012). Evidentemente, estes eventos de redução/perda da fase de medusa devem ter uma base em biologia evolutiva do desenvolvimento e, em última instância, na evolução do grupo, mesmo que em sejam expressões convergentes entre as linhagens. Entretanto, devido às dificuldades de compreensão sobre estes eventos, alguns autores alertam para seu uso na taxonomia de Hydrozoa (Bouillon & Boero 2000), conservadoramente ignorando sua importância para a definição de grupos menos inclusivos.

Abordagens filogenéticas mais recentes exploraram as tendências evolutivas de redução/perda de medusas sobre suas topologias (e.g., Leclère

et al. 2009). Elas indicam que, em vários casos, não há de fato um estabelecimento simples de homologias, havendo necessidade de postularem-se convergências ou reversões (Miglietta & Cunningham 2012; Nawrocki & Cartwright 2012). Não se pode descartar que, talvez, a falta de definição de relações filogenéticas mais estabelecidas entre as principais linhagens de Hydrozoa esteja limitando a possibilidade de reconstrução de estados ancestrais sem ambiguidades, comprometendo discussões do padrão geral na evolução fenotípica e da biologia do grupo.

A discussão sobre a presença da fase de medusa no ciclo de vida dos Leptothecata é mais interessante por suas consequências evolutivas que por sua eventual aplicação taxonômica. O grupo apresenta alta frequência em que a fase pelágica adulta (i.e., medusa) está reduzida e retida junto ao pólip. Estas fases são diferenciadas funcional e morfológicamente como **medusa** (fase livre-nadante reprodutiva e totalmente desenvolvida), **medusoide** (estágio que pode ou não ser liberado, com vida curta e geralmente sem boca, tentáculos e canais radiais) e **gonóforo fixo** (módulos reduzidos e ligados ao pólip, que contêm os tecidos germinativos) (Bouillon 1995; Cornelius 1995). Morfológicamente, esta classificação foi putativamente expressa em diferentes estágios de redução (Kühn 1913) que, entretanto, nem sempre são claras em alguns grupos. Algumas outras interpretações alternativas na literatura estão, em última instância, incluídas nesta classificação (e.g., Boero & Sarà 1987; Govindarajan et al. 2006). Até o momento, entretanto, a relação entre a diversificação de linhagens associada às possibilidades de reduções de estágios do ciclo de vida em Leptothecata tem sido amplamente ignorada.

Pelo exposto, fica evidente que há questões importantes e ainda não desenvolvidas sobre a evolução dos Leptothecata, bem como de Hydrozoa como um todo, tais como a evolução do polimorfismo (i.e., surgimento de novos módulos); a diversificação morfológica relacionada à perda da fase pelágica devido a “tendências ecológicas” (Bouillon et al. 1992; Panteleeva 2002); os diferentes ciclos de vida em relação à diversificação do grupo (especiação e irradiações adaptativas, Glor 2010; Miglietta & Cunningham 2012), e os diferentes potenciais da dispersão reprodutiva na distribuição geográfica (Leclère et al. 2009; Gibbons et al. 2010).

## Objetivos

- i) Inferir hipóteses das relações filogenéticas entre as principais linhagens de Hydrozoa, com ênfase no posicionamento filogenético de Leptothecata;
- ii) Inferir hipóteses das relações filogenéticas dos Leptothecata, o grupo mais diverso dos Medusozoa;
- iii) Se for justificado pelos resultados obtidos, propor uma nova taxonomia para o clado Leptothecata. Discutir considerações sobre causas e padrões de diversificação na evolução dos ciclos de vida dos Leptothecata, com base nas hipóteses filogenéticas geradas.

## Referências bibliográficas

- Boero F, Sarà M. 1987. Motile sexual stages and evolution of Leptomedusae (Cnidaria). Italian Journal of Zoology 54:131–139.
- Bouillon J. 1995. Classe des Hydrozoaires. In: Grassé PP (editor). *Traité de Zoologie*, Tome 3 (2) Cnidaires. Paris: Masson. Pp. 29–416.
- Bouillon J, Boero F. 2000. The Hydrozoa: a new classification in the light of old knowledge. *Thalassia Salentina* 24:3–45.
- Bouillon J, Boero F. 2005. Medusozoa. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. Lower Metazoans and Lesser Deuterostomes:123–168.
- Bouillon J, Boero F, Cicogna F, Gili JM, Hughes RG. 1992. Non-Siphonophoran Hydrozoa: what are we talking about? *Scientia Marina* 56:279–284.
- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, Gili JM, Boero F. 2006. An introduction to Hydrozoa. *Mémoires du Muséum national d'Histoire Naturelle* Tome 194:1–591.
- Brinkmann-Voss A. 1970. Anthomedusae/Athecata (Hydrozoa, Cnidaria) of the Mediterranean (Part I). *Capitata*. Fauna Flora Golfo di Napoli:1–96.
- Cartwright P, Evans NM, Dunn CW, Marques AC, Miglietta MP, Schuchert P, Collins AG. 2008. Phylogenetics of Hydroidolina (Hydrozoa: Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 1663-1672.
- Cartwright P, Nawrocki AM. 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology* 50:456–472.
- Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D, Disbennett K, Pfannkoch C, Sumin N, Sutton GG, Viswanathan LD, Walenz B, Goodstein DM, Hellsten U, Kawashima T, Prochnik SE, Putnam NH, Shu S, Blumberg B, Dana CE, Gee L, Kibler DF, Law L, Lindgens D, Martinez DE, Peng J, Wigge PA, Bertulat B, Guder C, Nakamura Y, Ozbek S, Watanabe H, Khalturin K, Hemmrich G, Franke A, Augustin R, Fraune S, Hayakawa E, Hayakawa S, Hirose M, Hwang JS, Ikeo K, Nishimiya-Fujisawa C, Ogura A, Takahashi T, Steinmetz PRH, Zhang X, Aufschnaiter R, Eder M-K, Gorný A-K, Salvenmoser W, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Böttger A, Tischler P, Wolf A, Gojobori T, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Technau U, Hobmayer B, Bosch TCG, Holstein TW, Fujisawa T, Bode HR, David CN, Rokhsar DS, Steele RE. 2010. The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* 464:592–596.
- Collins AG. 2000. Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: Hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Scientia Marina* 64:5–22.
- Collins AG. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15:418–432.

- Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55:97–115.
- Cornelius PFS. 1995. North-West European Thecate Hydroids and their Medusae. Part I. Introduction, Laodiceidae to Haleciidae. *Synopses of the British Fauna (n.s.)* 50. Pp. 347.
- Cunningham CW, Buss LW. 1993. Molecular evidence for multiple episodes of paedomorphosis in the family Hydractiniidae. *Biochemical Systematics and Ecology* 21:57–69.
- Gibbons MJ, Janson LA, Ismail A, Samaai T. 2010. Life cycle strategy, species richness and distribution in marine Hydrozoa (Cnidaria: Medusozoa). *Journal of Biogeography* 37:441–448.
- Glor RE. 2010. Phylogenetic insights on adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 41:251–270.
- Govindarajan AF, Boero F, Halanynch KM. 2006. Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:820–834.
- Halanynch KM. 2004. The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35:229–256.
- Jenner RA. 2004. Libbie Henrietta Hyman (1888-1969): from developmental mechanics to the evolution of animal body plans. *Journal of experimental zoology. Part B. Molecular and Developmental Evolution* 302:413–423.
- Karsenti E, Acinas SG, Bork P, et al. 2011. A holistic approach to marine ecosystems biology. *PLoS Biology* 9:e1001177.
- Kayal E, Bentlage B, Collins AG, Kayal M, Pirro S, Lavrov DV. 2011. Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. *Genome Biology and Evolution* 4:1–12.
- Kayal E, Roure B, Philippe H, Collins AG, Lavrov DV. 2013. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evolutionary Biology* 13:5.
- Kitching IJ, Forey PL, Humphries CJ, Williams DM. 1998. Cladistics: the theory and practice of parsimony analysis. 2nd ed. New York: Oxford University Press. Pp. 228.
- Kühn, A. 1913. *Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsbeziehungen der Hydrozoen. I. Teil: Die Hydroiden. Ergebnisse und Fortschritte der Zoologie* 4:1-284.
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, Couloux A, Manuel M. 2009. Molecular phylogenetics of Thecata (Hydrozoa, Cnidaria) reveals long-term maintenance of life history traits despite high frequency of recent character changes. *Systematic Biology* 58:509–526.
- Leclère L, Schuchert P, Manuel M. 2007. Phylogeny of the Plumularioidea (Hydrozoa, Leptothecata): evolution of colonial organisation and life cycle. *Zoologica Scripta* 36:371–394.
- Marques AC. 2001. Simplifying hydrozoan classification: inappropriateness of the group Hydroidomedusae in a phylogenetic context. *Contributions to Zoology* 70:175–179.
- Marques AC, Collins AG. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123:23–42.
- Marques AC, Migotto AE. 2001. Cladistic analysis and new classification of the family Tubulariidae (Hydrozoa, Anthomedusae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 41:465–488.
- Marques AC, Migotto AE, Peña Cantero AL. 2006. An overview of the phylogeny of the families Lafoeidae and Hebellidae (Hydrozoa: Leptothecata): their composition and classification. *Invertebrate Systematics* 20:43–58.
- McQuaid CD. 2010. Marine connectivity: timing is everything. *Current Biology* 20:R938–940.
- Miglietta MP, Cunningham CW. 2012. Evolution of life cycle, colony morphology and host specificity in the family Hydractiniidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Evolution* 66:3876–3901.
- Millard NAH. 1975. Monograph on the Hydroida of southern Africa. *Annals of the South African Museum* 68:1–513.
- Mock T, Kirkham A. 2012. What can we learn from genomics approaches in marine ecology? From sequences to eco-systems biology. *Marine Ecology* 33:131–148.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2011a. The use of the DNA barcode gene 16S mRNA for the

- clarification of taxonomic problems within the family Sertulariidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zoologica Scripta* 40:520–537.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2011b. Polyphyly and cryptic diversity in the hydrozoan families Lafoeidae and Hebellidae (Cnidaria : Hydrozoa). *Invertebrate Systematics* 25:454–470.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2012. A molecular phylogenetic appraisal of the systematics of the Aglaopheniidae (Cnidaria: Hydrozoa, Leptothecata) from the north-east Atlantic and West Mediterranean. *Zoological Journal of the Linnean Society* 164:717–727.
- Nawrocki AM, Cartwright P. 2012. A novel mode of colony formation in a hydrozoan through fusion of sexually generated individuals. *Current Biology* 22:717–727.
- Panteleeva NN. 2002. Life-Cycle Adaptation of Hydroids of the Family Corynidae and the Subfamily Obeliinae to Habitat Conditions. *Doklady Biological Sciences* 386:457–459.
- Peña Cantero AL, Sentandreu V, Latorre A. 2010. Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biology* 33:41–57.
- Petersen KW. 1990. Evolution and taxonomy in capitate hydroids and medusae (Cnidaria: Hydrozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 100:101–231.
- Rees WJ. 1957. Evolutionary trends in the classification of capitate hydroids and medusae. *Bulletin of The British Museum (Natural History) Zoology* 4:453–534.
- Siebert S, Robinson MD, Tintori SC, Goetz F, Helm RR, Smith AS, Shaner N, Haddock SHD, Dunn CW. 2011. Differential gene expression in the siphonophore *Nanomia bijuga* (Cnidaria) assessed with multiple next-generation sequencing workflows. *PLoS ONE* 6:e22953.
- Smith DR, Keeling PJ. 2013. Gene conversion shapes linear mitochondrial genome architecture. *Genome Biology and Evolution* 5:905–912.
- Vervoort W. 1987. Evaluation of taxonomic characters in the Hydroida, particularly in the Thecata (= Leptomedusae). In: Bouillon J, Boero F, Cicogna F, Cornelius PFS (editors). *Modern trends in the Systematics, Ecology and Evolution of Hydroids and Hydromedusae*. New York: Oxford University Press. Pp. 83–103.
- Wägele J-W, Stefen C. 2005. *Foundations of Phylogenetic Systematics*. 2nd edition. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil. Pp. 365.
- Wheeler WC. 2012. History. In: *Systematics: A Course of Lectures*. New York: Wiley-Blackwell. Pp. 1–19.



## CAPÍTULO 2

### Uma análise crítica sobre dados, suportes e critério de validação analítica em filogenias de Hydroidolina

---

#### Resumo

Hydrozoa é o grupo mais rico em espécies dos Medusozoa, apresentando formas bentônicas e pelágicas com ciclos de vida variados, exibindo também padrões biogeográficos e ecológicos diversos. A sistemática do grupo foi estabelecida originalmente a partir de dados morfológicos, e são recentes os estudos na área a partir de dados de genética. Entretanto, inferências filogenéticas contemporâneas não têm corroborado às propostas taxonômicas originais, nem conseguido estabelecer uma nova classificação sistemática básica para o sub-grupo Hydroidolina. A partir de dados moleculares e novas técnicas de inferência e avaliação filogenética, apresentamos relações históricas para as principais linhagens do grupo, algumas delas originais, como entre linhagens de Filifera e Leptothecata. Estas relações poderiam nos indicar novas considerações de homologia, como no caso de estruturas morfológicas dos pólipos e exoesqueletos. Destacamos a importância da avaliação de dados e o uso de vários métodos de suporte, com a finalidade de definir condições analíticas adequadas para obter filogenias melhor resolvidas e estáveis.

#### Abstract

*The Leptothecata group is characterized by presence of exoskeleton in the fully covered polyp region, as well as the gonads position in their medusa stages. They have different colony complexity and organization, remarking those erected ones with various types and functions of polyps, some of them with remarkably defense structures. In these organism's mode of life the traditional medusa stage is absence, defining a classificatory challenge on combining information from different life cycle stages in unique group's taxonomy. Molecular analyses on Leptothecta, or part of the group as main objective, are limited and their results present conflicts with the traditional systematics of the group. From this consideration, being our main objective to infer a phylogeny of species for the group, we generated a molecular datamatrix to represent the largest possible number of species. Our results allow us to*

*propose a new general taxonomy of Leptothecata, defining large groups in a proper classification. Finally recent considerations on macroevolutionary trends of the group are discussed, taking into account their potential impact on biodiversity origin and species richness of the group, a well know attribute of Leptothecata.*

## **Introdução**

Os Hydrozoa são o grupo mais diverso dos Medusozoa, incluindo cerca de 3.300 espécies (Daly et al. 2007), majoritariamente marinhas, bentônicas e pelágicas, com ciclos de vida variados, ocorrendo em múltiplos cenários biogeográficos e ecológicos (e.g. Mills et al. 2007; Gibbons et al. 2010). Organizar evolutivamente sua diversidade, com hipóteses históricas consistentes para suas relações filogenéticas, não é uma tarefa simples. Diversas propostas sistemáticas para o grupo foram apresentadas ao longo dos séculos XX (Hyman 1940; Naumov 1969; Petersen 1979, 1990; Boero et al. 1996; Bouillon & Boero 2000; revisadas em Collins 2000) e XXI (e.g., Marques 2001; Bouillon & Boero 2000; Cartwright et al. 2008). A taxonomia tradicional dos Hydrozoa foi extensivamente baseada nas variações do ciclo de vida (Bouillon & Boero 2005). Porém alternativas, exceções e incongruências em relação aos pretensos padrões majoritários de ciclos de vida (e.g., Petersen 1990; Marques & Migotto 2001; Collins et al. 2006; Govindarajan et al. 2006; Leclère et al. 2007, 2009; Cartwright & Nawrocki 2010; Miglietta & Cunningham 2012) fizeram uma contraponto à abordagem classificatória tradicional. Alternativas para solucionar essa questão incluíram a incorporação de novas fontes de dados (marcadores genéticos) e métodos (e.g., inferências probabilísticas), que corroboraram a necessidade de reavaliações taxonômicas substanciais (e.g., Cartwright et al. 2008; Nawrocki et al. 2010).

Abordagens moleculares iniciaram com marcadores isolados (e.g., Collins 2000 com o gene ribossomal nuclear 18S), persistindo até recentemente em alguns casos (e.g., Peña Cantero et al. 2010 com o gene ribossomal mitocondrial 16S), gradativamente passando a abordagens integradas multilocus (e.g., Cartwright & Nawrocki 2010). A incorporação de mais táxons e marcadores gerou análises de maior complexidade e abrangência, passando de objetivos mais gerais (e.g. o monofiletismo de

Hydrozoa) a questões mais específicas (e.g., evolução da forma modular em Hydrozoa).

Atualmente, a partir de inferências moleculares (ver revisão em Collins 2009 e Van Iten et al. 2014), considera-se os Hydrozoa divididos em duas subclasses: os Trachylina (Collins et al. 2008), compostos pelos Limnomedusae e os hidrozoários com ausência de pólipos em seu ciclo de vida (*viz.* Trachymedusae e Narcomedusae), e os Hydroidolina (Cartwright et al. 2008), caracterizados por espécies com colônias polimórficas e ciclos de vida diversos que envolvem desde a presença das fases de pólipos e medusa até o total desaparecimento da fase de medusa. Em síntese (Van Iten et al. 2014), os Hydroidolina incluem diversas linhagens “antoatecadas” com Leptothecata (a linhagem mais rica em espécies e em alterações do ciclo de vida, ver Marques 2001; Marques & Collins 2004) e Siphonophorae (hidrozoários pelágicos coloniais de organização complexa e polimórfica, ver Dunn et al. 2005). O tradicional grupo “Anthoathecata” não é monofilético (contraste de diferentes argumentos e posições em Naumov 1969; Petersen 1990; Schuchert 1996; Marques 2001; Bouillon et al. 2006; Collins et al. 2006; Cartwright et al. 2008; Cartwright & Nawrocki 2010), sendo divididos em Aplanulata (previamente dentre os Capitata; Collins 2000; Collins et al. 2005; Nawrocki et al. 2012), Capitata (senso Nawrocki et al. 2010) e quatro linhagens independentes do que era considerado “Filifera” (Cartwright et al. 2008): Eudendriidae (ou Filifera I) e outros três grupos considerados especulativos devido aos seus baixos valores de suporte (e.g., Filifera IV - Cartwright et al. 2008; Cartwright & Nawrocki 2010). As relações entre estes grandes grupos de Hydroidolina continuam obscuras, incluindo topologias não conclusivas (e.g., Collins 2002; Marques & Collins 2004, Collins et al. 2006; Cartwright & Nawrocki 2010), ainda com a presença de politomias basais, mesmo com o acréscimo de táxons, marcadores e abordagens analíticas. Não há, até o momento, avaliações da qualidade e impacto dos diferentes dados moleculares aplicados na reconstrução filogenética (Gatesy, DeSalle & Wahlberg 2007) para os Hydrozoa.

O desenvolvimento de métodos de análises moleculares contemporâneas que buscam dados e métodos que gerem hipóteses filogenéticas resolvidas, e que avaliem a condição de qualidade nos resultados

(filogenias “robustas”; Edwards 2009; Anisimova et al. 2010) é um área em pleno desenvolvimento (Anisimova et al. 2013); entre as prioridades destas técnicas, destaca-se a detecção e deleção de dados que não refletem relações filogenéticas. Fontes potenciais de ruído filogenético podem ser encontradas no estabelecimento da homologia posicional (ou primária sensu de Pinna 1991) entre as sequências (i.e. alinhamento), posições nos alinhamentos com acúmulo de variabilidade genética que não reflete o processo filogenético (Townsend et al. 2012), entre outros. Metodologias que procuram eliminar as fontes de “ruído filogenético”, e aprimorar a qualidade das topologias resultantes nas análises filogenéticas, podem basear-se na deleção de dados das matrizes (e.g., Kück et al. 2010). Para avaliar a estratégia inicial de definição de dados, posteriormente às análises filogenéticas analisa-se a relação entre os dados e as diferentes regiões das topologias obtidas, como em metodologias de análise de suporte paramétrico e não-paramétrico (e.g., Anisimova et al. 2011); também é possível quantificar o sinal filogenético dos diferentes marcadores moleculares, utilizados na topologia obtida, entre outras técnicas propostas e recomendadas. A aplicação dessas metodologias reflete em definições e justificativas dos dados primários para uma inferência filogenética e, conseqüentemente, nos critérios usados para corroborar ou rejeitar hipóteses topológicas, geralmente levando a novas classificações taxonômicas.

Diante desse cenário, o objetivo deste estudo foi analisar criticamente estratégias de inferências filogenéticas a partir de dados moleculares ribossomais nos Hydrozoa. Foi avaliado o efeito do uso de um sistema paramétrico de filtragem de dados heterogêneos (i.e., setores nos alinhamentos com *indels* ambíguos e variabilidade não filogenética), por meio de topologias resultantes e seus valores de suporte. Foram utilizados dois níveis de abrangência de filtragem: o nível “baixo” e nível “intensivo” de deleção de dados para cada marcador molecular estudado, e perfis de informatividade filogenética foram estabelecidos para cada marcador molecular em cada caso. Com isso, buscamos estabelecer um critério analítico de determinação do suporte do sinal filogenético relativo de cada partição dos dados resultantes de análises combinadas nos Hydrozoa, com foco principal na filogenia geral dos Hydroidolina.

## Material e Métodos

### Amostragem taxonômica

Os dados foram obtidos a partir de sequências disponíveis no GenBank, majoritariamente utilizadas em trabalhos anteriores, complementada com sequências próprias (Tabela Suplementar 1). Optamos por maximizar a cobertura taxonômica para que cada terminal apresentasse sequências de todos os marcadores moleculares considerados na análise, porque isso limita a presença de artefatos taxonômicos nas inferências filogenéticas, que geralmente são produto da presença de *missing data* em diversos táxons (“*supermatrix approach*”, segundo Queiroz & Gatesy 2007). O total de espécies para o grupo Hydrozoa resultou em 170 terminais, sendo 19 terminais para Trachylina, 10 de Siphonophorae, 64 de “Anthoathecata” e 79 de Leptothecata (Tabela Suplementar 1). Como é amplamente corroborado (e.g., Marques & Collins 2004; Collins et al. 2006), a raiz das topologias foi considerada entre Trachylina e Hydroidolina, evitando assim eventuais forçantes espúrios de relações por mera distância com grupos externos.

### Coleta de dados moleculares

O material coletado foi preservado em etanol ( $\geq 70\%$ ). Duas técnicas distintas foram utilizadas na extração de DNA: um *kit* baseado no agente quelante Chelex (Bio-Rad® INSTAGENE®; Nishiguchi et al. 2002), e um *kit* baseado em partículas magnéticas com afinidade pelo DNA de dupla fita (Agencourt® DNAdvance®).

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizaram *primers* específicos da literatura e próprios (Tabela Suplementar 2 e 3). Os resultados de cada PCR foram avaliados em gel de agarose 1,5%, corados com Biotium® GelRed®. Os *amplicons* foram purificados com *kit* baseado em partículas magnéticas com afinidade pelo DNA de dupla fita (Agencourt® AMPure®), suas concentrações quantificadas utilizando-se Thermo® NanoDrop 2000c®, sendo posteriormente preparados para sequenciamento Sanger via reação de ABI Big Dye V3.1®, seguindo o protocolo do fabricante, com uso de *T<sub>m</sub>* similares às utilizadas nas reações de PCR. O sequenciamento bidirecional foi realizado no Centro de Sequenciamento do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, utilizando o Hitachi® ABI PRISM3100 genetic analyzer®. As sequências

obtidas foram montadas nos softwares GeneCodes® Sequencer® 4.6 ou Geneious® v5.4 (Drummond et al. 2011).

Para os marcadores ribossomais nucleares (18S e 28S) obtivemos quase a totalidade das sequências gênicas (~1.800 pb e ~3.200 pb, respectivamente), e para o marcador ribossomal mitocondrial (16S) obtivemos sequências parciais de ~600 pb (Tabelas Suplementares 1 e 2). Contaminação ou erro de identificação de sequenciamento foram determinados com auxílio do algoritmo BLAST (Altschul et al. 1990). A submissão de sequências para o GenBank foi realizada no software Geneious® v5.4 (Drummond et al. 2011).

### **Análise dos dados**

O alinhamento das sequências para cada marcador foi realizado no software MAFFT v6 (Kato & Toh 2008) com parâmetros E-INS-i, recomendados para sequências de genes ribossomais (i.e., < 200 sequências com domínios múltiplos conservados e *indels* extensos). Após eliminar regiões de baixa qualidade nas extremidades 5'e 3', as sequências foram combinadas com auxílio do software SequenceMatrix (Vaidya et al. 2010).

Elaboramos três tipos diferentes de matrizes: (i) matrizes de evidência total (denominadas “16S18S28S”), (ii) matrizes de marcadores nucleares (“18S28S”) e (iii) matrizes individuais para cada um dos marcadores (matrizes gênicas; Tabela 1). Condições de similaridade não filogenética para cada posição dos alinhamentos foram determinadas pela comparação de maneira pareada e por re-amostragem de dados, pelo método de Monte Carlo com o auxílio do programa Aliscore (Misof & Misof 2009). Os alinhamentos filtrados foram obtidos considerando i) as regiões com *indels* como *missing data* utilizando janela-padrão de 6 posições (matrizes de filtragem “N”), e ii) selecionando o tamanho mínimo comparativo no Aliscore de quatro posições, considerando também *indels* como *missing data*, resultando em uma filtragem mais estrita dos dados (matrizes de filtragem “Nr4”; Misof & Misof 2009; Tabela 1).

Um total de 15 matrizes foram analisadas pelo critério de máxima verossimilhança (Tabela 1) com o modelo GTR (*general time reversible*), definido via jMODELTEST (Posada 2008) como o mais adequado para os dados (semelhante a análises anteriores em Hydrozoa). As inferências filogenéticas foram realizadas com o software RAxML v7.3.0 (Stamatakis et al.

2005; Rokas 2011), com 350 buscas para cada análise para determinar a hipótese de máxima verossimilhança (filogenias gênicas e combinadas), com valor de alfa estimado a partir dos dados e sem estimativa de sítios invariáveis, seguindo a recomendação padrão (modelo “GTR+GAMMA”; veja manual do software RAxML); nas análises combinadas, cada marcador foi tratado como uma partição individual.

O suporte nodal foi estimado por meio de 1.000 réplicas de *bootstrap* não paramétrico (BS). Além disso, foram utilizadas análises de suporte paramétrico (aBAYES, aLRT; mais suscetíveis a erros de tipo I, ou falso positivo) e um método adicional não paramétrico (SH-aLRT; mais suscetíveis a erros de tipo II, ou falso negativo) implementadas no programa PhyML 3.0.1 beta (Guindon et al. 2010), com condições analíticas idênticas às utilizadas no RAxML, sendo a topologia inicial a melhor árvore obtida previamente no RAxML (veja protocolo do trabalho analítico na Figura Suplementar 1). A partir de resultados publicados de simulações e análises (e.g., Anisimova et al. 2011), propusemos valores de “potencial falso positivo” (pFP) para aBAYES (BS < 75 / SH-aLRT ≤ 0,85 / **aBAYES ≥ 0,95** / aLRT ≤ 0,9 e “potencial falso negativo” (pFN) para BS (**BS < 75** / SH-aLRT ≥ 0,85 / aBAYES ≥ 0,95 / aLRT ≥ 0,9) (Figuras 1-3; Figuras Suplementares 2-13; Tabelas 2-3; veja Anisimova et al. 2011 e resultados apresentados em <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/benchmarks/>).

A contribuição relativa de cada marcador nas análises de matrizes combinadas (16S18S28S) foi analisada a partir dos valores de suporte calculados para cada partição de maneira individual (valores de SH-aLRT, aLRT, e aBAYES). O potencial de “informatividade” filogenética (“*phylogenetic informativeness*”, Phydesign; Lopez-Giraldez & Townsend 2011) foi calculado para cada partição, tanto na forma de rede como por sítio. As topologias dos resultados combinados foram utilizadas como árvores de avaliação para cada caso, procurando aplicar os mesmos parâmetros e valores obtidos na reconstrução filogenética original (e.g., frequências nucleotídicas; veja Figura 4 e Tabela 3 para detalhes).

Finalmente, a avaliação das condições de saturação nos resultados de cada análise foi realizada em gráficos de substituições (transição vs transversão; Figura Suplementar 14), e pelo teste de saturação do programa DAMBE v5.3.2 (Xia 2009; Tabela 1). A edição das topologias foi realizada nos

programas TreeGraph v2 e Inkscape (Stöver & Müller 2010; <http://inkscape.org/>).

## **Resultados**

### **Análises filogenéticas: relações basais nos Trachylina e Hydroidolina**

Os resultados das análises das matrizes combinadas 16S18S28S e 18S28S corrobora o monofiletismo dos clados Trachylina e Hydroidolina, presentes em todas as topologias obtidas destas matrizes, sempre com suporte alto.

Em Trachylina, Limnomedusae tem uma posição basal (Figura 1, Tabela Suplementar 1, Figura Suplementar 2). As topologias das análises combinadas para o grupo são estáveis, e em geral apresentam alto suporte para todos os casos. Entretanto, as topologias obtidas a partir de marcadores isolados apresentam baixos valores de suporte nodal de forma geral (Figuras 2-3; Figuras Suplementares 2-13).

Com relação à Hydroidolina, Capitata resulta em monofilético e basal em análises combinadas, geralmente com valores de suporte altos e estáveis (mas veja os valores de BS; Tabela 2). Em análises de 18S28S, Capitata também é basal em todos os casos, com suportes medianos/altos para todas as topologias (Tabela 2; Figuras Suplementares 11-13). As relações entre as linhagens restantes de Hydroidolina resumem-se em três clados: (i) clado englobando Filifera I + Filifera II grupo irmão de Aplanulata + Siphonophorae, (ii) clado Filifera III, e (iii) clado formado por Filifera IV\* + Leptothecata (Filifera IV\* = Filifera IV não monofilético, mas com linhagens filogeneticamente próximas). Estes grandes grupos monofiléticos (Capitata, Aplanulata, Siphonophorae, Leptothecata e os grupos Filifera I, II e III) apresentam altos valores de suporte na topologia principal do nosso estudo, e encontram-se representados em quase todos os resultados combinados (matrizes 16S18S28S e 18S28S; Figuras 1-3 e Figuras Suplementares 11-13).

O clado Filifera I + Filifera II é encontrado nas topologias obtidas de 16S18S28S e 16S18S28S\_N, com diferenças nos valores de suporte: suportes baixos para 16S18S28S, suportes maiores para a matriz filtrada 16S18S28S\_N (Figuras 1 e 2). A topologia alternativa, em que Filifera I + Filifera II não é recuperada, apresenta suporte nodal menor (resultado para a matriz de filtragem estrita 16S18S28S\_Nrw4, incluindo no resultado a perda de monofilia



de Filifera I; Figura 3). No caso das matrizes 18S28S, o clado Filifera I + Filifera II apresentou valores de suporte próximos a 1 para todos os resultados (Tabela 2; Figuras Suplementares 11-13).

O clado Aplanulata + Siphonophorae tem alto suporte nas análises combinadas 16S18S28S e 16S18S28S\_N, à exceção de BS, o que nos leva a considerar como um caso potencial de falso negativo (pFN; Figuras 1 e 2). A matriz com alta filtragem 16S18S28S\_Nrw4 não resulta em Aplanulata + Siphonophorae, sendo a posição alternativa de Siphonophorae de baixo suporte (Figura 3). É importante destacar que nas matrizes nucleares 18S28S não se recupera este clado, nem tampouco as relações entre Filifera III, Leptothecata e as linhagens de Filifera IV presentes nas matrizes combinadas 16S18S28S, sendo de grande importância a ausência do marcador 16S nestes resultados dos marcadores nucleares (veja discussão).

A monofilia de Filifera III é altamente suportada nas análises combinadas e nucleares (suportes altos e médios no caso das matrizes filtradas). O suporte para a sua posição relativa como grupo irmão das linhagens de Filifera IV e Leptothecata é significativo, à exceção, novamente, de BS (potencial falso negativo, pFN). Na matriz 16S18S28S\_Nrw4 muda a relação filogenética, formando o clado Filifera III + Filifera IV; porém, o suporte de todas as topologias alternativas é baixo (Figura 3 e Tabela 2). A proximidade entre Filifera III e (Filifera IV\*, Leptothecata) é mais um caso de resolução das matrizes combinadas sem filtragem ou com baixa filtragem, e para um setor da topologia onde há sucessivas situações de pFN nos nós (Tabelas 2 e 3; veja discussão).

Finalmente, a relação de linhagens de Filifera IV\* (sendo o grupo não monofilético em seu *sensu estrito*) com Leptothecata é altamente suportada em análises de 16S18S28S e 16S18S28S\_N. O resultado combinado de filtragem intensiva (16S18S28S\_Nrw4) e das matrizes 18S28S recuperam Siphonophorae como grupo irmão de Leptothecata, mas em todos os casos com valores baixos de suportes. Para o marcador 16S, nas análises individuais há uma mistura de linhagens em que os tecados ocupam uma posição relativa “próxima” a linhagens de Filifera IV (Figuras Suplementares 2 e 4; veja discussão).

Tabela 1 - Dados básicos e resultados obtidos nas análises filogenéticas, considerando cada matriz de dados com e sem filtragem de dados (multilocus: 16S1828S, 16S18S28S\_N, 16S18S28S\_Nrw4; dados nucleares (18S28S, 18S28S\_N, 18S28S\_nrw4; filogenias gênicas: 16S, 16S\_N, 16S\_Nrw4, 18S, 18S\_N, 18S\_Nrw4, 28S, 28S\_N, 28S\_Nrw4). Detalha-se o número de espécies analisadas em cada caso, número de sítios presentes nas matrizes, sítios conservados-variáveis-com informação (Parcimônia)-*singletons*. O número de *gaps* e *missing data* totais são apresentados em forma de porcentagem, e no caso do resultado da filtragem do programa Aliscore o número e porcentagem de sítios eliminados, respectivamente. O Log-likelihood apresentado representa o Log-likelihood total para os casos de matrizes combinadas e matrizes individuais (análise particionada para matrizes com mais de um marcador molecular calculados no programa RAxML). Frequências de nucleotídeos totais, proporção sítios invariantes e frequências de tipos de mudanças nucleotídicas, calculadas nos programas PhyML e MEGA ("Freq"; apresenta-se também os resultados de cálculos de parâmetros alfa e gamma em ambos programas). Por último, o teste de saturação nucleotídica calculado no programa DAMBE (configuração "*all sites gaps unknown nc; 32 OTU*"). Símbolo \* = não aplica nesse caso.

<b>Análises HYDROZOA; informação básica</b>	16S18S28S	16S18S28S_N	16S18S28S_Nrw4	16S	16S_N	16S_Nrw4
Táxons terminais	170	170	170	167	*	*
Sítios(total)	6.312	5.746	4.729	590	534	402
Sítios conservados	2.770	2.659	2.603	92	81	80
Sítios variáveis	3.293	2.963	2.074	495	450	322
Sítios com informação (Parcimônia)	2.593	2.344	1.575	433	397	279
Sítios <i>singleton</i>	645	583	490	51	49	42
Gaps e caracteres <i>missing data</i> (%)	20,36%	13,81%	7,70%	15,03%	9,13%	3,30%
Aliscore (sítios eliminados e [% sítios que são mantidos])	*	566 [91,03%]	1,583 [74,92%]	*	56 [90,51%]	188 [68,13%]
Log-likelihood (RAxML)	-143003,04	-132653,36	-67783,52	-31393,72	-29135,52	-16242,70
Freq A C G T (PhyML)	0,277 0,197 0,265 0,260	0,278 0,197 0,266 0,259	0,284 0,193 0,267 0,256	0,410 0,120 0,151 0,320	0,410 0,121 0,155 0,316	0,384 0,130 0,172 0,313
Freq A↔C A↔G A↔T (PhyML)	0,825 2,404 1,898	0,8367 2,575 1,882	1,252 3,824 2,190	1,923 6,023 3,825	1,598 6,0174 3,475	1,716 7,048 3,503
Freq C↔G C↔T (PhyML)	1,019 5,316	1,002 5,421	1,049 7,386	1,004 13,508	0,783 12,093	0,840 12,951
Proporção invariante: MEGA (Gamma+); " <i>use all sites</i> ")	0,406	0,429	0,465	0,133	0,139	0,165
Parâmetros: alfa PhyML [Gamma MEGA]	0,317 [0,630]	0,304 [0,635]	0,273 [0,551]	0,452 [0,655]	0,441 [0,649]	0,426 [0,627]
Teste Saturação [DAMBE]	0,616/0,813//0,569	0,530/0,812//0,568	0,374/0,811//0,564	0,538/0,711//0,383	0,480/0,706//0,379	0,334/0,702//0,362

Continuação Tabela 1

<b>Análises HYDROZOA; informação básica</b>	18S	18S_N	18S_Nrw4	28S	28S_N	28S_Nrw4
Táxons terminais	166	166	166	164	164	164
Sítios(total)	1.974	1.827	1.590	3.748	3.385	2.737
Sítios conservados	996	953	931	1.682	1.625	1.592
Sítios variáveis	933	836	643	1.865	1.677	1.109
Sítios com informação (Parcimônia)	724	647	486	1.436	1.300	810
Sítios <i>singleton</i>	199	179	155	395	355	293
Gaps e caracteres <i>missing data</i> (%)	15,94%	9,90%	3,71%	19,41%	12,16%	5,81%
Aliscore (sítios eliminados e [% sítios que são mantidos])	*	147 [92,50%]	377 [80,90%]	*	363 [90,31%]	1,011 [73,02%]
Log-likelihood (RAxML)	-29581,37	-27991,45	-17880,54	-81506,03	-75400,99	-33578,65
Freq A C G T (PhyML)	0,266 0,198 0,263 0,273	0,266 0,197 0,263 0,273	0,272 0,194 0,266 0,268	0,261 0,210 0,286 0,243	0,262 0,209 0,286 0,242	0,276 0,202 0,281 0,240
Freq A↔C A↔G A↔T (PhyML)	1,282 2,506 1,235	1,255 2,603 1,254	1,189 2,688 0,979	0,658 2,099 0,771	0,675 2,188 0,773	1,106 3,267 1,047
Freq C↔G C↔T (PhyML)	0,880 5,352	0,849 5,4159	1,015 6,167	0,852 4,650	0,848 4,786	0,989 6,906
Proporção invariante: MEGA (Gamma+I; "use all sites")	0,423	0,452	0,470	0,428	0,451	0,471
Parâmetros: alfa PhyML [Gamma MEGA]	0,269 [0,587]	0,267 [0,590]	0,253 [0,587]	0,280 [0,595]	0,273[0,601]	0,240 [0,475]
Teste Saturação [DAMBE]	0,475/0,789// 0,518	0,396/0,785//0,512	0,236/0,778//0,498	0,693/0,809//0,554	0,519/0,807//0,549	0,318/0,802//0,539

Continuação Tabela 1

<b>Análises HYDROZOA; informação básica</b>	18S28S	18S28S_N	18S28S_Nrw4
Táxons terminais	170	170	170
Sítios(total)	5.722	5.212	4.327
Sítios conservados	2.678	2.578	2.523
Sítios variáveis	2.798	2.513	1.752
Sítios com informação (Parcimônia)	2.160	1.947	1.296
Sítios <i>singleton</i>	594	534	448
Gaps e caracteres <i>missing data</i> (%)	20,76%	14,12%	7,97%
Aliscore (sítios eliminados e [% sítios que são mantidos])	*	510 [91,02%]	1395 [83,01%]
Log-likelihood (RAxML)	-111279,45	-103563,12	-52132,24
Freq A C G T (PhyML)	0,262 0,205 0,278 0,254	0,264 0,205 0,278 0,253	0,275 0,199 0,276 0,250
Freq A↔C A↔G A↔T (PhyML)	0,786 2,241 0,885	0,782 2,344 0,892	1,160 3,274 1,067
Freq C↔G C↔T (PhyML)	0,901 4,802	0,882 4,839	1,015 6,722
Proporção invariante: MEGA (Gamma+I; "use all sites")	0,435	0,460	0,480
Parâmetros: alfa PhyML [Gamma MEGA]	0,273 [0,551]	0,268 [0,597]	0,243 [0,525]
Teste Saturação [DAMBE]	0,618/0,812//0,568	0,533/0,811// 0,566	0,655/0,812//0,568

Tabela 2 - Resultados de análises de suporte nodal (paramétrico // não-paramétrico: aBAYES/aLRT // BS/SH-aLRT) para os principais grupos da topologia de referência no presente trabalho HYDROZOA 16S18S28S (Figura 1) nos Hydroidolina. Como foi apresentado nas Figuras 01-03, valores de alto suporte presentes em todos os suportes sem destaque (aBAYES  $\geq$  0.95 / aLRT  $\geq$  0.9 // BS  $\geq$  75% / SH-aLRT  $\geq$  0.85). Destaque em negrito refere-se aos nós onde o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (aBAYES  $\geq$  0.95 / aLRT  $\geq$  0.9 // BS  $<$  75% / SH-aLRT  $\geq$  0.85); nós com potencial falso positivo, valores em cursiva e parênteses (aBAYES  $\geq$  0.95 / aLRT  $<$  0.9 // BS  $<$  75% / SH-aLRT  $<$  0.85); baixo suporte em geral para todos os valores de suporte, destacado com colchetes [ ] (aBAYES  $<$  0.95 / aLRT  $<$  0.9 // BS  $<$  75% / SH-aLRT  $<$  0.85; veja Figura 2 e texto principal para maiores detalhes sobre relações de qualidade entre métodos e valores obtidos pelos métodos de suporte. A coluna LITERATURA refere-se a resultados presentes na literatura recente de estudos filogenéticos de Hydrozoa, com a seguinte codificação de cada citação: código\_ método de análise\_tipo de matriz [valores de suporte BS], sendo os valores e códigos para cada caso: código 1= Collins (2000), 2= Cartwright et al. (2007), 3= Cartwright & Nawrocki (2010); método de análise ML= máxima verossimilhança, MP= máxima parcimônia; tipo de matriz: 1= marcador 18S; 2= marcadores 16S, 18S e 28S em análises combinadas; [valores de suporte BS]: + significa igual ou superior a 75% BS; - significa menor a 75% BS. Outros códigos: não= grupo ausente no resultado; \*= grupo/s perde condição de monofilia comparado ao resultado principal 16S18S28S, mas com grupos resultantes próximos no sentido patrístico; \*\*= grupo/s perde a condição de monofilia comparado ao resultado principal 16S18S28S, sem grupos resultantes próximos no sentido patrístico (veja texto principal para detalhes); x = suporte não foi calculado, ou o valor não pode ser comparado.

<b>Topologia HYDROZOA 16S18S28S; Valores de suporte: aBAYES/aLRT // BS/SH-aLRT</b>	16S18S28S	16S18S28S_N	16S18S28S_Nrw4	LITERATURA	16S	16S_N	16S_Nrw4
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina	<b>1/0.98//69/0.98</b>	1/0.98//80/0.98	<b>1/0.92 // 60/0.94</b>	2_ML_2[-] / 3_ML_2[-]	não	não	não
(Filifera I+Filifera II) + (Aplanulata+Siphonophorae)	(0.92/0.49// 19/0.48)	(0.96/0.69//18/0.69)	não	não	não	não	não
Filifera I grupo irmão de Filifera II	(0.95/0.50 // 54/0.54)	(0.99/0.88//57/0.88)	não	3_ML_2[-]	não	[**0.50/0.05// 08/0.07]	[**0/0//02/0]
Aplanulata grupo irmão de Siphonophorae	<b>1/0.91//28/0.86</b>	<b>1/0.91//26/0.91</b>	não	2_MP_2[-]	não	no	não
Filifera III + Filifera IV*+Leptothecata	<b>1/0.96//34/0.98</b>	<b>1/0.96//25/0.95</b>	[0.72/0.23 // 28/0.25]	2_MP_2[-]	<b>1/0.95//2/0.96</b>	<b>*1/0.97//0/0.96</b>	[0/0// 0/0]
Filifera III grupo irmão do clado (Filifera IV*+ Leptothecata)	<b>1/0.96//34/0.98</b>	<b>1/0.96//25/0.95</b>	não	não	<b>**1/0.95//2/0.96</b>	não	não
Filifera IV* grupo irmão de Leptothecata	<b>1/0.95//24/0.95</b>	<b>1/0.94//16/0.93</b>	não	não	não	não	não
<b>Outros grupos (agrupamentos ausentes na topologia HYDROZOA 16S18S28S)</b>	16S18S28S	16S18S28S_N	16S18S28S_Nrw4	LITERATURA	16S	16S_N	16S_Nrw4
Siphonophorae grupo irmão de Leptothecata	x	não	[0.51/0.04//10/0.03]	2_ML_2[-] / 3_ML_2[-]	não	não	não
Siphonophorae grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina	x	não	não	não	não	não	n
(Filifera III+Filifera IV*)+Leptothecata	x	não	não	2_MP_2[-]	<b>1/0.88//07/0.89</b>	[*0.71/0.23// 28/0.24]	não

Continuação Tabela 2

<b>Topologia HYDROZOA 16S18S28S; Valores de suporte: aBAYES/aLRT // BS/SH-aLRT</b>	18S	18S_N	18S_Nrw4	28S	28S_N	28S_Nrw4
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina	<b>0.99/0.88//21/0.90</b>	<b>0.99/0.87//24/0.88</b>	<b>0.99/0.85//08/0.81</b>	não	não	[0.87/0.87//24/0.85]
(Filifera I+Filifera II) + (Aplanulata+Siphonophorae)	não	não	não	não	não	não
Filifera I grupo irmão de Filifera II	não	[0.63/0.27// 0/0.25]	[0.79/0.13 // 03/0.39]	não	não	<b>0.91/0.90//13/0.89</b>
Aplanulata grupo irmão de Siphonophorae	não	não	não	não	não	não
Filifera III+Filifera IV*+Leptothecata	não	não	não	[1/80//25/80]	não	[*88/85//05/0.80]
Filifera III grupo irmão do clado (Filifera IV*+Leptothecata)	não	não	não	não	não	[0.88/0.85//05/0.88]
Filifera IV* grupo irmão de Leptothecata	não	não	não	<b>1/0.93//13/0.94</b>	não	[0.76/0.76//02/0.76]
<b>Outros grupos (agrupamentos ausentes na topologia HYDROZOA 16S18S28S)</b>	18S	18S_N	18S_Nrw4	28S	28S_N	28S_Nrw4
Siphonophorae grupo irmão de Leptothecata	(0.94/0.85//48/0.86)	(0.96/0.86//52/0.84)	não	não	não	não
Siphonophorae grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina	não	não	não	<b>0.97/91//10/90</b>	(97/85//49/88)	não
(Filifera III+Filifera IV*)+Leptothecata	não	não	não	não	não	não

Continuação Tabela 2

<b>Topologia HYDROZOA 16S18S28S; Valores de suporte: aBAYES/aLRT // BS/SH-aLRT</b>	<b>18S28S</b>	<b>18S28S_N</b>	<b>18S28S_Nrw4</b>
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina (Filifera I+Filifera II)+(Aplanulata+Siphonophorae)	0.99/0.85 // x/0.86 não	0.99/0.88 // x/0.875 não	1/0.96 // x/0.941 não
Filifera I grupo irmão de Filifera II	1/0.98 // x/0.99	1/0.99 // x/0.99	[0/0 // x/0]
Aplanulata grupo irmão de Siphonophorae	não	não	não
Filifera III+Filifera IV*+Leptothecata	não	não	não
Filifera III grupo irmão do clado (Filifera IV*+Leptothecata)	não	não	não
Filifera IV* grupo irmão de Leptothecata	não	não	não
<b>Outros grupos (agrupamentos ausentes na topologia HYDROZOA 16S18S28S)</b>	<b>18S28S</b>	<b>18S28S_N</b>	<b>18S28S_Nrw4</b>
Siphonophorae grupo irmão de Leptothecata	[0.72/0.59 // x/0.58]	[0.81/0.76 // x/0.79]	[0.67/0.50// x/0.52]
Siphonophorae grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina (Filifera III+Filifera IV*+Leptothecata)	não	não	não

### **Informatividade e contribuição filogenética relativa das partições**

Os perfis de informatividade filogenética têm padrões similares para todas as matrizes (combinadas e individuais), seja no modo de dados em rede como no modo de valores por sítio individual (Figura 4). Há um decaimento pronunciado da informatividade filogenética no marcador 16S para nós profundos (“*deep epochs*”) na topologia de alta filtragem e uma redução da informatividade nos marcadores 28S e 18S. De forma geral, há diferentes perfis para os marcadores, como evidenciado pelos resultados para topologias sem filtragem e baixa filtragem *versus* aqueles de alta filtragem (veja discussão). Em nenhum dos nós basais destacados os três marcadores apresentaram, simultaneamente, valores altos de suporte nas análises combinadas ao serem analisados de forma individual (Tabela 3). Na maioria dos casos observa-se uma correlação de suporte para as matrizes de dados dos marcadores 16S e 28S, enquanto as matrizes do marcador 18S apresentam valores contrários – a análise para as matrizes de 18S apresentam suportes baixos e nulos, à exceção dos valores altos de suporte para *Capitata* como linhagem basal nos Hydroidolina entre 18S e 28S (Tabela 3). Assim, há um conflito claro entre 18S e 28S no que tange ao grupo irmão de Leptothecata, enquanto 16S se mostra decisivo para resolver este nó “profundo” na filogenia de Hydroidolina. Mesmo sendo reconhecida a presença de saturação no marcador, este recupera uma topologia similar à recuperada pelo marcador 28S.

Por último, os estudos de saturação obtidos no programa DAMBE são relativamente similares para cada marcador molecular, inclusive nos casos de filtragem leve e intensiva entre valores de transição e transversão (Figura Suplementar 14).



# Hydrozoa 16S18S28S

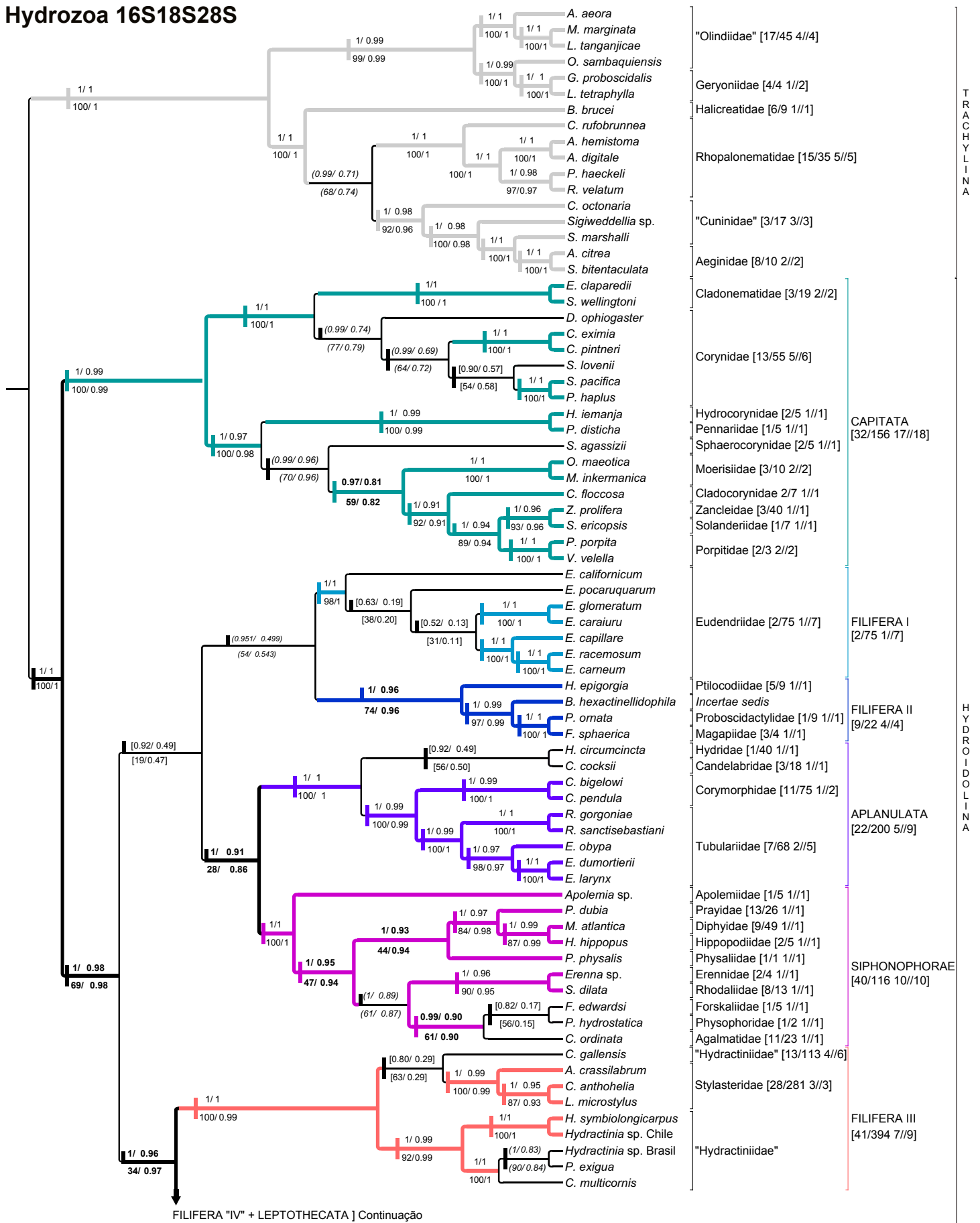


Figura 1 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa sem filtragem de dados (matriz 16S18S28S). Suportes paramétricos acima do ramo (aBAYES/aLRT), suportes não-paramétricos embaixo do ramo (BS/SH-aLRT); valores sem destaque: alto suporte em todos os casos (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS > 75%; SH-aLRT > 0.85) ou presença de valores de suporte altos em apenas dois métodos; em **negrito** destacam-se os casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS < 75%; SH-aLRT > 0.85); em *curso* e remarcados com parênteses ( ) casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85); casos com baixo suporte em todos ou na maioria dos casos, remarcados com colchetes [ ] (aBAYES < 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85). Principais linhagens encontram-se representadas em cores naqueles casos em que o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (ramos com potencial falso positivo e baixo suporte, em cor negro e linhas finas). A barra acima do ramo representa presença do clado no resultado Hydrozoa 16S18S28S\_Nrw4. Na posição direita da descrição de grandes grupos (e.g., família Sertulariidae) descreve-se o número de gêneros e espécies para o grupo presente na literatura e o número de gêneros e espécies presentes na análise, respectivamente: [gênero/espécies gênero/espécies]. Os nomes de grupos destacados com aspas " " referem-se a grupos não monofiléticos no resultado.

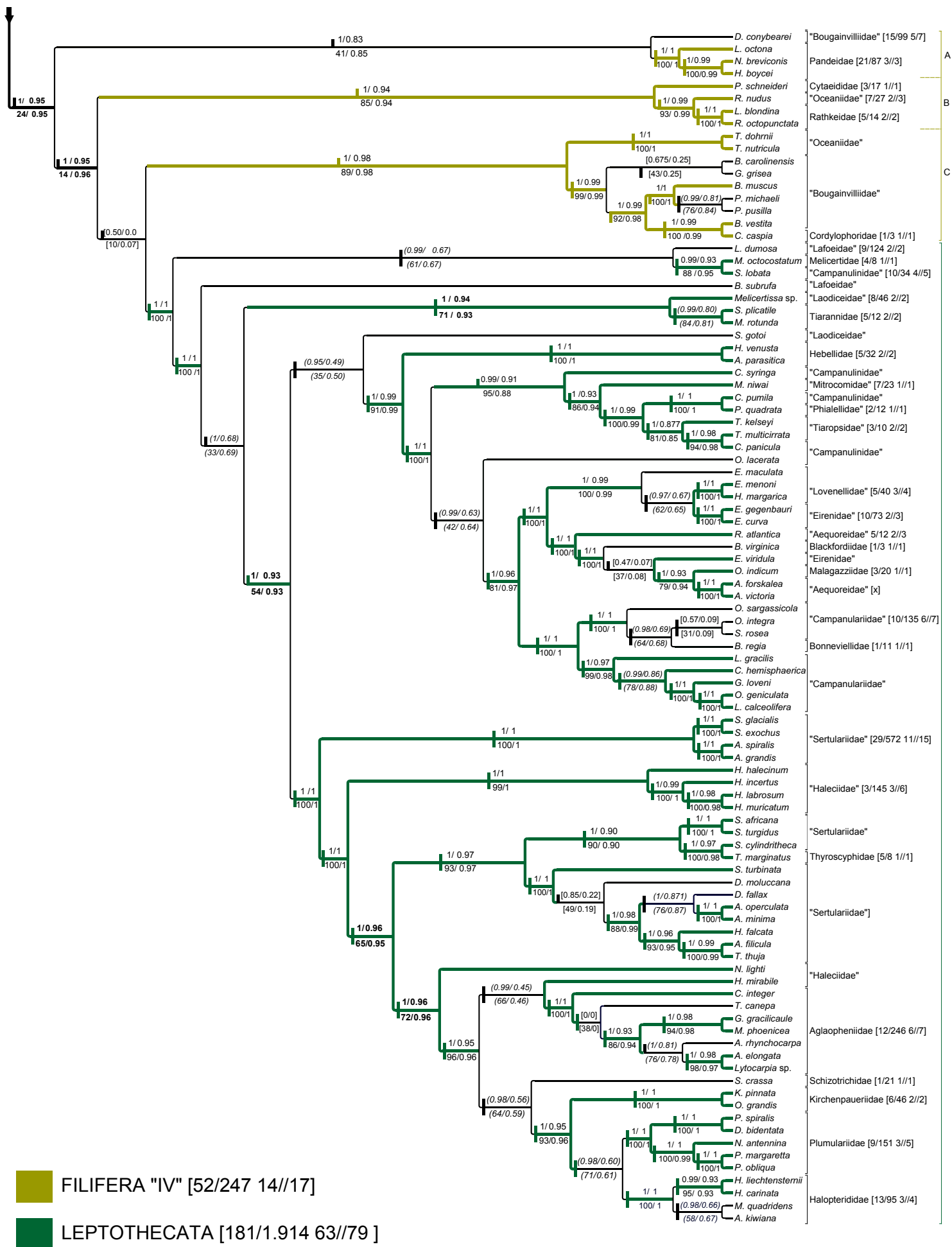


Figura 1 (continuação)

# Hydrozoa 16S18S28S\_N

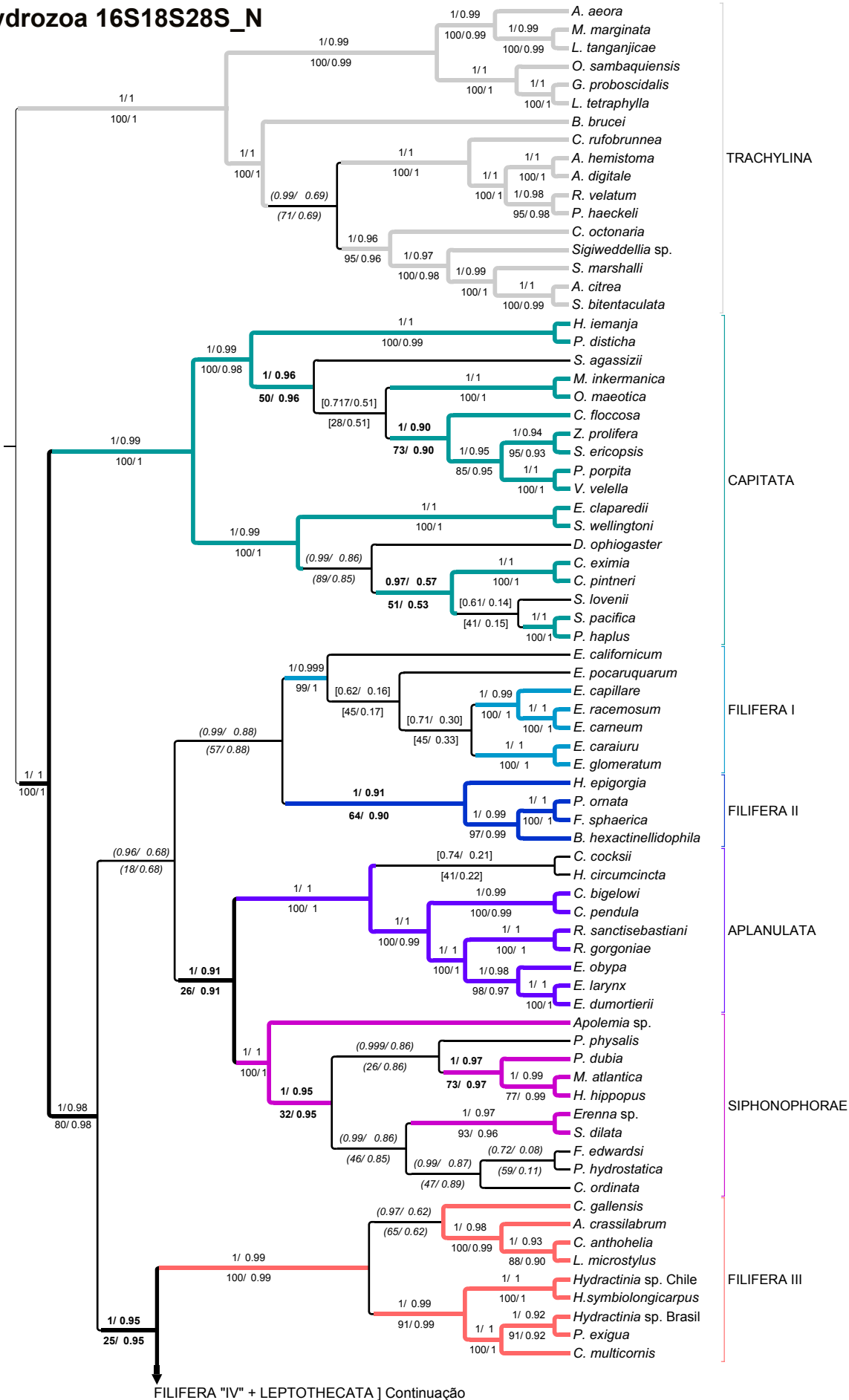


Figura 2 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados (matriz 16S18S28S\_N). Suportes paramétricos acima do ramo (aBAYES/aLRT), suportes não-paramétricos embaixo do ramo (BS/SH-aLRT); valores sem destaque: alto suporte em todos os casos (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS > 75%; SH-aLRT > 0.85) ou presença de valores de suporte altos em apenas dois métodos; em **negrito** destaca-se os casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS < 75%; SH-aLRT > 0.85); em cursiva e remarcados com parênteses ( ) casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85); casos com baixo suporte em todos ou na maioria dos casos, remarcados com colchetes [ ] (aBAYES < 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85). Principais linhagens encontram-se representadas em cores naqueles casos em que o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (ramos com potencial falso positivo e baixo suporte, em cor negro e linhas finas). Os nomes de grupos destacados com aspas " " referem-se a grupos não monofiléticos no resultado.

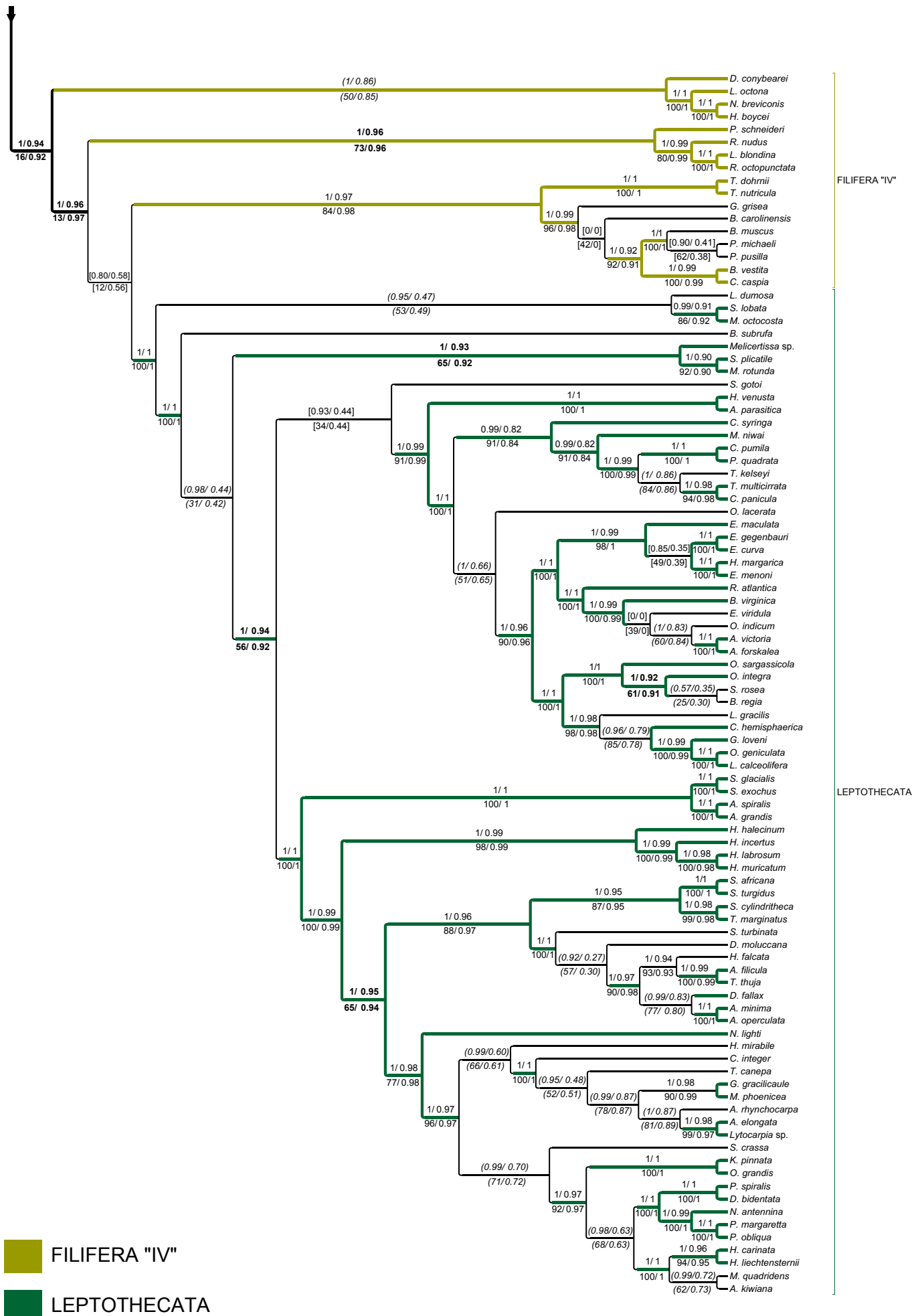


Figura 2 (continuação)

# Hydrozoa 16S18S28S\_Nrw4

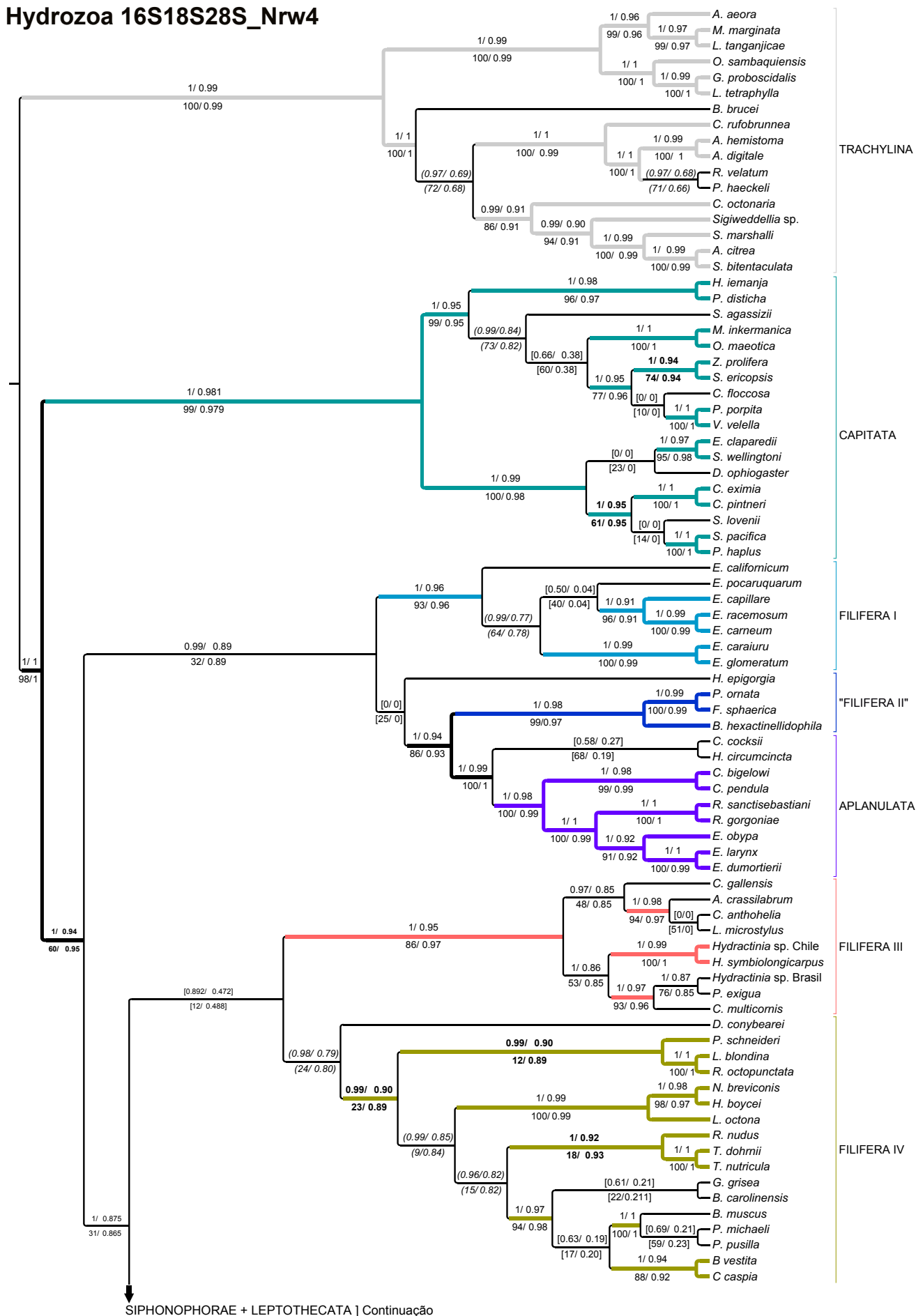


Figura 3 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com alta filtragem de dados (matriz 16S18S28S\_Nrw4). Suportes paramétricos acima do ramo (aBAYES/aLRT), suportes não-paramétricos embaixo do ramo (BS/SH-aLRT); valores sem destaque: alto suporte em todos os casos (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS > 75%; SH-aLRT > 0.85) ou presença de valores de suporte altos em apenas dois métodos; em **negrito** destacam-se os casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS < 75%; SH-aLRT > 0.85); em cursiva remarcados com parênteses ( ) casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85); em casos com baixo suporte em todos ou na maioria dos casos, remarcados com colchetes [ ] (aBAYES < 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85). Principais linhagens encontram-se representadas em cores naqueles casos em que o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (ramos com potencial falso positivo e baixo suporte, em cor negro e linhas finas). Os nomes de grupos destacados com aspas " " referem-se a grupos não monofiléticos no resultado.

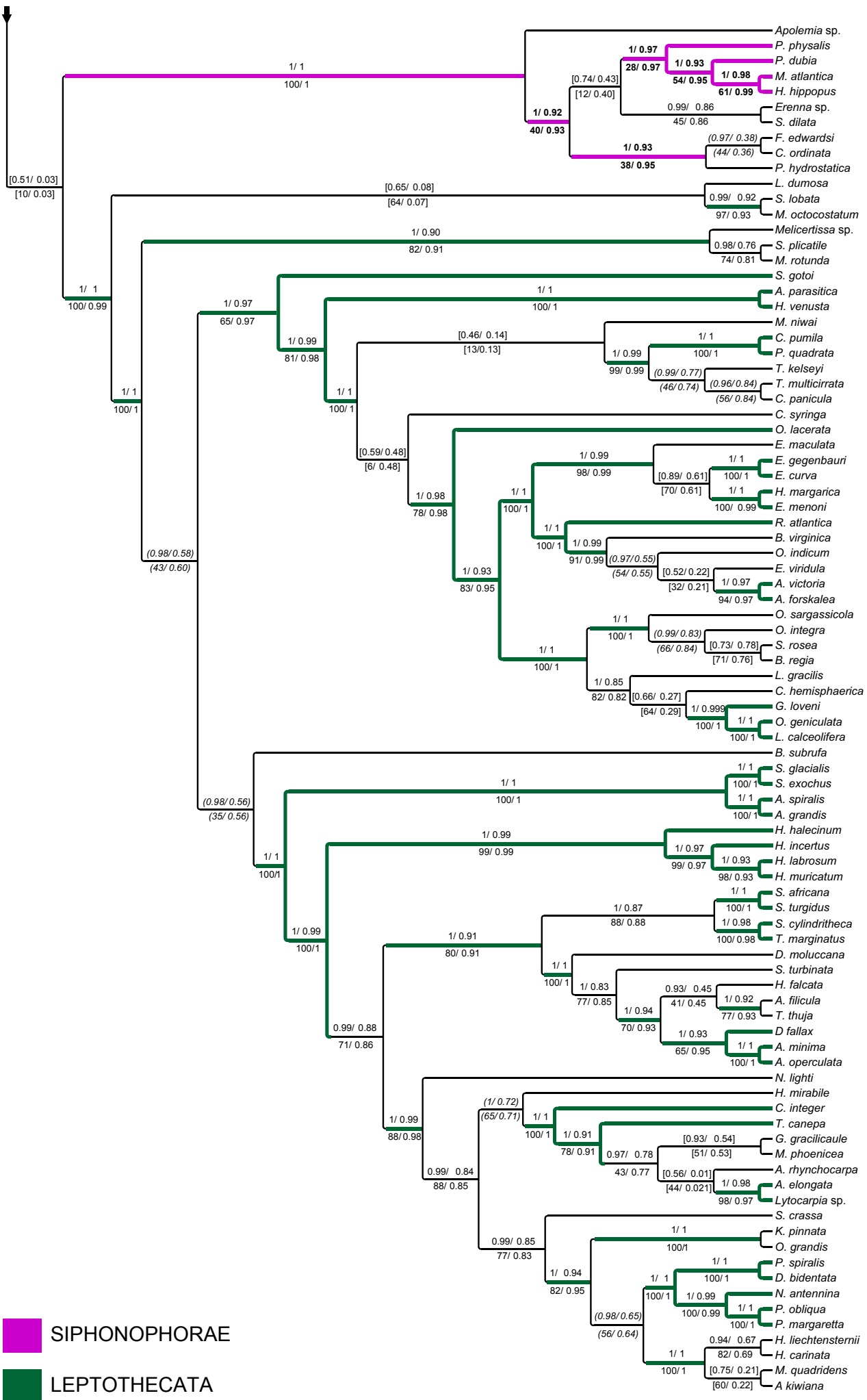


Figura 3 (continuação)

Tabela 3 - Considerando os nós basais das análises combinadas, são apresentados os valores de suporte obtidos para cada matriz combinada analisada (coluna destacada em cinza), e os valores de suporte obtidos para cada partição individual, no programa PhyML. Foram calculados os valores de suporte paramétricos aBAYES e aLRT, e os valores de suporte para o método não paramétrico SH-aLRT; para os valores de suporte das matrizes combinadas, os critérios de destaque dos valores de suporte são similares às Figuras 1-3.

TOPOLOGIA (grupos presentes em HYDROZOA 16S18S28S)	Valores de Suporte: aBAYES/aLRT // SH-aLRT	Valores de Suporte: aBAYES/aLRT // SH-aLRT		
	16S18S28S	16S	18S	28S
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina (Filifera I, Filifera II)+(Aplanulata, Siphonophorae)	<b>1/0.98 // 0.98</b> (0.92/0.49 // 0.48)	0/0 // 0 0.93/0.83 // 0.85	1/0.91 // 0.89 0.39/0.64 // 0.59	1/0.93 // 0.93 0.92/0.70 // 0.72
Filifera I grupo irmão de Filifera II	(0.95/0.50 // 0.54)	0/0 // 0	0.34/0 // 0	1/0.9 // 0.91
Aplanulata grupo irmão de Siphonophorae	<b>1/0.90 // 0.86</b>	0.99/0.87 // 0.84	0/0 // 0	0.91/0.50 // 0.52
Filifera III+Filifera IV*+Leptothecata (Filifera IV*_A(Filifera IV*_B, Filifera IV*_C, Leptothecata))	<b>1/0.96 // 0.98</b> <b>1/0.95 // 0.95</b>	0.97/0.84 // 0.85 0.99/0.93 // 0.92	0/0 // 0 0/0 // 0	1/0.91 // 0.92 0.75/0.81 // 0.78
(Filifera IV*_B(Filifera IV*_C, Leptothecata))	[0.50/0 // 0.07]	0/0 // 0	0/0 // 0	1/0.95 // 0.95
<b>TOPOLOGIA (grupos presentes em HYDROZOA 16S18S28S_N)</b>	<b>16S18S28S_N</b>	<b>16S_N</b>	<b>18S_N</b>	<b>28S_N</b>
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina (Filifera I, Filifera II)+(Aplanulata, Siphonophorae)	1/0.98 // 0.98 (0.96/0.69 // 0.69)	0/0 // 0 0.92/0.82 // 0.84	0.99/0.871 // 0.89 0.42/0.631 // 0.62	1/0.93 // 0.93 0.93/0.82 // 0.79
Filifera I grupo irmão de Filifera II	(0.99/0.88 // 0.88)	0.42/0.10 // 0.12	0.34/0 // 0	0.95/0.93 // 0.94
Aplanulata grupo irmão de Siphonophorae	<b>1/0.91 // 0.91</b>	0.99/0.85 // 0.93	0/0 // 0	0.47/0.45 // 0.46
Filifera III+Filifera IV*+Leptothecata (Filifera IV*_A(Filifera IV*_B, Filifera IV*_C, Leptothecata))	<b>1/0.96 // 0.95</b> <b>1/0.95 // 0.95</b>	0.94/0.85 // 0.83 0.99/0.91 // 0.89	0/0 // 0 0/0 // 0	0.93/0.89 // 0.93 0.73/0.79 // 0.79
(Filifera IV*_B(Filifera IV*_C, Leptothecata))	<b>1/0.95 // 0.96</b>	0/0 // 0	0/0 // 0	1/0.95 // 0.95
<b>TOPOLOGIA (grupos presentes em HYDROZOA 16S18S28S_Nrw4)</b>	<b>16S18S28S_Nrw4</b>	<b>16S_Nrw4</b>	<b>18S_Nrw4</b>	<b>28S_Nrw4</b>
Capitata grupo irmão do resto das linhagens de Hydroidolina (Filifera I(Filifera II*, Aplanulata))	<b>1/0.92 // 0.94</b> 0.99/0.89 // 0.89	0.81/0.81 // 0.8 0/0 // 0	0.92/0.85 // 0.84 0/0 // 0	0.99/0.86 // 0.89 1/0.91 // 0.91
Filifera II* grupo irmão de Aplanulata (Filifera III, Filifera IV)	0/0 // 0 [0.89/0.47 // 0.49]	0/0 // 0 0.55/0.29 // 0.28	0.97/0.83 // 0.85 0/0 // 0	0.99/0.80 // 0.79 0.97/0.79 // 0.83
(Filifera III, Filifera IV*)+(Siphonophorae, Leptothecata) (Siphonophorae, Leptothecata)	1/0.87 // 0.86 [0.52/0.04 // 0.03]	0.94/0.75 // 0.71 0.39/0 // 0	0/0 // 0 0.98/0.81 // 0.83	0.98/0.67 // 0.69 0.42/0.11 // 0.09

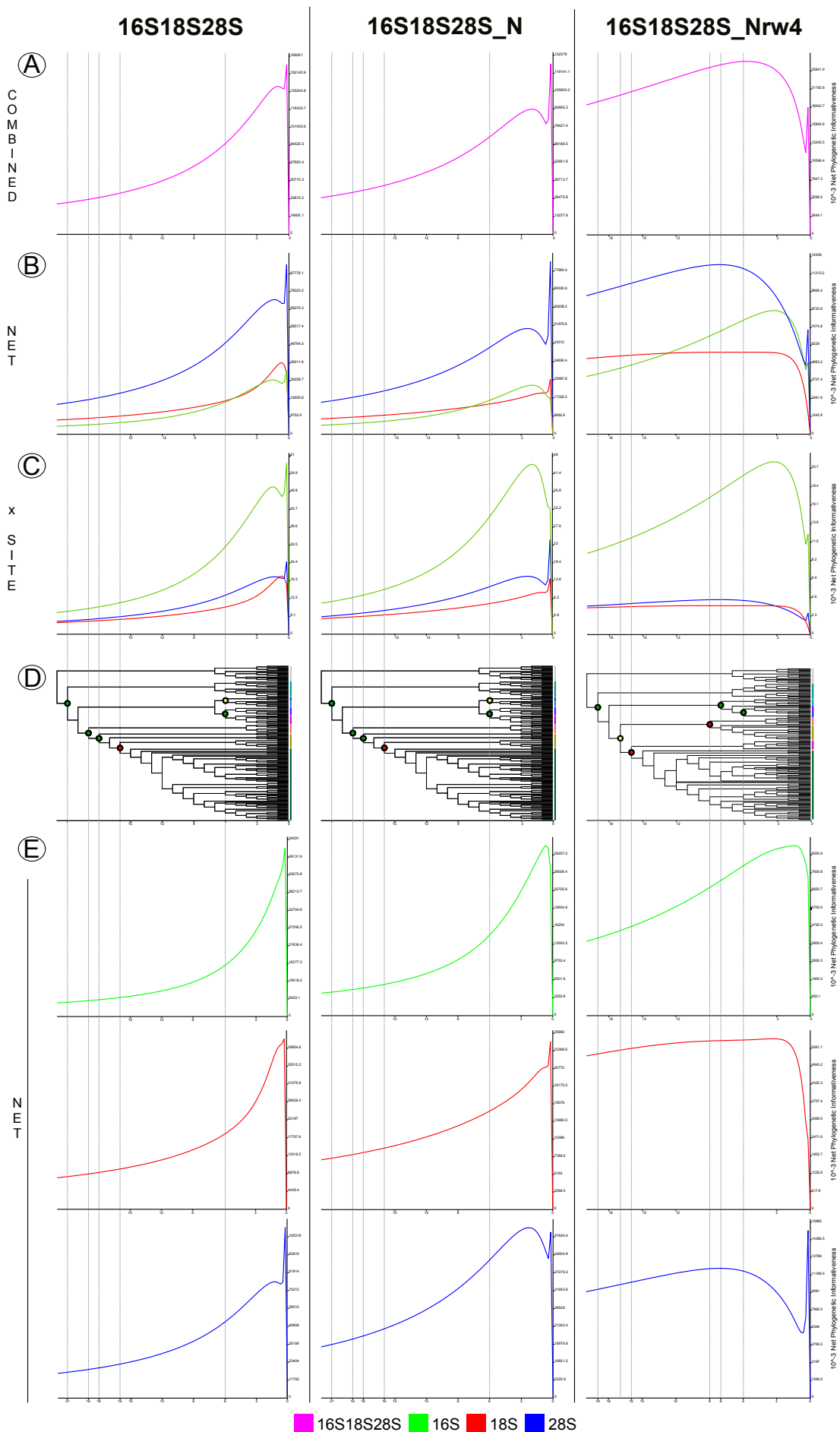


Figura 4 - Perfis de informatividade filogenética para matrizes combinadas e individuais calculados em PhyDesign; os parâmetros aplicados foram os mesmos estimados nas análises de suporte no PhyML (frequências nucleotídicas e parâmetros GTR; Tabela 1). Perfis em rede (Net) foram determinados para a matriz combinada (A), e para cada partição (determinadas em função de rede -NET- e por sítio no alinhamento -PER SITE-; seção B). Para referenciar os perfis nas topologias originais, foram definidas como cronogramas e os nós basais destacados (círculos linhas verticais; em verde destaque para nós com alto suporte e potencial falso negativo; em amarelo potencial falso positivo, e em vermelho baixo suporte em geral; seção D). Análises NET adicionais foram realizadas para cada marcador molecular, aplicando os parâmetros de cada partição calculados nas análises filogenéticas (obtidos no programa RAXML; seção E).



## Discussão

### Filtragem de dados: níveis de filtragem de dados, filogenias e avaliação nodal

Alinhamentos podem apresentar informações inadequadas para a reconstrução filogenética de natureza distinta, tais como erros de homologia posicional, heterogeneidade relacionada com saturação, etc., o que aumenta a razão entre ruído e sinal filogenético (Kück et al. 2010). No caso da sua identificação analítica e eliminação das matrizes (*signal-to-noise ratio*; Kück et al. 2010), a priori de uma análise filogenética propriamente dita, procura-se superar fontes de potenciais artefatos típicos de matrizes de dados moleculares, que resultem em topologias sub-ótimas, ou que pelo menos apresentem resultados “espúrios” em diferentes setores das topologias consideradas “ótimas”. Diversas propostas têm sido sugeridas para se evitar esses artefatos (Dress et al. 2008; Misof & Misof 2009; Wu et al. 2012). Estudos filogenéticos de Hydrozoa da última década têm focado em matrizes filtradas por diferentes critérios apriorísticos (e.g., Gblocks, Talavera & Castresana 2007), ou no máximo por critérios subjetivos, como pela eliminação de setores de difícil alinhamento manual devido à incapacidade de definir homologia posicional por similaridade primária das sequências (e.g., Collins 2000). A falta de critérios objetivos e analíticos para definir esses artefatos, e de avaliar resultados diferentes de outras propostas prévias, até mesmo baseadas nos mesmos marcadores moleculares, dificulta uma síntese taxonômica e conseqüente formulação de uma classificação. A literatura de análises filogenéticas moleculares de Hydrozoa não apresenta estudos comparativos com/sem filtragem de dados para matrizes combinadas, tampouco para filogenias gênicas ou o relativo aporte de informação filogenética de cada partição estudada. Nossas análises representam uma primeira abordagem sistemática do efeito de filtragem de dados na reconstrução filogenética no grupo Hydrozoa, assim como a sua relação com diferentes critérios de suporte nodal e informatividade filogenética. Isso é apropriado para avaliar e reconhecer situações de incongruência, já que está evidente que marcadores diferentes têm diferentes poderes de resolução filogenética sobre também diferentes setores das topologias.

Considerando o objetivo da filtragem de dados como descarte de caracteres que levem a resultados espúrios ou artefatuais relacionados à variação genética não filogenética, seu resultado ideal seriam topologias resolvidas (i.e., sem politomias) com nós com altos valores de suporte. Há uma expectativa teórica que nós mais basais sejam resolvidos por marcadores com taxas evolutivas menores (e.g., 18S) e que marcadores mais rápidos (16S e 28S) sejam mais adequados para resolver nós mais apicais (e.g., Sanderson & Shaffer 2002). Fica então evidente que a informatividade dos diferentes marcadores deve ser complementar. Embora considere tempos anagenéticos, essa premissa desconsidera o efeito de tempos cladogenéticos entre as diferentes linhagens, em que um marcador “mais lento” seja inadequadamente informativo para os eventos “rápidos” de cladogênese em nós profundos. Ademais, inferências de suporte com reamostragem não paramétrica (e.g., *bootstrap*) que teriam como função “validar” a qualidade dos resultados, também estariam comprometidas em eventos rápidos (Siddall 2002). Nossos resultados demonstram que filogenias combinadas têm clados que não estão presentes nas demais topologias filtradas (à exceção do método de filtragem “mínimo”, em que há ~9% sítios deletados). A filtragem dos dados, especialmente a mais intensiva (NrW4), resulta na perda de grupos taxonômicos tradicionais e bem reconhecidos, além de geralmente diminuir os valores de suporte, mesmo que o nó seja exatamente o mesmo resultante da matriz de dados sem filtragem. Para Hydrozoa, destacamos como exceções os clados ((Filifera I, Filifera II)(Aplanulata, Siphonophorae)) e (Filifera I, Filifera II), presentes nas topologias combinadas 16S18S28S e 16S18S28S\_N, nos quais observa-se uma melhoria relativa nos valores de suporte na matriz filtrada N (à exceção de BS, quase sem mudança de valores baixos em ambas situações; Tabela 2 e Figuras 1-3).

A informatividade filogenética nos permite também avaliar quanto cada marcador contribui para o sinal filogenético total de determinada topologia, ou para cada partição de forma estratificada, para cada setor na árvore ao ser avaliado de forma temporária (*epoch*; Figura 4). Nossos resultados demonstram que o perfil filogenético de cada marcador molecular muda, sendo “mais decisivo” dependendo do *epoch* e dos valores relativos dos demais

marcadores. Assim, a alta filtragem faz o 16S perder sinal filogenético nos nós basais de maneira mais intensa que os demais marcadores. O 18S tem tendência mais homogênea, sendo relativamente estável nas matrizes filtradas que o 16S e 28S, demonstrando uma contribuição filogenética mais decisiva nos nós basais ao aumentar a filtragem de dados e com valor quase similar de informação filogenética por sítio (*per site value*) que o marcador 28S nos nós mais basais. Ao determinar e discutir em termos de suporte relativo, o suporte calculado de cada partição *versus* suportes calculados nas matrizes combinadas de 16S18S28S, procuramos emular o conceito analítico do suporte particionado de verossimilhança (*partitioned likelihood support*; Lee & Hugall 2003; Gatesy & Baker 2005), funcionando como uma aproximação para contrastar os resultados combinados e os seus respectivos suportes nodais, e o suporte nodal relativo obtido de cada partição.

Estamos cientes que o método de informatividade filogenética não reconhece ruído filogenético, e que nossa análise de suporte particionada está limitada ao resultado ótimo combinado, mas consideramos relevante destacar estas análises *a posteriori* para discutir decisões apriorísticas de filtragem em análises filogenéticas, sendo em numerosos casos a opção *default*, que não são avaliadas em grande parte da literatura sobre análises filogenéticas. Nossa estratégia de filtragem demonstra “valores” e “regiões” da topologia em que ocorrem incongruências entre partições de dados e nós em determinada topologia combinada. Por último, não encontramos uma relação direta de dados, filtragem e resultados com estudos de saturação e gráficos de relação entre transição e transversão para as diferentes matrizes de análise obtidas em DAMBE. Embora os perfis de substituição para cada marcador sejam diferentes, eles mantêm um perfil similar entre os casos sem e com filtragem de dados (Figura Suplementar 14).

O presente estudo demonstra que algumas assunções *a priori* propostas na literatura, e rotineiramente aplicadas em estudos filogenéticos nos Medusozoa, podem ser contestadas. O panorama de uma análise filogenética pode ser mais abrangente e completo se se reconhece a conexão entre as diferentes etapas e opções do protocolo de análise. Isto nos deveria conduzir à

busca por dados e resultados que por sua parte permitam-nos estabelecer estudos melhor encaminhados e compreendidos.

### **Relações basais nos Hydrozoa: o que muda com a análise de filtragem dos dados**

Em Hydrozoa, Trachylina apresenta filogenias congruentes entre marcadores combinados e individuais, com alto suporte. Assim, corroboram-se propostas de uma linhagem que perdeu a fase de pólipo nos seus ciclos de vida (e.g., Cartwright & Nawrocki 2010). Para Hydrozoa, corroboramos vários padrões já conhecidos (Figura 1), como a inexistência de “Anthoathecata”, mas não necessariamente presentes em um mesmo resultado filogenético prévio, como por exemplo, a posição basal de Capitata (Tabela 2). Capitata é um grupo rico em espécies, classicamente caracterizado pela presença de tentáculos capitados e nematocistos estenotelos (Bouillon & Boero 2000). Está bem corroborada sua separação de Aplanulata (e.g., Nawrocki et al. 2012). No que diz respeito à Filifera I + Filifera II, Filifera I é uma linhagem que inclui apenas Eudendriidae, definida por gonóforos estiloides, desmonemos e hipostômio em forma de trompeta (Marques 1996); já Filifera II tem poucos terminais incluídos, em geral epizóicos e com tendência à redução dos tentáculos. Há necessidade de aumentar a amostragem para as diversas linhagens já incluídas em Filifera. Os padrões filogenéticos que encontramos sugerem relações históricas entre grupos com ciclo de vida variável e/ou com modificações drásticas em relação a um padrão comum, caso de Aplanulata, cujas espécies carecem de larva plânula em seus ciclos de vida e aparentemente re-evoluem o colonialismo (Nawrocki & Cartwright 2012), e de Siphonophorae, com suas colônias polimórficas flutuantes pelágicas (Dunn & Wagner 2006); no caso de Filifera III teria uma importante riqueza de polimorfismos em sua fase bentônica e poucas espécies com fase de medusa. Já as hipóteses apresentadas em filogenias prévias incluem Filifera IV, grupo com famílias ricas como Bougainvilliidae e que apresentaria relação histórica direta com Leptothecata (proposta original do nosso estudo), que apresenta diversas linhagens sem a fase pelágica e um grande número de espécies com especialização e aumento de complexidade nas suas formas coloniais. Filifera

IV, como originalmente definido por Cartwright et al. 2008, não resulta como monofilético em nosso resultado principal (16S18S28S), somente sendo recuperado como monofilético no caso de 16S18S28S\_Nrw4, com valores de suporte medianos, mas com baixo suporte em todos os casos para os nós alternativos relacionados (e.g., ((Filifera III, Filifera IV), Leptothecata)); Figura 3). É também particularmente instigante que Bougainvilliidae, grupo com espécies que apresentam “pseudo-hidroteca”, resulte como clado irmão dos tecados, sugerindo uma conexão evolutiva, eventualmente funcional.

Concluimos que a ideia de que “mais caracteres dirão mais sobre a filogenia” merece ser avaliada. Protocolos de estudo podem prever isso, especialmente para i) detectar casos em que os sistemas tradicionais de suporte possam ser inadequados ou limitados, ii) evidenciar grupos com amostragens deficientes, e iii) procurar definir e melhorar a estabilidade de resultados, a partir de diferentes tratamentos de dados e estudos de suporte nodal (Figuras 1 e 5). Fontes adicionais de informação mitocondrial (e.g., mitogenomas completos; cf. Kayal et al. 2011) e dados de genomas nucleares (e.g., Cárdenas et al. 2011; Soza-Ried et al. 2010) deverão contribuir com uma melhor compreensão histórica da evolução dos Hydrozoa, porém certamente ainda há reservas (Van Iten et al. 2014) e metodologias de filtragem terão de ser avaliadas também naqueles casos. Nossos resultados apresentam uma avaliação crítica sobre os tipos de dados acessados para inferir a filogenia de Hydrozoa, demonstrando que é importante trabalhar melhor os mesmos dados que vêm sendo analisados nos últimos 15 anos de pesquisa sistemática no grupo (dados ribossomais nucleares e mitocondriais; Figura 5). A implementação de sistemas de filtragem de dados e de suporte nodal, abrem perspectivas de apresentação de novas propostas; curiosamente, isso mantém a tradição de um dos trabalhos seminais no grupo (Collins, 2000), que já avaliava criticamente topologias alternativas de Hydrozoa no seu próprio estudo.

# Collins et al. 2006

# Presente estudo

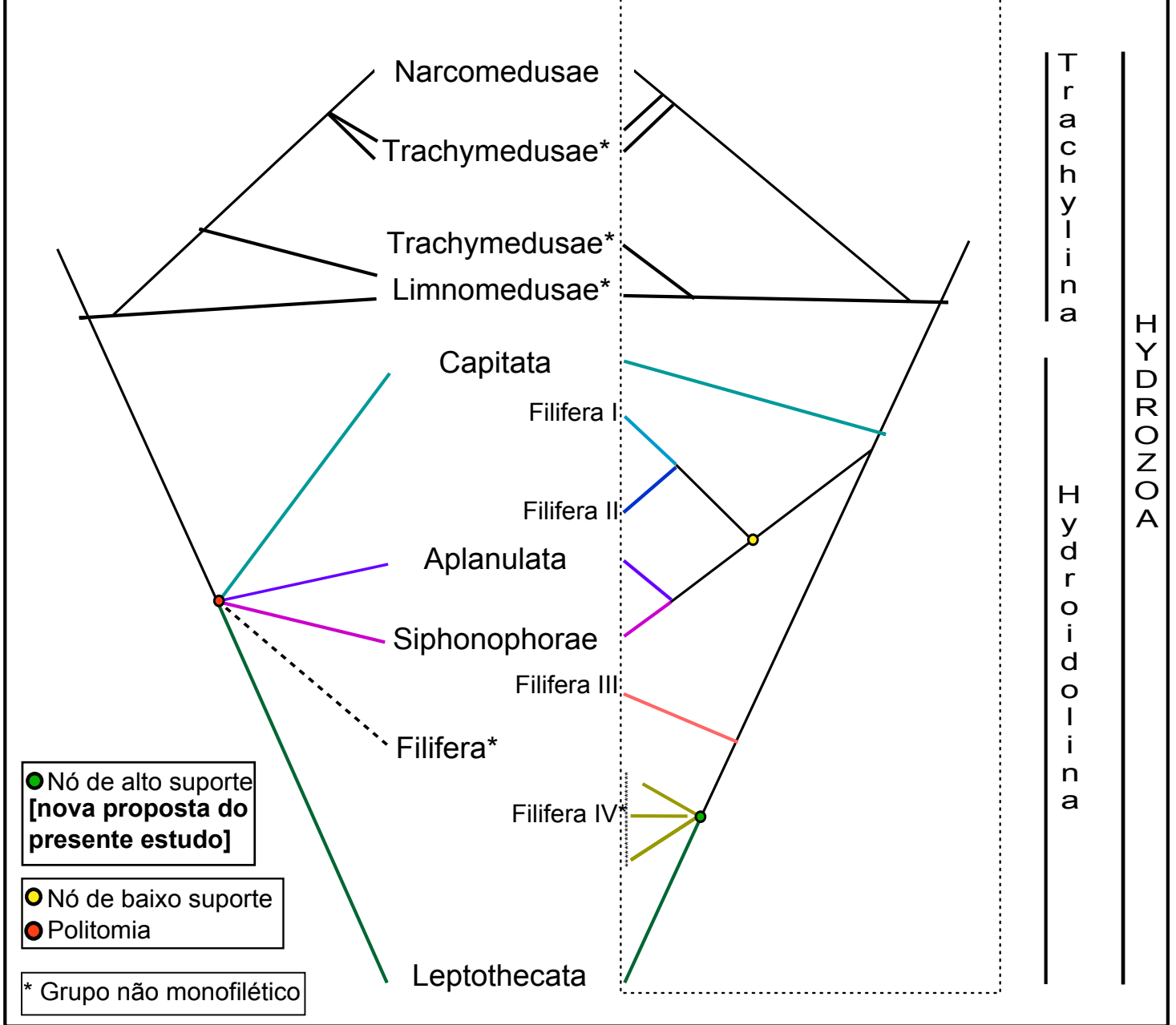


Figura 5 - Resumo de propostas filogenéticas, considerando os principais grupos de Hydrozoa e o trabalho de Collins et al. 2006 e os resultados do nosso presente estudo em Hydroidolina. Destaca-se a falta de definição nas relações filogenéticas dos principais grupos de Hydroidolina apresentado por Collins et al. 2006 (figura esquerda), e a nossa proposta, com novas relações obtidas no presente estudo com altos valores de suporte, baixos valores de suporte e linhagens não monofiléticas (linhagem Filifera e Trachymedusae; figura direita).

## Referências bibliográficas

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.
- Anisimova M, Liberles DA, Philippe H, Provan J, Pupko T, von Haeseler A. 2013. State-of the art methodologies dictate new standards for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 13:161.
- Anisimova M, Cannarozzi G, Liberles DA. 2010. Finding the balance between the mathematical and biological optima in multiple sequence alignment. *Trends in Evolutionary Biology* 2:39–48.
- Anisimova M, Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55:539–552.
- Anisimova M, Gil M, Dufayard J-F, Dessimoz C, Gascuel O. 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* 60:685–699.
- Blackburne BP, Whelan S. 2011. Measuring the distance between multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 28:495–502.
- Boero F, Bouillon J, Piraino S. 1996. Classification and phylogeny in the Hydroidomedusae. *Scientia Marina* 60:17–33.
- Bouillon J, Boero F. 2000. The Hydrozoa: a new classification in the light of old knowledge. *Thalassia Salentina* 24:3–45.
- Bouillon J, Boero F. 2005. Medusozoa. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Lower Metazoans and Lesser Deuterostomes*: 123–168.
- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, Gili JM, Boero F. 2006. An introduction to Hydrozoa. *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle Tome* 194:1–591.
- Cárdenas L, Sánchez R, Gomez D, Fuenzalida G, Gallardo-Escárate C, Tanguy A. 2011. Transcriptome analysis in *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae): mining and characterization of new genomic and molecular markers. *Marine Genomics* 4:197–205.
- Cartwright P, Evans NM, Dunn CW, Marques AC, Miglietta MP, Schuchert P, Collins AG. 2008. Phylogenetics of Hydroidolina (Hydrozoa: Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 1663–1672.
- Cartwright P, Nawrocki AM. 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology* 50:456–472.
- Collins AG. 2000. Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: Hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Scientia Marina* 64:5–22.
- Collins AG. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15:418–432.
- Collins AG. 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny.

- Smithsonian Contributions to the Marine Sciences:139–149.
- Collins AG, Bentlage B, Lindner A, Lindsay D, Haddock SHD, Jarms G, Norenburg JL, Jankowski T, Cartwright P. 2008. Phylogenetics of Trachylina (Cnidaria: Hydrozoa) with new insights on the evolution of some problematical taxa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88:1673–1685.
- Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55:97–115.
- Collins AG, Winkelmann S, Hadrys H, Schierwater B. 2005. Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zoologica Scripta* 34:91–99.
- Cruickshank RH. 2011. Exploring character conflict in molecular data. *Zootaxa* 2946:45–51.
- Cummins CA, McInerney JO. 2011. A Method for Inferring the Rate of Evolution of Homologous Characters that Can Potentially Improve Phylogenetic Inference, Resolve Deep Divergence and Correct Systematic Biases. *Systematic Biology* 60:833–844.
- Daly M, Brugler MR, Cartwright P, et al. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*:127–182.
- Dress AWM, Flamm C, Fritsch G, Grünewald S, Kruspe M, Prohaska SJ, Stadler PF. 2008. Noisy: identification of problematic columns in multiple sequence alignments. *Algorithms for Molecular Biology* : AMB 3:7.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. 2011. Geneious v5.4. Available from: <http://www.geneious.com>
- Dunn CW, Pugh PR, Haddock SHD. 2005. Molecular phylogenetics of the Siphonophora (Cnidaria), with implications for the evolution of functional specialization. *Systematic Biology* 54:916–935.
- Dunn CW, Wagner GP. 2006. The evolution of colony-level development in the Siphonophora (Cnidaria:Hydrozoa). *Development Genes and Evolution* 216:743–754.
- Edwards SV. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution* 63:1–19.
- Gatesy J, Baker RH. 2005. Hidden likelihood support in genomic data: can forty-five wrongs make a right? *Systematic Biology* 54:483–492.
- Gatesy J, DeSalle R, Wahlberg N. 2007. How many genes should a systematist sample? Conflicting insights from a phylogenomic matrix characterized by replicated incongruence. *Systematic Biology* 56:355–363.
- Gibbons MJ, Janson LA, Ismail A, Samaai T. 2010. Life cycle strategy, species richness and distribution in marine Hydrozoa (Cnidaria: Medusozoa). *Journal of Biogeography* 37:441–448.
- Glor RE. 2010. Phylogenetic insights on adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41:251–270.
- Govindarajan AF, Boero F, Halanych KM. 2006.



- Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular phylogenetics and evolution* 38:820–834.
- Grant T, Kluge AG. 2008. Clade support measures and their adequacy. *Cladistics* 24:1051–1064.
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59:307–321.
- Hyman LH. 1940. *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. Vol1. New York: McGraw-Hill. Pp. 726.
- Jenner RA, Littlewood DTJ. 2008. Problematica old and new. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363:1503–1512.
- Katoh K, Toh H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics* 9:212.
- Kayal E, Bentlage B, Collins AG, Kayal M, Pirro S, Lavrov D V. 2011. Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. *Genome biology and evolution* 4:1–12.
- Kayal E, Roure B, Philippe H, Collins AG, Lavrov D V. 2013. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC evolutionary biology* 13:5.
- Kück P, Meusemann K, Dambach J, Thormann B, Von Reumont BM, Wägele JW, Misof B. 2010. Parametric and non-parametric masking of randomness in sequence alignments can be improved and leads to better resolved trees. *Frontiers in zoology* 7:10.
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, Couloux A, Manuel M. 2009. Molecular phylogenetics of Thecata (Hydrozoa, Cnidaria) reveals long-term maintenance of life history traits despite high frequency of recent character changes. *Systematic Biology* 58:509–526.
- Leclère L, Schuchert P, Manuel M. 2007. Phylogeny of the Plumularioidea (Hydrozoa, Leptothecata): evolution of colonial organisation and life cycle. *Zoologica Scripta* 36:371–394.
- Lee MSY, Hugall AF. 2003. Partitioned likelihood support and the evaluation of data set conflict. *Systematic Biology* 52:15–22.
- Letsch HO, Kück P, Stocsits RR, Misof B. 2010. The impact of rRNA secondary structure consideration in alignment and tree reconstruction: simulated data and a case study on the phylogeny of hexapods. *Molecular Biology and Evolution* 27:2507–2521.
- Lindgren AR, Pankey MS, Hochberg FG, Oakley TH. 2012. A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment. *BMC Evolutionary Biology* 12:129.
- Lopez-Giraldez F, Townsend JP, López-Giráldez F. 2011. PhyDesign: an online application for profiling phylogenetic informativeness.

- BMC Evolutionary Biology 11:152.
- Marques AC. 1996. A critical analysis of a cladistic study of the genus *Eudendrium* (Cnidaria: Hydrozoa), with some comments on the family Eudendriidae. *Journal of Comparative Biology* 1:153–162.
- Marques AC. 2001. Simplifying hydrozoan classification: inappropriateness of the group Hydroidomedusae in a phylogenetic context. *Contributions to Zoology* 70:175–179.
- Marques AC, Collins AG. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123:23–42.
- Marques AC, Migotto AE. 2001. Cladistic analysis and new classification of the family Tubulariidae (Hydrozoa, Anthomedusae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 41:465–488.
- Miglietta MP, Cunningham CW. 2012. Evolution of life cycle, colony morphology, and host specificity in the family Hydractiniidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Evolution* 66:3876–3901.
- Mills CE, Marques AC, Migotto AE, Calder DR, Hand C. 2007. Hydrozoa: Polyps, Hydromedusae, and Siphonophora. In: Carlton JT (editor). *The Light and Smith Manual. Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*. 4ed. São Francisco: University of California Press. Pp. 118–124.
- Misof B, Misof K. 2009. A monte carlo approach successfully identifies randomness in multiple sequence alignments: a more objective means of data exclusion. *Systematic Biology* 58:21–34.
- Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD. 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta* 37:93–108.
- Naumov DV. 1969. Hydroids and hydromedusae of the U.S.S.R. *Fauna S.S.S.R.* 70:1–660. Translated from Russian by the Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Nawrocki AM, Cartwright P. 2012. A novel mode of colony formation in a hydrozoan through fusion of sexually generated individuals. *Current Biology* 22:825–829.
- Nawrocki AM, Collins AG, Hirano YM, Schuchert P, Cartwright P. 2012. Phylogenetic placement of *Hydra* and relationships within Aplanulata (Cnidaria: Hydrozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67:60–71.
- Nawrocki AM, Schuchert P, Cartwright P. 2010. Phylogenetics and evolution of Capitata (Cnidaria: Hydrozoa), and the systematics of Corynidae. *Zoologica Scripta* 39:290–304.
- Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, et al. 2002. DNA isolation procedures. In: Desalle R, Giribet G, Wheeler W (editors). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Basel: Birkhäuser Verlag. Pp. 249–287.
- O'Grady PM, Remsen JV., Gatesy J. 2002. Partitioning of multiple data sets in phylogenetic analysis. In: Desalle R, Giribet G, Wheeler WC (editors). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*.

- Basel: Birkhauser. Pp. 102–120.
- Parks M, Cronn R, Liston A. 2012. Separating the wheat from the chaff: mitigating the effects of noise in a plastome phylogenomic data set from *Pinus L.* (Pinaceae). *BMC Evolutionary Biology* 12:100.
- Peña Cantero AL, Sentandreu V, Latorre A. 2010. Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biology* 33:41–57.
- Petersen KW. 1979. Development of coloniality in Hydrozoa. In: Larwood G and Rosen B (editors). *Biology and Systematics of Colonial Animals*. Academic Press, London. Pp. 105–139.
- Petersen KW. 1990. Evolution and taxonomy in capitate hydroids and medusae (Cnidaria: Hydrozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 100:101–231.
- Philippe H, Brinkmann H, Lavrov DV., Littlewood DTJ, Manuel M, Wörheide G, Baurain D. 2011. Resolving difficult phylogenetic questions: Why more sequences are not enough. *PLoS Biology* 9:e1000602.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256.
- de Queiroz A, Gatesy J. 2007. The Supermatrix approach to systematics. *Trends in Genetics* 22:34–41.
- Rokas A. 2011. Phylogenetic analysis of protein sequence data using the randomized accelerated maximum likelihood (RAXML) Program. In: Ausubel FM (editor). *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 19:Unit19.11.
- Sanderson MJ, Shaffer HB. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:49–72.
- Schmidt HA. 2009. Testing tree topologies. In: Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M (editors). *The Phylogenetic Handbook*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press. Pp. 381–395.
- Schuchert P. 1996. The marine fauna of New Zealand: athecate hydroids and their medusae (Cnidaria: Hydrozoa). *New Zealand Oceanographic Institute Memoir* 106:1–159.
- Siddall ME. 2002. Measures of support. In: DeSalle R, Giribet G, Wheeler WC (editors). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Basel: Birkhäuser Verlag. Pp. 80–99.
- Soza-Ried J, Hotz-Wagenblatt A, Glatting K-H, Del Val C, Fellenberg K, Bode HR, Frank U, Hoheisel JD, Frohme M. 2010. The transcriptome of the colonial marine hydroid *Hydractinia echinata*. *The FEBS Journal* 277:197–209.
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* 21:456–463.
- Stöver BC, Müller KF. 2010. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11:7.
- Talavera G, Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56:564–577.

- Townsend JP, Su Z, Tekle YI. 2012. Phylogenetic signal and noise: predicting the power of a data set to resolve phylogeny. *Systematic Biology* 61:835–849.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 26:1–10.
- Wägele JW, Letsch H, Klussmann-Kolb A, Mayer C, Misof B, Wägele H. 2009. Phylogenetic support values are not necessarily informative: the case of the Serialia hypothesis (a mollusk phylogeny). *Frontiers in Zoology* 6:12.
- Wägele JW, Mayer C. 2007. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. *BMC Evolutionary Biology* 7:147.
- Wu M, Chatterji S, Eisen JA. 2012. Accounting for alignment uncertainty in phylogenomics. *PLoS ONE* 7:e30288.
- Xia X. 2009. Assessing substitution saturation with Dambe. In: Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M (editors). *The Phylogenetic Handbook*. 2nd edition. New York: Cambridge University Press. Pp. 615–629.

Tabela Suplementar 1 - Espécies analisadas no presente estudo filogenético de Hydrozoa, considerando a sistemática do grupo (classificação tradicional e novas propostas filogenéticas, como o clado Aplanulata) proposta para cada caso (Subclasse, Ordem, Subordem, Superfamília, Família). A coluna Gên/Esp Gên//Esp refere-se ao Número de gêneros/Número de espécies estimados para cada família na base de dados online WoRMS, e Gên//Esp Número de gêneros//Número de espécies analisados do grupo no presente estudo. Com símbolo \* destacam-se aqueles casos aonde existem diferenças taxonômicas com WoRMS e/ou GenBank. As colunas 16S info, 18S info e 28S info apresentam os códigos de origem do GenBank para cada marcador molecular: caso o marcador tenha sido obtido no presente trabalho, se indica com o código lem; caso o marcador não tenha sido obtido na totalidade da sua sequência esperada, indica-se com o número de fragmentos obtidos e a totalidade de fragmentos esperados (e.g., lem\_4/5); caso os marcadores tenham sido obtidos de diferentes espécimens, é destacada a correspondência do marcador e o seu correspondente código nas colunas de voucher, localidade/região e país/região em cores cinzas (pelo menos duas amostras). No ID refere-se aos casos em que não foi possível estabelecer a origem (voucher e/ou localidade/região e/ou país/região).

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Subclasse Hydroidolina Ordem Leptothecata Subordem									
Campanulariida Superfamília									
Campanularioidea									
Bonneviellidae	1/11 1//1	01	<i>Bonneviella regia</i>	AY789805	AY789740		818AS	Ilhas Aleutas	EUA
Campanulariidae	10/135 6//7	02	<i>Clytia hemisphaerica</i>	AY789814	AY789753	FJ550457	826NS	Lister Ley	Dinamarca
		03	<i>Gonothyrea loveni</i>	lem	lem	lem	no ID	Villefranche-sur-Mer	França
		04	<i>Laomedea calceolifera</i>	AY789829	AY789768	FJ550447	MZUSP:1845	Maine	EUA
		05	<i>Obelia geniculata</i>	lem	lem	lem	721MA	Woods Hole	EUA
		06	<i>Orthopyxis integra</i>	lem	lem	lem	MHNGINVE:37296	Herquemoulin	França
		07	<i>Orthopyxis sargassicola</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1866	Maine	EUA
		08	<i>Silicularia rosea</i>	FJ550482	FJ550549	FJ550406	MZUSP:4107	Santa Catarina	Brasil
							MZUSP:4247	Santa Catarina	Brasil
							MHNGINVE:25072	Wellington Harbour	Nova Zelândia
Subordem Haleciida Superfamília Halecioidea Haleciidae									
	3/145 3//6	09	<i>Halecium halecinum</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1782	Massachusetts	EUA
		10	<i>Halecium incertus</i>	FN424124	lem	lem	IB_USP_LEM_150	Mar de Ross	Antártica

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
		11	<i>Halecium labrosum</i>	AY787916	FJ550550	FJ550407	MHNGINVE:29030	Gardur	Islândia
		12	<i>Halecium muricatum</i>	AY787915	EU272619	FJ550408	MHNGINVE:29028	Gardur	Islândia
		13	<i>Hydrodendron mirabile</i>	DQ855933	FJ550568	FJ550425	MHNGINVE:34779	Cantábria	Espanha
		14	<i>Nemalecium lighti</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S17	São Paulo	Brasil
Subordem									
Plumulariida									
Superfamília									
Sertularioidea									
Sertulariidae	29/572 11//15	15	<i>Abietinaria filicula</i>	FJ550485	FJ550555	FJ550412	MHNGINVE:29947	Gardur	Islândia
		16	<i>Antarctoscyphus grandis</i>	FN424139	lem	lem_2/5	IB_USP_LEM_46A	Mar de Ross	Antártica
		17	<i>Antarctoscyphus spiralis</i>	FN424140	lem	lem	IB_USP_LEM_S151	Ilha Low	Antártica
		18	<i>Amphisbetia minima</i>	AY787903	EU272602	EU272544	MHNGINVE:25071	Devonport	Nova Zelândia
		19	<i>Amphisbetia operculata</i>	FJ550489	FJ550561	FJ550418	MHNGINVE:34014	Simon's Town	África do Sul
		20	<i>Diphasia fallax</i>	AY787901	EU305491	FJ550414	MHNGINVE:29950	Gardur	Islândia
		21	<i>Dynamena moluccana</i>	FJ550494	FJ550572	FJ550429	no ID	Ilha Bunaken	Tailândia
		22	<i>Hydrallmania falcata</i>	FJ550487	FJ550559	EU305519	MHNGINVE:29948	Gardur	Islândia
		23	<i>Sertularella africana</i>	FJ550490	FJ550563	FJ550420	MHNGINVE:34017	Simon's Town	África do Sul
		24	<i>Sertularelloides cylindritheca</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1677	Alagoas	Brasil
		25	<i>Sertularia turbinata</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1704	Alagoas	Brasil
		26	<i>Symplectoscyphus glacialis</i>	FN424148	lem	lem	IB_USP_LEM_S153	Ilha Low	Antártica
		27	<i>Symplectoscyphus exochus</i>	FN424147	lem	lem	IB_USP_LEM_S123	Ilha Low	Antártica
		28	<i>Symplectoscyphus turgidus</i>	FJ550462	FJ550524	FJ550377	MHNGINVE:29467	Califórnia	EUA
		29	<i>Thuiaria thuja</i>	AY787908	EU305503	EU305536	MHNGINVE:29951	Sandgerdi	Islândia
Thyrosocyphidae	5/8 1//1	30	<i>Thyrosocyphus marginatus</i>	FJ550495	FJ550573	FJ550430	MHNGINVE:35477	no ID	Honduras
Superfamília									
Plumularioidea									
Aglaopheniidae	12/246 6//7	31	<i>Aglaophenia elongata</i>	FJ550508	FJ550593	FJ550450	MHNGINVE:37539	Ilha de Giglio	Itália
		32	<i>Aglaophenia rhynchocarpa</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1656	Alagoas	Brasil
		33	<i>Cladocarpus integer</i>	FJ550512	FJ550597	FJ550453	MHNGINVE:48754	Raunefjorden	Noruega
		34	<i>Gymnangium gracilicaule</i>	DQ855934	FJ550585	FJ550442	MHNGINVE:36839	Nosy Ranj	Madagascar
		35	<i>Lytocarpia</i> sp.	FJ550505	FJ550591	FJ550448	MHNGINVE:36828	Sakatia	Madagascar
		36	<i>Macrorhynchia phoenicea</i>	DQ855935	FJ550584	FJ550441	MHNGINVE:36813	Sakatia	Madagascar
		37	<i>Thecocarpus canepa</i> *	lem	lem	lem_4/5	IB_USP_LEM_S139	Rio Negro	Argentina
Kirchenpaueriidae	6/46 2//2	38	<i>Kirchenpaueria pinnata</i> *	DQ855923	FJ550581	FJ550438	MHNGINVE:36296	Roscoff	França
		39	<i>Oswaldella grandis</i>	FN424139	lem	lem	IB_USP_LEM_13A	Ilha Livingston	Antártica
Plumulariidae	9/151 3//5	40	<i>Dentitheca bidentata</i>	lem	lem	lem	MZUSP1731	Alagoas	Brasil
		41	<i>Nemertesia antennina</i>	AY787910	EU305498	EU305523	MHNGINVE:29954	Roscoff	França
		42	<i>Plumularia margaretta</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1734	Alagoas	Brasil

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Halopterididae	13/95 3//4	43	<i>Plumularia obliqua</i>	DQ855929	FJ550544	FJ550401	no ID	Banyuls-sur-Mer	França
		44	<i>Plumularia spiralis</i>	AY787920	FJ550569	FJ550426	MHNGINVE:32600	Koh Bida Nok	Tailândia
		45	<i>Antennella kiwiana</i>	DQ855918	FJ550534	FJ550389	MHNGINVE:33623	Devonport	Nova Zelândia
		46	<i>Halopteris carinata</i>	lem	lem	lem	<b>MZUSP:1681</b>	Alagoas	Brasil
		47	<i>Halopteris liechtensternii</i>	AY787888	FJ550526	FJ550379	MHNGINVE:30116	Maiorca	Espanha
Schizotrichidae*	1/21 1//1	48	<i>Monostaechas quadridens</i>	lem	lem	lem	<b>MZUSP:4632</b>	Santa Catarina	Brasil
		49	<i>Schizotricha crassa</i>	FN424125	lem	lem	<b>IB_USP_LEM_S162</b>	Ilha Low	Antártica
Subordem									
Lafoeida									
Superfamília									
Lafoeioidea									
Lafoeidae	9/124 2//2	50	<i>Billardia subrufa</i>	lem	lem	lem	<b>IB_USP_LEM_S124</b>	Península Antártica	Antártica
		51	<i>Lafoea dumosa</i>	lem	lem	lem	<b>IB_USP_LEM_27A</b>	Península Antártica	Antártica
Hebellidae	5/32 2//2	52	<i>Anthohebella parasitica</i>	AY787918	EU272603	EU272545	MHNGINVE:29762	Maiorca	Espanha
		53	<i>Hebella venusta</i>	FJ550496	FJ550574	FJ550431	MHNGINVE:35476	no ID	Honduras
Subordem									
Campanulinida									
Superfamília									
Campanulinoidea									
Campanulinidae	10/34 4//5	54	<i>Calycella syringa</i>	AY789833	AY789776	FJ550372	664MA	Woods Hole	EUA
							no ID	Roscoff	França
		55	<i>Campanulina panicula</i>	FJ550511	FJ550596	FJ550452	MHNGINVE:48748	Korsfjord	Noruega
		56	<i>Campanulina pumila*</i>	AY789834	AY789777		781MA	Woods Hole	EUA
		57	<i>Opercularella lacerata</i>	lem	lem	lem_4/5	<b>MZUSP:1848</b>	Maine	EUA
		58	<i>Stegella lobata</i>	FN424119	AY789778		no ID	Ilha de Pedro I	Antártica
							641AN	Península Antártica	Antártica
Superfamília									
Laodiceoidea									
Laodiceidae	8/46 2//2	59	<i>Melicertissa</i> sp.	AY512515	AF358075	AY920798	no ID	no ID	Guam
							no ID	no ID	no ID
		60	<i>Staurodiscus gotoi</i>	FJ550472	FJ550535	FJ550391	MHNGINVE:33467	Devonport	Nova Zelândia
Tiarannidae	5/12 2//2	61	<i>Modeeria rotunda</i>	FJ550476	FJ550540	FJ550396	MHNGINVE:32967	Banyuls-sur-Mer	França
		62	<i>Stegopoma plicatile</i>	FJ550513	FJ550598	FJ550454	MHNGINVE:48755	Raunefjorden	Noruega
Tiaropsidae	3/10 2//2	63	<i>Tiaropsidium kelseyi</i>	AY512517	AF358079	EU305537	AGC1033	California	EUA
		64	<i>Tiaropsis multicirrata</i>	FJ550468	FJ550531	FJ550386	no ID	Sandgerdi	Islândia
Superfamília									
Dipleurosomatoidea									

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Melicertidae	4/8 1//1	65	<i>Melicertum octocostatum</i>	FJ550510	FJ550595	FJ550451	MHNGINVE:48744 Meoc01	Raunefjorden no ID	Noruega no ID
Superfamília									
Mitrocomoidea									
Mitrocomidae	7/23 1//1	66	<i>Mitrocomella niwai</i>	FJ550473	FJ550536	FJ550392	no ID	Devonport	Nova Zelândia
Superfamília									
Eirenoidea									
Eirenidae	10/73 2//3	67	<i>Eirene viridula</i>	FJ550502	FJ550588	FJ550445	no ID	Luc-sur-mer	França
		68	<i>Eutima curva</i>	FJ550514	FJ550599	FJ550455	MHNGINVE:33468	Devonport	Nova Zelândia
		69	<i>Eutima gegenbauri</i>	FJ550515	FJ550600	FJ550456	MHNG INVE31748	Villefranche-sur-Mer	França
Superfamília									
Lovennelloidea									
Lovenellidae	5/40 3//4	70	<i>Eucheilota maculata</i>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>IB_USP_LEM_S132</b>	São Sebastião	Brasil
		71	<i>Eucheilota menoni</i>	FJ550493	FJ550570	FJ550427	MHNGINVE:33457	Ilha Motutapu	Nova Zelândia
		72	<i>Hydranthea margarica</i>	DQ855932	FJ550567	FJ550424	no ID	Andaluzia	Espanha
		73	<i>Lovenella gracilis</i>	AY789830	AY789773		848NJ	Nova Jérsei	EUA
Superfamília									
Campanulinoidea									
Malagazziidae	3/20 1//1	74	<i>Octophialucium indicum</i>	AY787897	EU272626	EU272577	MHNGINVE:29970	Wellington Harbour	Nova Zelândia
Aequoreidae	5/12 2//3	75	<i>Aequorea forskalea*</i>	AY512518	AF358076	EU305505	no ID	Woods Hole	EUA
		76	<i>Aequorea victoria</i>	EU305469	AF358077	AY920799	no ID	no ID	no ID
		77	<i>Rhacostoma atlanticum</i>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>IB_USP_LEM_S65</b>	São Sebastião	Brasil
Blackfordiidae	1/3 1//1	78	<i>Blackfordia virginica</i>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>IB_USP_LEM_S42</b>	Santa Catarina	Brasil
Phialellidae	2/12 1//1	79	<i>Phialella quadrata</i>	FJ550474	FJ550537	FJ550393	MHNGINVE:33466	Whangaparoa	Nova Zelândia
Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Ordem									
“Anthoathecata”									
Subordem									
Capitata									
Corynidae	13/55 5//6	80	<i>Dipurena ophiogaster</i>	EU305473	EU272615	EU272560	MHNGINVE:32963	Banyuls-sur-Mer	França
		81	<i>Coryne eximia</i>	AJ878713	GQ424325	GQ424296	MHNGINVE:34009	Langebaan	África do Sul
		82	<i>Coryne pintneri</i>	AJ878717	GQ424330	GQ424303	MHNGINVE:31976	Villefranche-sur-Mer	França
		83	<i>Polyorchis haplus</i>	AY512549	GQ424344	GQ424317	no ID	California	EUA
							no ID	Califórnia	EUA
		84	<i>Sarsia lovenii</i>	GQ395329	GQ424337	GQ395329	MHNGINVE:48736	Raunefjorden	Noruega
		85	<i>Scripps pacifica</i>	AY512551	AF358091	AY920804	no ID	San Diego	EUA



Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
							no ID	no ID	no ID
Cladocorynidae	2/7 1//1	86	<i>Cladocoryne floccosa</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S40	Santa Catarina	Brasil
Cladonematidae	3/19 2//2	87	<i>Staurocladia wellingtoni</i>	EU876550	GQ424323	EU876550	MHNGINVE:25379	Wellington Harbour	Nova Zelândia
		88	<i>Eleutheria claparedii*</i>	AM088486	GQ424320	GQ424292	MHNGINVE:49494	Roscoff	França
							MHNG INVE34228	Roscoff	França
Hydrocorynidae	2/5 1//1	89	<i>Hydrocoryne iemanja</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S13	Espírito Santo	Brasil
Moerisiidae	3/10 2//2	90	<i>Moerisia inkermanica</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S41	Santa Catarina	Brasil
		91	<i>Odessia maeotica</i>	GQ395324	GQ424341	GQ424314	MHNGINVE:53642	Portiragnes	França
Pennariidae	1/5 1//1	92	<i>Pennaria disticha</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1670	Alagoas	Brasil
Porpitidae	2/3 2//2	93	<i>Porpita porpita</i>	AY935322	GQ424319	EU883551	no ID	Ilha Cerralvo	México
							no ID	no ID	no ID
		94	<i>Velella velella</i>	EU305487	EU876576	EU305487	no ID	Villefranche-sur-Mer	França
Solanderiidae	1/7 1//1	95	<i>Solanderia ericopsis</i>	AY512530	EU272636	EU272593	MHNGINVE:29593	Leigh	Nova Zelândia
Sphaerocorynidae	2/5 1//1	96	<i>Sphaerocoryne agassizii</i>	GQ395323		GQ424318	no ID	Flórida	EUA
Zanclidae	3/40 1//1	97	<i>Zanclaea prolifera</i>	EU305488	EU272639	EU272598	no ID	no ID	no ID
Subordem									
Aplanulata									
Candelabridae	3/18 1//1	98	<i>Candelabrum cocksii</i>	AY512520	AY920758	AY920796	MHNGINVE:29591	Roscoff	França
							no ID	Roscoff	França
Corymorphidae	11/75 1//2	99	<i>Corymorpha pendula</i>	EU876538	EU876565	EU879936	KUNHM:2962	Maine	EUA
		100	<i>Corymorpha bigelowi</i>	EU448099	EU272618	EU272563	KUNHM:2829	Wakayama	Japão
Hydridae	1/40 1//1	101	<i>Hydra circumcincta</i>	GU722769	EU876568	EU879939	DMAK13c	Alasca	EUA
Tubulariidae	7/68 2//5	102	<i>Ectopleura dumortierii</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S08	São Sebastião	Brasil
		103	<i>Ectopleura obypa</i>	lem	lem	lem	MZUSP:0257	São Sebastião	Brasil
		104	<i>Ectopleura larynx*</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1807	Maine	EUA
		105	<i>Ralpharia gorgoniae</i>	EU305482	EU272633	EU272590	KUNHM:2778	Bocas del Toro	Panamá
		106	<i>Ralpharia sanctisebastiani</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S101	São Sebastião	Brasil
Subordem									
Filifera I									
Eudendriidae	2/75 1//7	107	<i>Eudendrium racemosum</i>	AY787896	EU272617	EU272562	Sch75	Banyuls-sur-mer	França
		108	<i>Eudendrium glomeratum</i>	AM991301	lem	lem	IB_USP_LEM_S58	Gênova	Itália
								Marselha	França
		109	<i>Eudendrium californicum</i>	EU305475	EU305492	EU305475	KUNHM:2850	no ID	no ID
		110	<i>Eudendrium capillare</i>	EU305476		EU305514	KUNHM:2625	no ID	no ID
		111	<i>Eudendrium caraiuru</i>		lem	lem	IB_USP_LEM_S105	São Sebastião	Brasil
		112	<i>Eudendrium pocaruquarum</i>			lem_3/5	MZUSP:0205	São Sebastião	Brasil
		113	<i>Eudendrium carneum</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1700	Alagoas	Brasil

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Subordem									
Filifera II									
		114	<i>Brinckmannia hexactinellidophila</i>	AM183123	EU272607	EU272550	MHNGINVE:38148	Columbia Britânica	Canadá
	5/9 1//1	115	<i>Hydrichthella epigorgia</i>	EU305478	EU272622	EU272569	KUNHM:2665	no ID	no ID
	1/9 1//1	116	<i>Proboscidactyla ornata</i>	EU305481	EU272631	EU272587	KUNHM:2767	no ID	no ID
	3/4 1//1	117	<i>Fabienna sphaerica</i>	AM183133	AY920767	AY920797	MHNGINVE:33453	Golfo do Hauraki	Nova Zelândia
Subordem									
Filifera III									
	13/113 4//6	118	<i>Clava multicornis</i>	EU305471	EU272609	EU272552	Sch104	Roscoff	França
							LEM_S97	Maine	EUA
		119	<i>Clavactinia gallensis</i>	EU305471	EU272609	EU272553	MHNGINVE:33470	Golfo de Siam	Tailândia
		120	<i>Hydractinia</i> sp. Brasil	lem	lem	lem	MZUSP:5293	Santa Catarina	Brasil
		121	<i>Hydractinia</i> sp. Chile	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S104	no ID	Chile
		122	<i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	FJ214380	EU272621	EU272568	L. Buss #3388	Beaufort	EUA
							no ID	Woods Hole	EUA
		123	<i>Podocoryna exigua</i>	FJ214481	AF358092	AY920802	no ID	Banyuls-sur-Mer	França
							no ID	no ID	no ID
							Schuchert #N3	Nápoles	Itália
	28/281 3//3	124	<i>Adelopora crassilabrum</i>	EU645356	EU272642	EU272541	USNM:1027760	no ID	Nova Caledônia
		125	<i>Conopora anthohelia</i>	EU645268	EU645429	EU305509	USNM:1027755	Norfolk Ridge	Nova Caledônia
		126	<i>Lepidopora microstylus</i>	EU645329	EU272644	EU272572	USNM:1027724	no ID	Nova Caledônia
Subordem									
Filifera IV									
	15/99 5/7	127	<i>Bimeria vestita</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1651	Alagoas	Brasil
		128	<i>Bougainvillia carolinensis</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S03	São Sebastião	Brasil
		129	<i>Bougainvillia muscus</i>	lem	lem	lem	MZUSP:4104	Santa Catarina	Brasil
		130	<i>Dicoryne conybeari</i>	AM183141	EU272614		MHNGINVE:32949	Banyuls-sur-mer	França
		131	<i>Garveia grisea</i>	AM183131	EU272632	EU272588	MHNGINVE:34436	Calanque du Port d'Alon	França
		132	<i>Pachycordyle pusilla</i>	AM183132	EU272627	EU272579	MHNGINVE:32953	Banyuls-sur-Mer	França
		133	<i>Pachycordyle michaeli</i>	lem	lem	lem	MZUSP:1831	Maine	EUA
	3/17 1//1	134	<i>Perarella schneideri</i>	AM411414	HM357626	HM357628	MHNGINVE:49086	Gênova	Itália
	21/87 3//3	135	<i>Hydrichthys boycei</i>	EU448102	EU305496	EU272570	MHNGINVE:37417	no ID	no ID
		136	<i>Leuckartiara octona</i>	AM411421	EU272624	AM411421	no ID	Villefranche-sur-Mer	França
							Leoc01	Maine	EUA
		137	<i>Neoturris brevicornis</i>	EU448103	EU448097	EU448103	no ID	Friday Harbor	EUA
	1/3 1//1	138	<i>Cordylophora caspia</i>	EU305472	EU272612	EU272556	no ID	Etang de Canet	França
	7/27 2//3	139	<i>Rhizogeton nudus</i>	AY787883	EU272635	EU272592	MHNGINVE:35757	no ID	no ID

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
		140	<i>Turritopsis nutricula</i>	lem	lem	lem	MHNGINVE:29022	Keflavic	Islândia
		141	<i>Turritopsis dohrnii</i>	AY787889	EU272638	EU272596	<b>MZUSP:4093</b>	Santa Catarina	Brasil
Rathkeidae	5/14 2//2	142	<i>Lizzia blondina</i>	AM411417	EU272625	EU272574	MHNGINVE:29753	Maiorca	Espanha
		143	<i>Rathkea octopunctata</i>	EU305483	EU272634	EU272591	Sch493	Roscoff	França
							KUMIP:314321	no ID	no ID
Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Ordem									
Siphonophorae									
Subordem									
Calycophorae									
Diphyidae	9/49 1//1	144	<i>Muggiaea atlantica</i>	AY935295	AY937337		no ID	no ID	NO O. Pacífico
							IOCAS:36028	no ID	China
Hippopodiidae	2/5 1//1	145	<i>Hippopodius hippopus</i>	AY935314	AY937341	EU305517	YPM:35045	no ID	NO O. Atlântico
							Hy27.2	Mar dos Sargaços	N O. Atlântico
Prayidae	13/26 1//1	146	<i>Praya dubia</i>	AY935285	AY937326	AY935285	YPM:35346	Califórnia	EUA
Subordem									
Physonectae									
Apolemiidae	1/5 1//1	147	<i>Apolemia</i> sp. CWD-2005	AY935290	AY937331	EU272546	YPM:35090	no ID	O.o Pacífico
							Hy100.1	Mar dos Sargaços	N O. Atlântico
Erennidae	2/4 1//1	148	<i>Erenna</i> sp.	AY935319	AY937361	EU305512	YPM:35362	no ID	México
							Hy17.2.1	Mar dos Sargaços	N. O. Atlântico
Physophoridae	1/2 1//1	149	<i>Physophora hydrostatica</i>	AY93531	AY935300	EU272582	YPM:35046	no ID	NO O. Atlântico
							no ID	Maine	EUA
Subordem									
Cystonectae									
Physaliidae	1/1 1//1	150	<i>Physalia physalis</i>	AY935284	AY358065	EU448095	YPM:35345	Nova Jérsei	EUA
Agalmatidae	11/23 1//1	151	<i>Cordagalma ordinata*</i>	AY935275	AY937317	EU272555	YPM:35032	no ID	NO O. Atlântico
Forskaliidae	1/5 1//1	152	<i>Forskalia edwardsi</i>	AY935278	AY937354	EU305516	YPM:35036	no ID	NO O. Atlântico
Rhodaliidae	8/13 1//1	153	<i>Stephalia dilata</i>	AY935315	AY937357	EU305534	YPM:35358	Ilha Cerralvo	México
Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
Subclasse									
Trachylina									
Superfamília									
Narcomedusae									
Aeginidae	8/10 2//2	154	<i>Aegina citrea</i>	EU293997	AF358058	AY920789	no ID	Califórnia	EUA

Taxa / Categoria	Gên/Esp Gên//Esp	nro	Espécie	16S info	18S info	28S info	Voucher	Localidade/Região	País/Região
		155	<i>Solmundella bitentaculata</i>	EU293998	EU247812	EU247795	AGC 1045 MHNGINVE:31746 USNM:1107456	no ID no ID Baía Marguerite	no ID no ID Antártica
Superfamília									
Trachymedusae									
Cuninidae	3/17 3//3	156	<i>Cunina octonaria</i>		lem_4/5	lem	IB_USP_LEM_S15	São Sebastião	Brasil
		157	<i>Sigiweddellia</i> sp.	EU293996		EU247796	no ID	no ID	Japão
		158	<i>Solmissus marshalli</i>	EU294001	AF35806	AY920790	no ID	Califórnia	EUA
Geryoniidae	4/4 1//2	159	<i>Geryonia proboscidalis</i>	EU293979	EU247816	EU247807	JAMSTEC RB- BWD-4	no ID	Japão
		160	<i>Liriope tetraphylla</i>	lem	lem	lem_4/5	IB_USP_LEM_S10	São Sebastião	Brasil
Rhopalonematidae	15/35 5//5	161	<i>Aglaura hemistoma</i>	EU293984	EU247821	AY920791	MHNGINVE:31745 KUMIP 314323	no ID no ID	no ID Japão
		162	<i>Aglantha digitale</i>	EU293985	EU247821	AY920791	USNM:1073329	Friday Harbor	EUA
							no ID	no ID	no ID
		163	<i>Crossota rufobrunnea</i>	EU293986	EU247824	EU247800	JAMSTEC I060319b-N4	no ID	Japão
		164	<i>Pantachogon haeckeli</i>	EU293988	AF358062	AY920792	MBARI-T981 SS1	no ID	no ID
							no ID	no ID	no ID
		165	<i>Rhopalonema velatum</i>	EU293992	EU247819	EU247804	no ID	Villefranche-sur-Mer	França
Halicreatidae	6/9 1//1	166	<i>Botrynema brucei</i>	EU293982	EU247822	EU247798	no ID	no ID	Japão
Superfamília									
Limnomedusae									
Olindiidae	17/45 4//4	167	<i>Aglauropsis aeora</i>	EU293973	AY920754	AY920793	no ID	Califórnia	EUA
		168	<i>Limnocnida tanganjicae</i> *	EU293972	AY920755	AY920795	no ID	no ID	Tanzânia
		169	<i>Maeotias marginata</i>	AY512508	AF358056	EU247810	no ID	Califórnia	EUA
		170	<i>Olindias sambaquiensis</i>	lem	lem	lem	IB_USP_LEM_S01	São Sebastião	Brasil
<b>TOTAL Leptothecata</b>		<b>79</b>		<b>79</b>	<b>79</b>	<b>75</b>			
<b>TOTAL Anthoathecata</b>		<b>64</b>		<b>62</b>	<b>61</b>	<b>63</b>			
<b>TOTAL Siphonophorae</b>		<b>10</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>9</b>			
<b>TOTAL Trachylina</b>		<b>17</b>		<b>16</b>	<b>16</b>	<b>17</b>			
<b>TOTAL HYDROZOA</b>		<b>170</b>		<b>167</b>	<b>166</b>	<b>164</b>			

Tabela Suplementar 2 - Informação de *primers* utilizados na geração de sequências nucleotídicas (marcadores moleculares) pela técnica de PCR, considerando genoma de origem (nuclear: genes 18S e 28S, mitocondrial: 16S). Destacam-se aqueles *primers* desenvolvidos pelos membros do Laboratório de Evolução Marinha (LEM lab, informações em negrito). Outros códigos: *f/r*= *primer forward* ou *reverse* *tm*= temperatura de *annealing*; GB= código GenBank das sequências de referência, utilizadas para o mapeamento da posição relativa de aparelhamento dos *primers* com as regiões de DNA dos genes de interesse, nas reações de PCR; CNIDToL lab= *Primers* gerados pelos membros do projeto Cnidaria Tree of Life (EUA).

<b>primers MARCADORES MOLECULARES NUCLEARES</b>					
<b>Gene: 28S</b>	<b>Sequência <i>primer</i> 5'-3'</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de <i>primers</i> (GB: GU722663)</b> <b><i>Hydra circumcincta</i> (Hydrozoa; Medusozoa)</b>
<b>Nome <i>primer</i></b>					
F63 mod	ACCCGCTGAAYTTAAGCATATHANTMAG	f	55°C - 28pb	Medina et al. (2001)	ITS-2 --- 28S start
<b>F15</b>	<b>CTAACAAGGATCCCCTAGTAACGGCGAGT</b>	<b>f</b>	<b>62°C - 30pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>15-44</b>
F97	CCYYAGTAACGGCGAGT	f	50°C - 17pb	CNIDToL lab	28-44
F798	CCGTCTTGAAACACGGACC	f	56°C - 19pb	Medina et al. (2001)	785-803
R798	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	r	56°C - 19pb	Medina et al. (2001)	785-803
28SRD4.8A-F	ACCTATTCTCAAACCTTTAAATGG	f	46°C - 26pb	Schwendinger & Giribet (2005)	1207-1229
F1414	GACAGCAGGACGGTGGYCATGG	f	59°C - 22pb	Medina et al. (2001)	1391-1412
R1446	GTTGTTACACACTCCTTAGCGG	r	55°C - 22pb	Medina et al. (2001)	1444-1423
F1586	GTGCAGATCTTGGTDGNAGTAGCAAATATTC	f	60°C - 31pb	Medina et al. (2001)	1598-1628
F1689	CTAAGMSRYAGGGAAAYTC	f	52°C - 19pb	CNIDToL lab	1701-1719
<b>F2103</b>	<b>GATCCGTAACCTCGGGAAAAGGATTGGCTC</b>	<b>f</b>	<b>62°C - 30pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>2103-2132</b>
F2076sq	TAACYTCGGGAWAAGGATTGGCTC	f	55°C - 24pb	Medina et al. (2001)	2109-2132
<b>R2144</b>	<b>GAGCCAATCCTTTTCCGAAGTT</b>	<b>r</b>	<b>57°C - 23pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>2110-2132</b>
R2084	AGAGCCAATCCTTTTCC	r	45°C - 17pb	CNIDToL lab	2130-2146
R2813	CAGRTGTRCCGCCCCAGCCAAACT	r	66°C - 24pb	Medina et al. (2001)	2813-2836
F2813	AGTTTGGCTGGGGCGGYACA	f	65°C - 20pb	Medina et al. (2001)	2813-2836
F2800	GCAGGTGTCCTAAGGYRAGCTC	f	59°C - 22pb	Voigt et al. (2004)	2849-2870
<b>R3214</b>	<b>GTGAATTCTGCTTCACAATGATAGGAAGAGCC</b>	<b>r</b>	<b>60°C - 32pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>3081-3112</b>
R3264	TTCYGACTIONTAGAGGCGTTCAG	r	51°C - 21pb	Medina et al. (2001)	3260-3281
<b>Gene: 18S</b>	<b>Sequência <i>primer</i> 5'-3'</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de <i>primers</i> (GB: Z86108)</b> <b><i>Obelia</i> sp. (Hydrozoa; Medusozoa)</b>
<b>Nome <i>primer</i></b>					
A	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	f	54°C - 21pb	Medlin et al. (1988)	1-21

<b>Gene: 18S</b>	<b>Sequência primer 5'-3'</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de primers (GB: Z86108)</b>
<b>Nome primer</b>					<b><i>Obelia</i> sp. (Hydrozoa; Medusozoa)</b>
18Sini	ATCCTGCCAGTAGTCATA	f	45°C - 18pb	Turbeville et al. (1991)	11-28
554f (GBF)	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	f	62°C - 21pb	Turbeville et al. (1991)	568-588
18S-C	CGGTAATTCCAGCTCCAATAG	f	50°C - 21pb	Apakupakul et al. (1999)	588-608
18S-L	CCAACACTACGAGCTTTTAACTG	r	50°C - 22pb	Apakupakul et al. (1999)	627-648
<b>18S inter (Rv)</b>	<b>GCGAAGAAGAACAGACCGATCAG</b>	<b>r</b>	<b>52°C - 23pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>689-711</b>
18S-O	AAGGGCACCACCAGGAGTGGAG	f	60°C - 22pb	Apakupakul et al. (1999)	1166-1187
18J-5	GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG	f	63°C - 29pb	Hillis & Dixon 1991	1187-1215
1282r (GBR)	TCACTCCACCAACTAAGAACGGC	r	56°C - 23pb	Turbeville et al. (1991)	1293-1315
18S-Y	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	r	54°C - 21pb	Apakupakul et al. (1999)	1303-1323
Rh-18S9R	GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	r	56°C - 23pb	Turbeville et al. (1991)	1811-1833
B	TGATCCTTCCGCAGGTTACCT	r	57°C - 22pb	Medlin et al. (1988)	1814-1835

**primers MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS**

<b>Gene: 16S</b>	<b>Sequência primer 5'-3'</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de primers(GB: DQ787873)</b>
<b>Nome primer</b>					<b><i>Aurelia aurita</i> (Scyphomedusae; Medusozoa)</b>
CB1	TCGACTGTTTACCAAAAACATA	f	60°C - 32pb	Cunningham & Buss (1993)	1028-1049
16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	f	49°C - 20pb	Simon et al. (1991)	1029-1048
SHB	GACTGTTTACCAAAAACATA	f	44°C - 20pb	Schroth et al. (2002)	1030-1049
<b>1 Hyd-Scyph</b>	<b>TGACCGTGDTAADGTAGC</b>	<b>f</b>	<b>50°C -18pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1134-1151</b>
<b>2 Scyhom</b>	<b>CTGTTATCCCTACGGTAAC</b>	<b>r</b>	<b>49°C - 19pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1519-1537</b>
<b>2 Hydrom</b>	<b>CTGTTATCCCTAAGGTAGC</b>	<b>r</b>	<b>49°C - 19pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1519-1537</b>
<b>16S-R-BR</b>	<b>CATAATTCAACATCGAGG</b>	<b>r</b>	<b>45°C - 18pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1581-1598</b>
CB2	ACGGAATGAACTCAAATCATGTAAG	r	52°C - 25pb	Cunningham & Buss (1993)	1652-1676

Tabela Suplementar 3 - Protocolos gerais requeridos para a geração das sequências nucleotídicas do presente trabalho, destacando-se as principais etapas, reagentes e concentrações utilizadas. Apresenta-se também os volumes otimizados para as reações de PCR e BigDye®.

<b>Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</b>	<b>Protocolo</b>																		
Programa básico do termociclador para a PCR (fragmento esperado de aproximadamente 600 pb)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ciclo inicial: <math>T_m = 94^\circ\text{C} / T = 5'</math></li> <li>2. Ciclo de repetição (35 ou 40 ciclos): [<math>T_m = 94^\circ\text{C} / T = 50''</math>]+[<math>T_m = \text{primer} / T = 50''</math>]+[<math>T_m = 72^\circ\text{C} / T = 50''</math>]</li> <li>3. Ciclo final: <math>T_m = 72^\circ\text{C} / T = 7'</math></li> <li>4. Controle de qualidade do produto de PCR: gel de agarose (1,5%) e leitura no NANODROP®</li> <li>5. Conservar a <math>-20^\circ\text{C}</math></li> </ol>																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H<sub>2</sub>O ultra pura</td> <td>14,5 uL</td> </tr> <tr> <td>Tampão <i>Taq</i>: 10X</td> <td>2,5 uL</td> </tr> <tr> <td>dNTPs (combinados): 100 mM</td> <td>1,33 uL</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub>: 3,5 mM</td> <td>3,5 uL</td> </tr> <tr> <td><i>Primers</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>; 0,6 mM de cada)</td> <td>1,5 uL</td> </tr> <tr> <td><i>Taq</i> polimerase 0,8 unidades (5U/ml)</td> <td>0,17 uL</td> </tr> <tr> <td>DNA (~30 ng)</td> <td>1,5 uL</td> </tr> <tr> <td><b>TOTAL volume reação PCR</b></td> <td><b>25 uL</b></td> </tr> </tbody> </table>	Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR	Volume	H <sub>2</sub> O ultra pura	14,5 uL	Tampão <i>Taq</i> : 10X	2,5 uL	dNTPs (combinados): 100 mM	1,33 uL	MgCl <sub>2</sub> : 3,5 mM	3,5 uL	<i>Primers</i> ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ; 0,6 mM de cada)	1,5 uL	<i>Taq</i> polimerase 0,8 unidades (5U/ml)	0,17 uL	DNA (~30 ng)	1,5 uL	<b>TOTAL volume reação PCR</b>	<b>25 uL</b>
Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR	Volume																		
H <sub>2</sub> O ultra pura	14,5 uL																		
Tampão <i>Taq</i> : 10X	2,5 uL																		
dNTPs (combinados): 100 mM	1,33 uL																		
MgCl <sub>2</sub> : 3,5 mM	3,5 uL																		
<i>Primers</i> ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ; 0,6 mM de cada)	1,5 uL																		
<i>Taq</i> polimerase 0,8 unidades (5U/ml)	0,17 uL																		
DNA (~30 ng)	1,5 uL																		
<b>TOTAL volume reação PCR</b>	<b>25 uL</b>																		
<b>Purificação do produto de amplificação</b>	<b>Protocolo resumido</b>																		
Partículas magnéticas AMPure XP® (Agencourt #A63880)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Adicionar 1,8x do volume da PCR de solução AMPure XP; eliminar sobrenadante na cama magnética</li> <li>2. Realizar duas lavagens etanol 70%. Secar a temperatura ambiente por 30'</li> <li>3. Diluição final em 15uL H<sub>2</sub>O ultra pura</li> <li>4. Controle de resultado de PCR: gel agarose 1,25%, marcação com Gel-Red®</li> <li>5. Conservar a <math>-4^\circ\text{C}</math></li> </ol>																		
<b>Reação de Big Dye® (preparação para sequenciamento)</b>	<b>Protocolo resumido</b>																		
Programa termociclador para reação ABI BigDye® (Life Technologies #4336935)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ciclo inicial: <math>T_m = 96^\circ\text{C} / T = 1'</math></li> <li>2. Ciclo de repetição (40 ciclos): [<math>T_m = 96^\circ\text{C} / T = 10''</math>]+[<math>T_m = \text{primer} / T = 5''</math>]+[<math>T_m = 60^\circ\text{C} / T = 4'</math>]</li> <li>3. Conservar a <math>-20^\circ\text{C}</math></li> </ol>																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampão BigDye® Terminator v3.1</td> <td>2 uL</td> </tr> <tr> <td>BigDye® Terminator v3.1</td> <td>1 uL</td> </tr> <tr> <td><i>Primer</i> (F ou R)</td> <td>0,5 uL</td> </tr> <tr> <td>Purificação da PCR (concentração final DNA: 50-70 ng por reação; e.g: 50 ng/uL)</td> <td>1 uL</td> </tr> <tr> <td>H<sub>2</sub>O ultra pura</td> <td>5,5 uL</td> </tr> <tr> <td><b>TOTAL volume reação BigDye®</b></td> <td><b>10 uL</b></td> </tr> </tbody> </table>	Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®	Volume	Tampão BigDye® Terminator v3.1	2 uL	BigDye® Terminator v3.1	1 uL	<i>Primer</i> (F ou R)	0,5 uL	Purificação da PCR (concentração final DNA: 50-70 ng por reação; e.g: 50 ng/uL)	1 uL	H <sub>2</sub> O ultra pura	5,5 uL	<b>TOTAL volume reação BigDye®</b>	<b>10 uL</b>				
Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®	Volume																		
Tampão BigDye® Terminator v3.1	2 uL																		
BigDye® Terminator v3.1	1 uL																		
<i>Primer</i> (F ou R)	0,5 uL																		
Purificação da PCR (concentração final DNA: 50-70 ng por reação; e.g: 50 ng/uL)	1 uL																		
H <sub>2</sub> O ultra pura	5,5 uL																		
<b>TOTAL volume reação BigDye®</b>	<b>10 uL</b>																		

<b>Precipitação do produto da reação de Big Dye®</b>	<b>Protocolo resumido</b>
	1. Adicionar 80ul do mix de precipitação para cada produto de reação de BigDye®. Ultracentrifugação
<b>Precipitação do produto da reação de Big Dye®</b>	<b>Protocolo resumido</b>
	2. Eliminar sobrenadante; realizar duas lavagens em etanol 70%. Secar a 95°C por 3'; conservar a -20°C.
<b>Análise das sequências obtidas no Sequenciador ABI® 3730 DNA Analyser</b>	<b>Software</b>
Análise de arquivos .abi, e geração de contigs (formato final: genbank .gb)	Geneious® 5.3.3



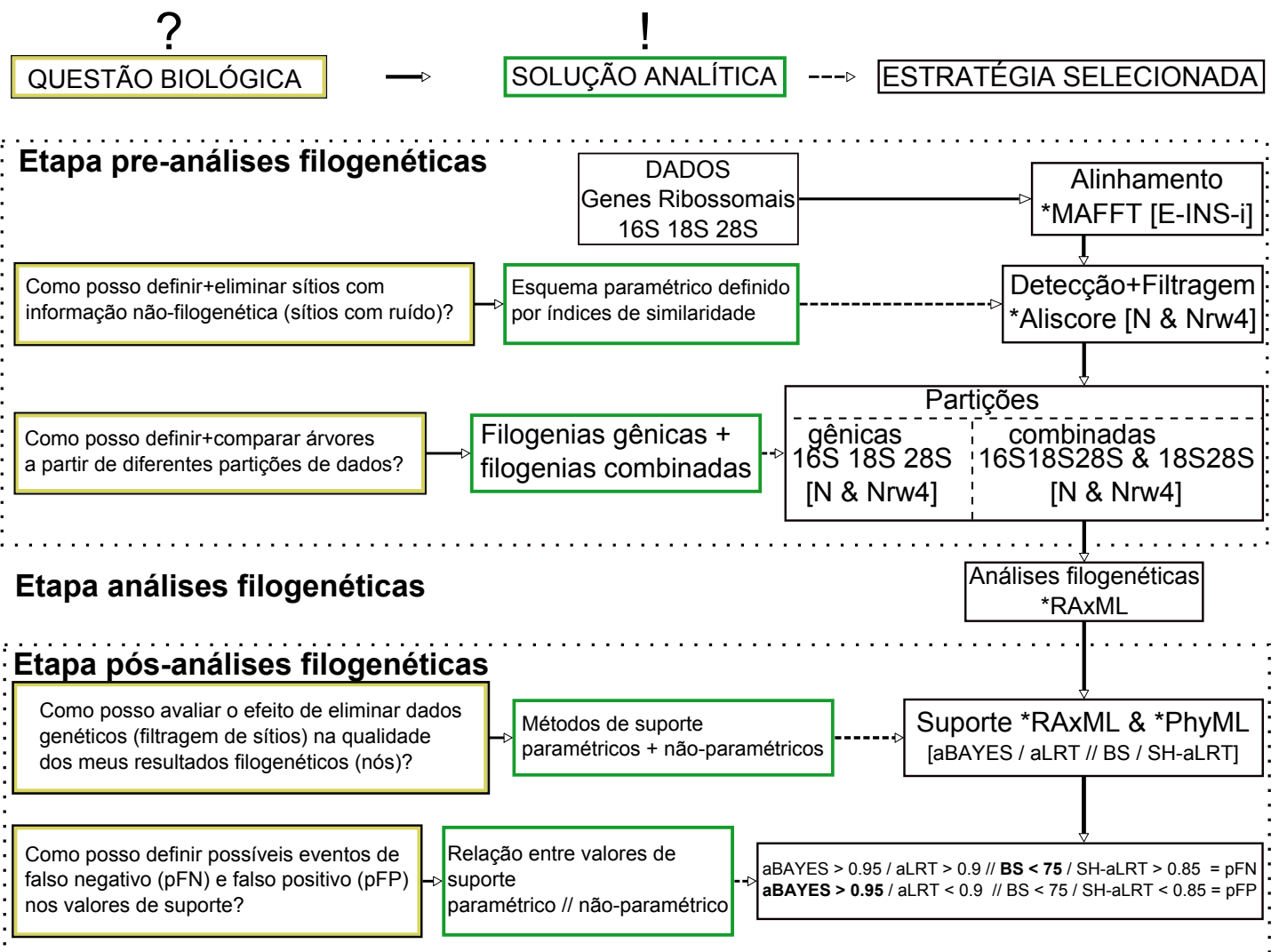


Figura Suplementar 1 - Diagrama de fluxo relacionando as questões biológicas consideradas nas análises, a solução analítica proposta e a estratégia aplicada para cada etapa, considerando os programas utilizados (símbolos \*) e os parâmetros aplicados em cada caso (símbolos [ ]).

# Hydrozoa 16S

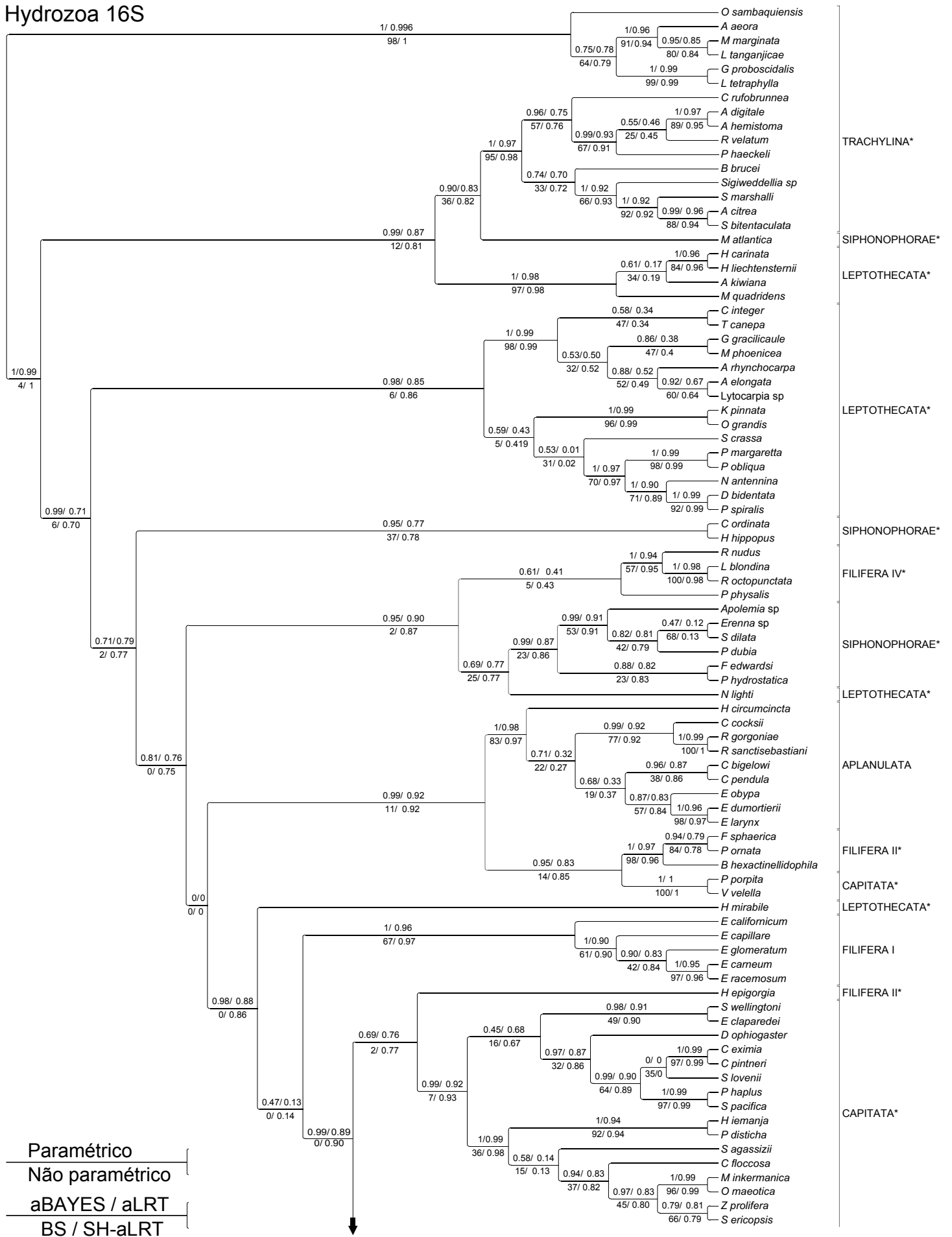


Figura Suplementar 2 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa sem filtragem de dados do marcador 16S (matriz 16S). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

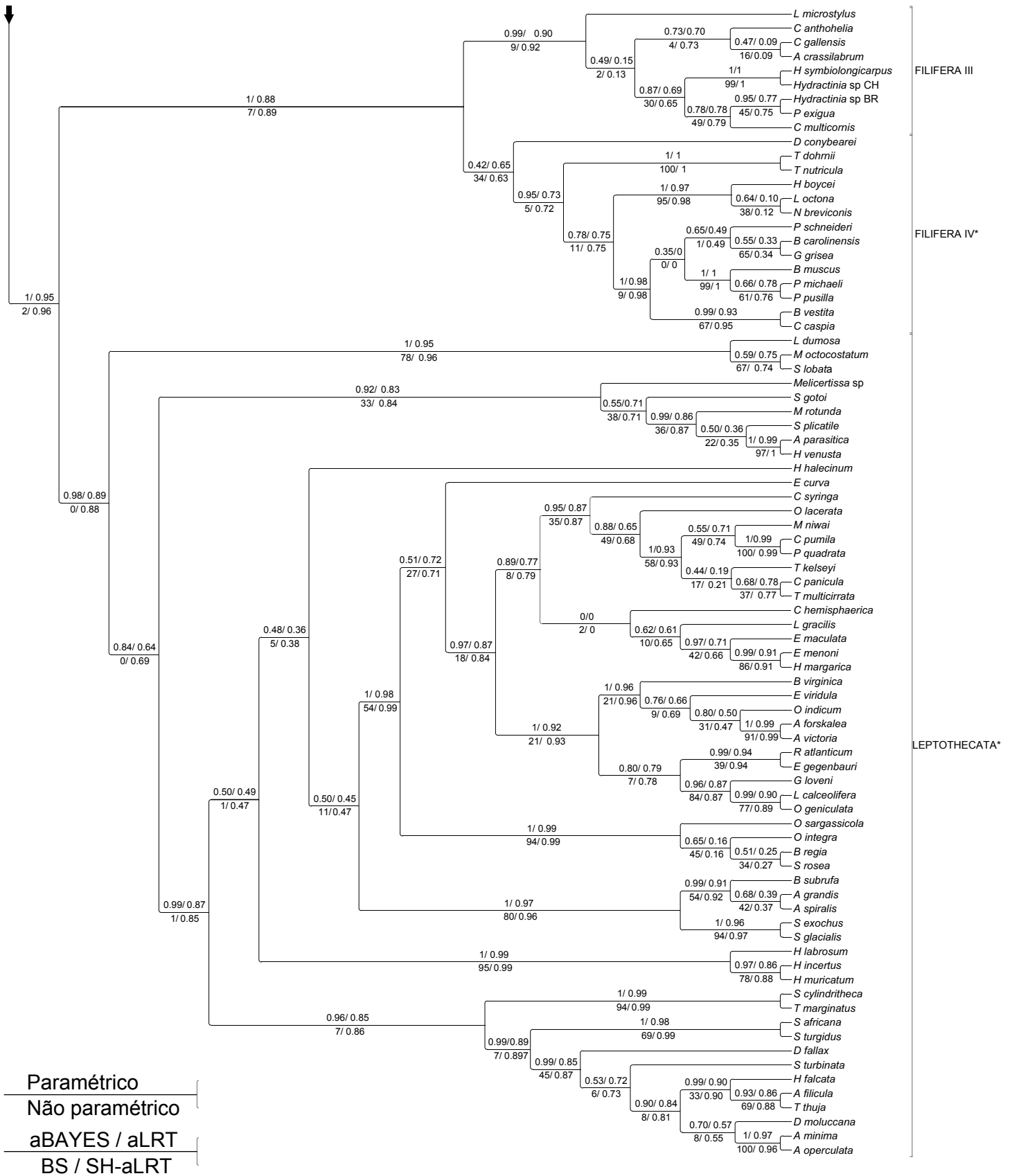


Figura Suplementar 2 (continuação)

# Hydrozoa 16S\_N

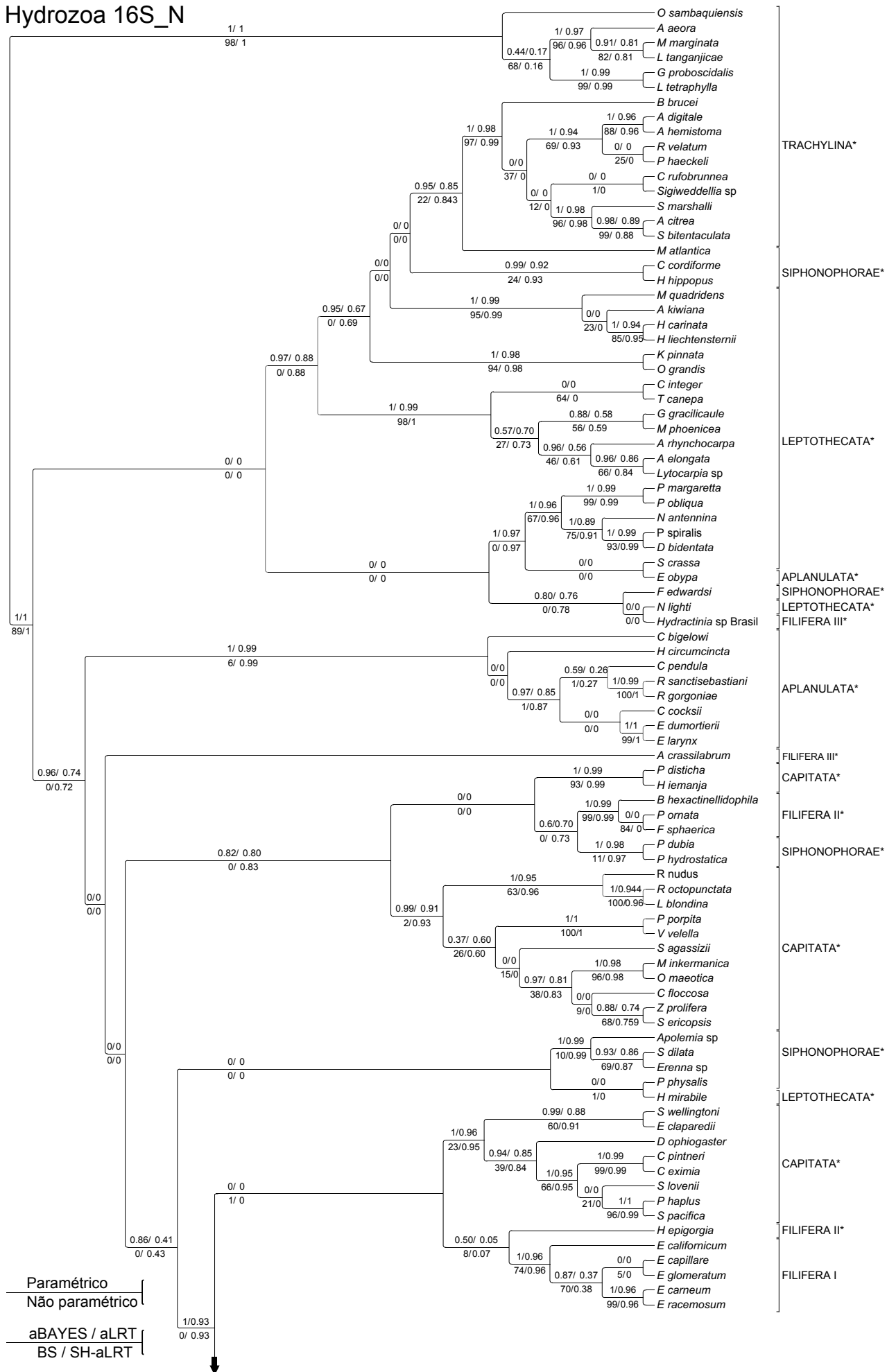


Figura Suplementar 3 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados do marcador 16S (matriz 16S\_N). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

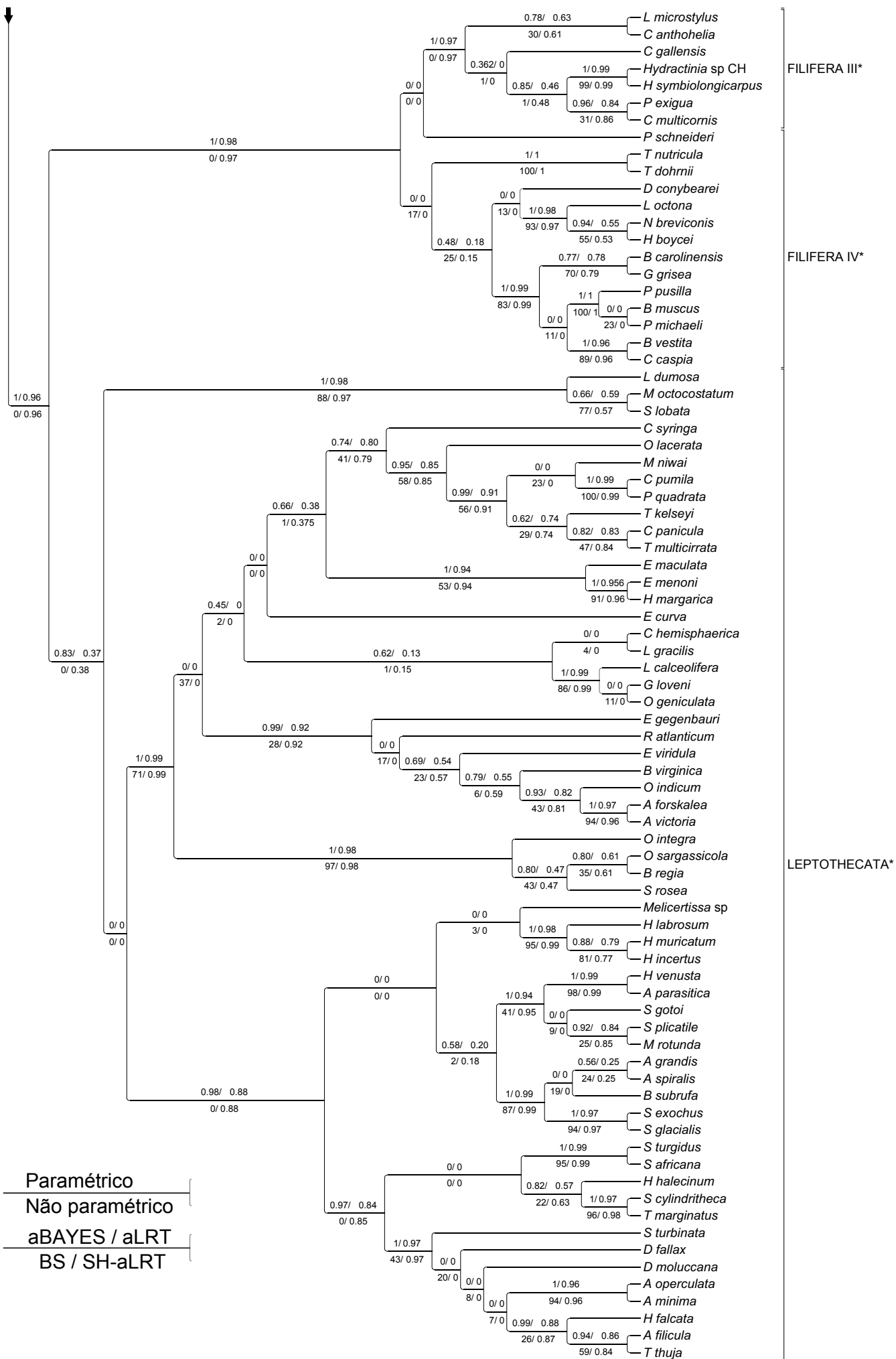


Figura Suplementar 3 (continuação)

# Hydrozoa 16S\_Nrw4

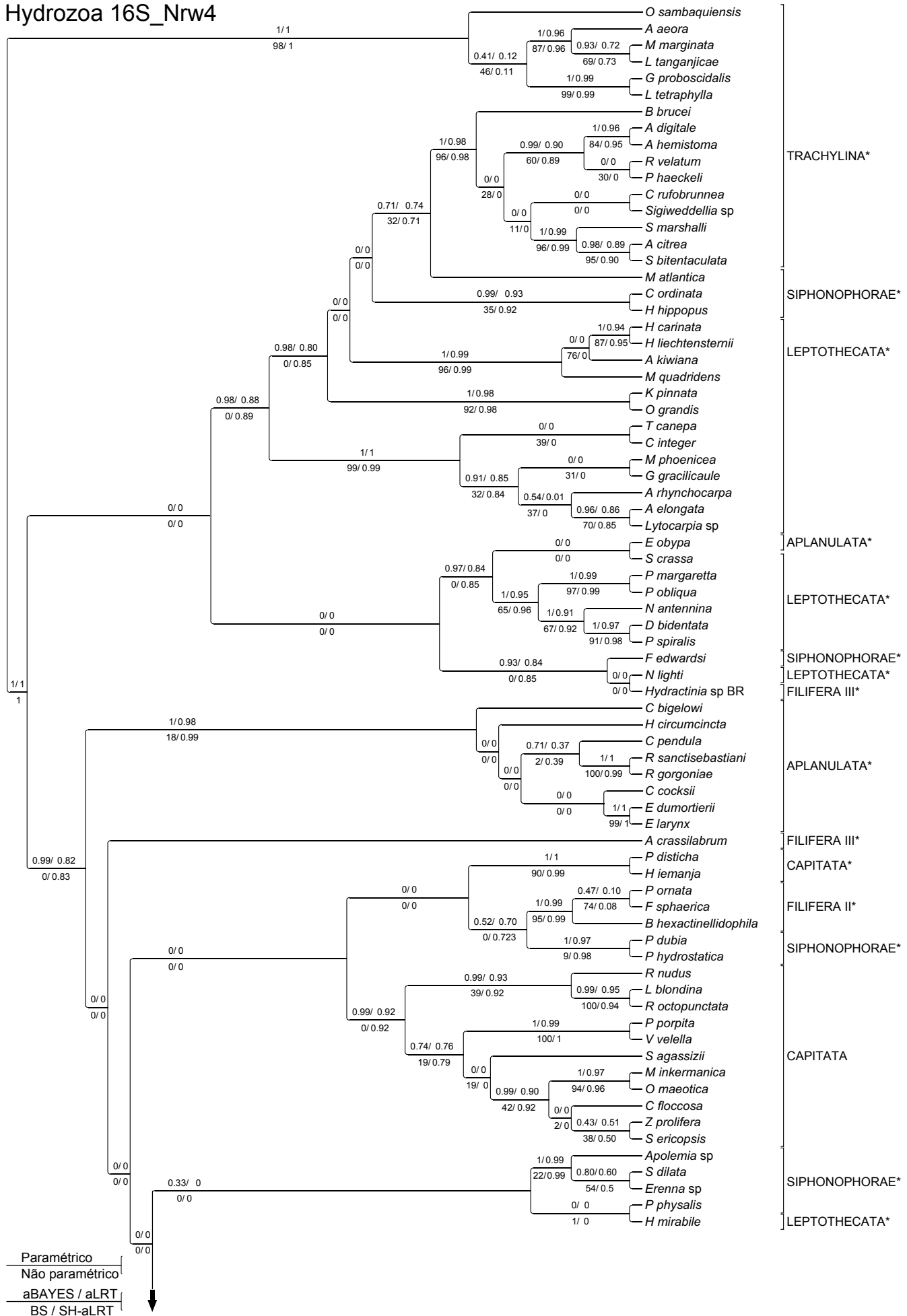


Figura Suplementar 4 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem intensiva de dados do marcador 16S (matriz 16S\_Nrw4). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

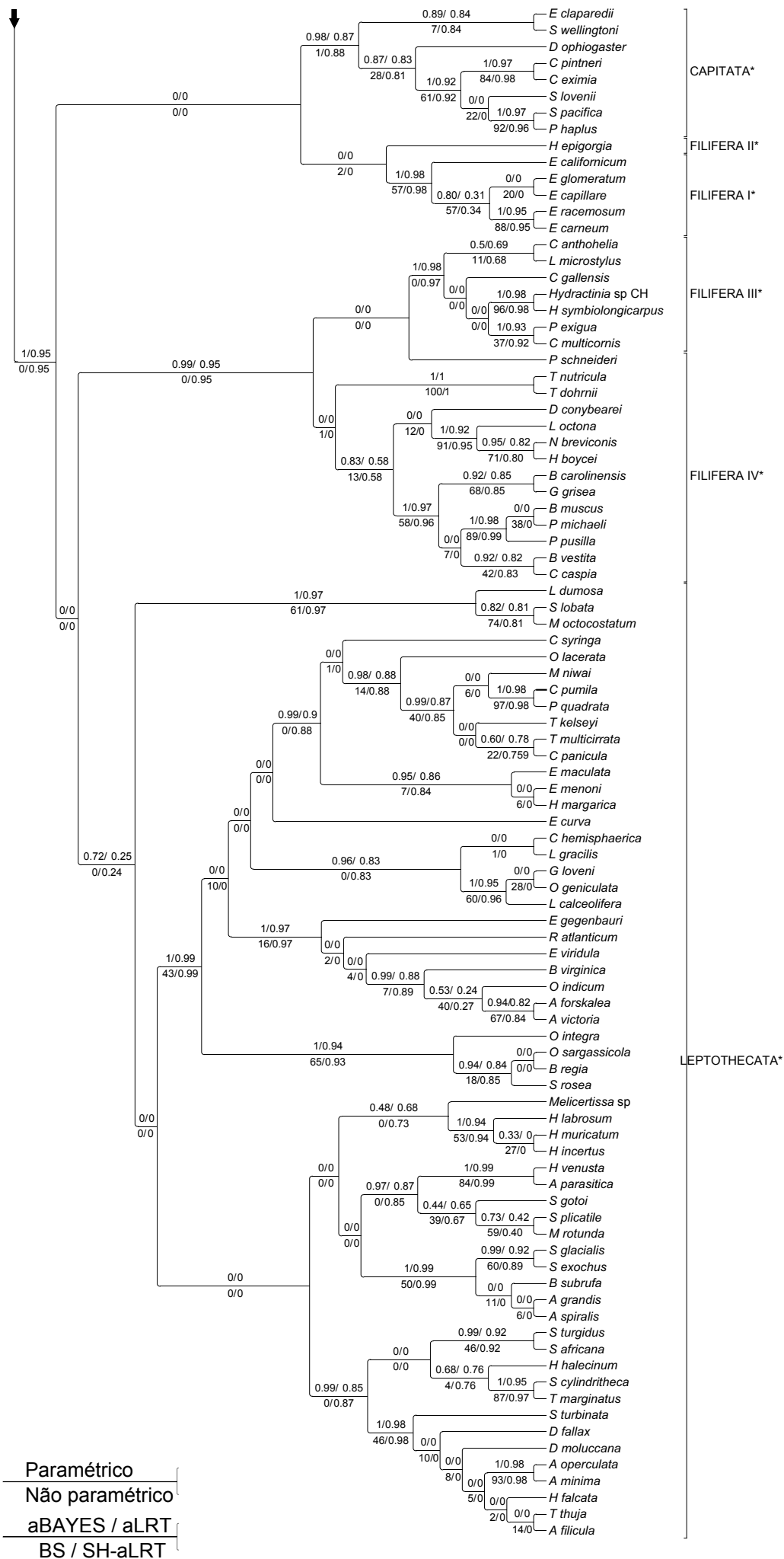


Figura Suplementar 4 (continuação)

# Hydrozoa 18S

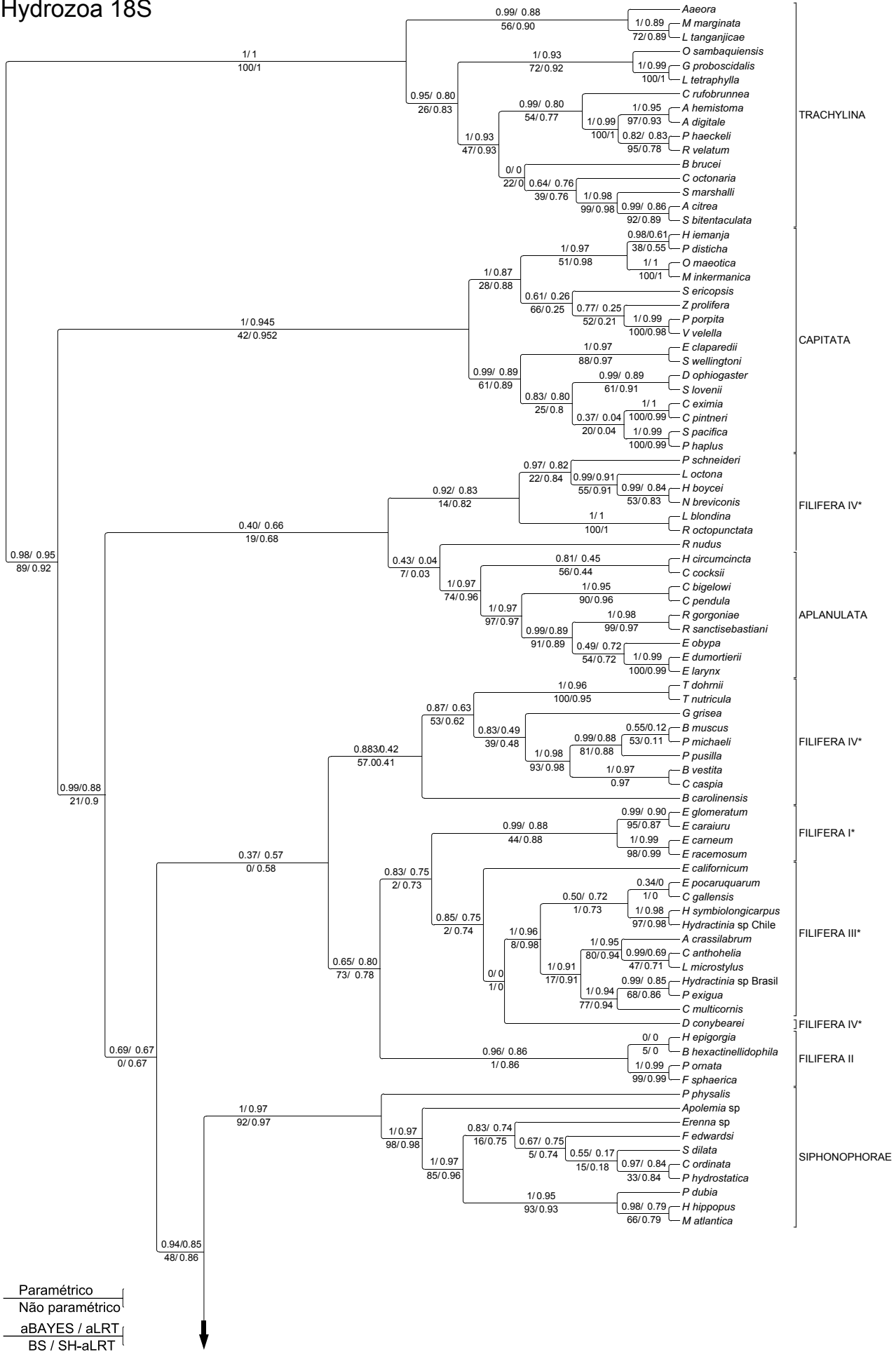


Figura Suplementar 5 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados do marcador 18S (matriz 18S). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.



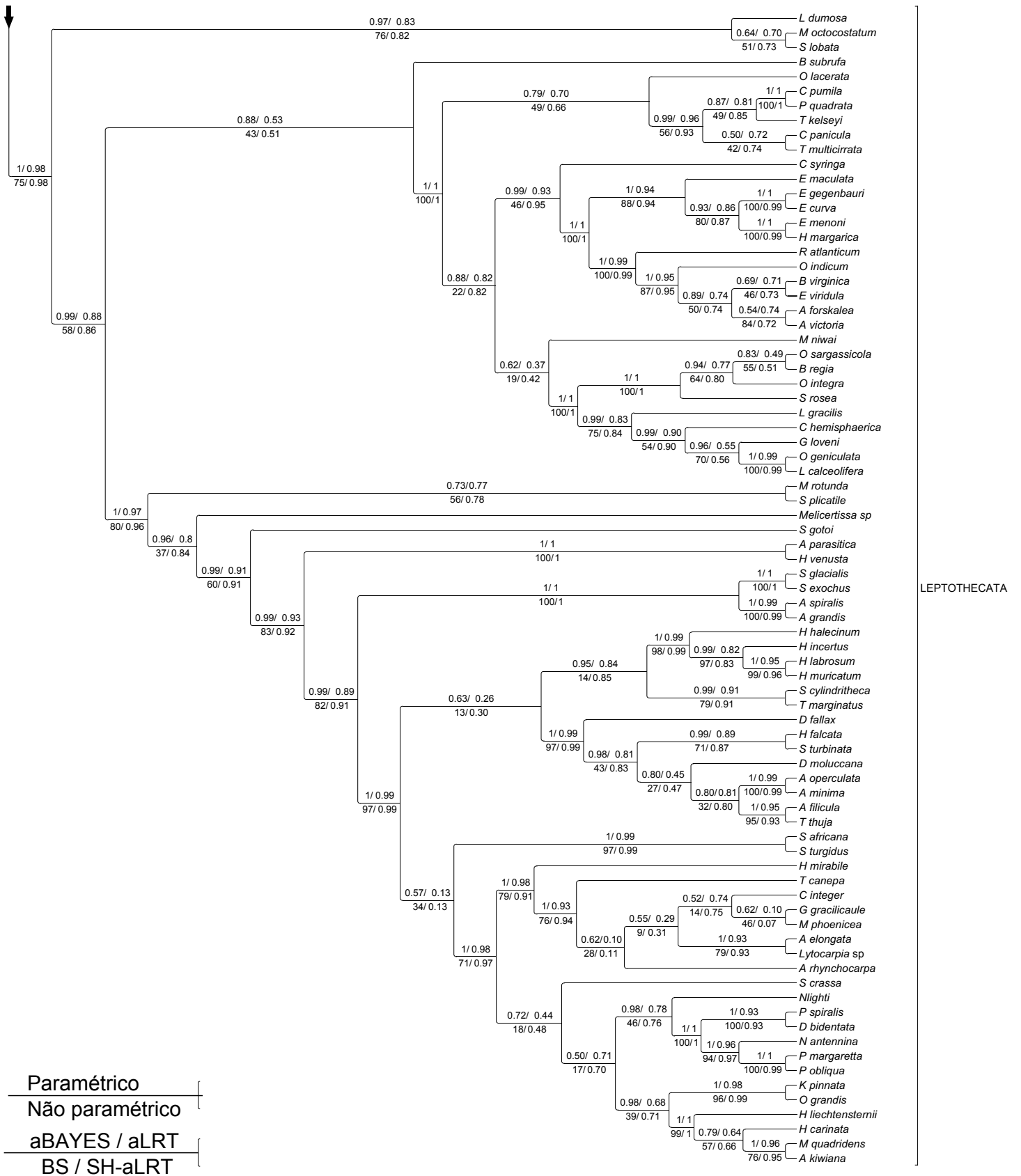


Figura Suplementar 5 (continuação)

# Hydrozoa 18S\_N

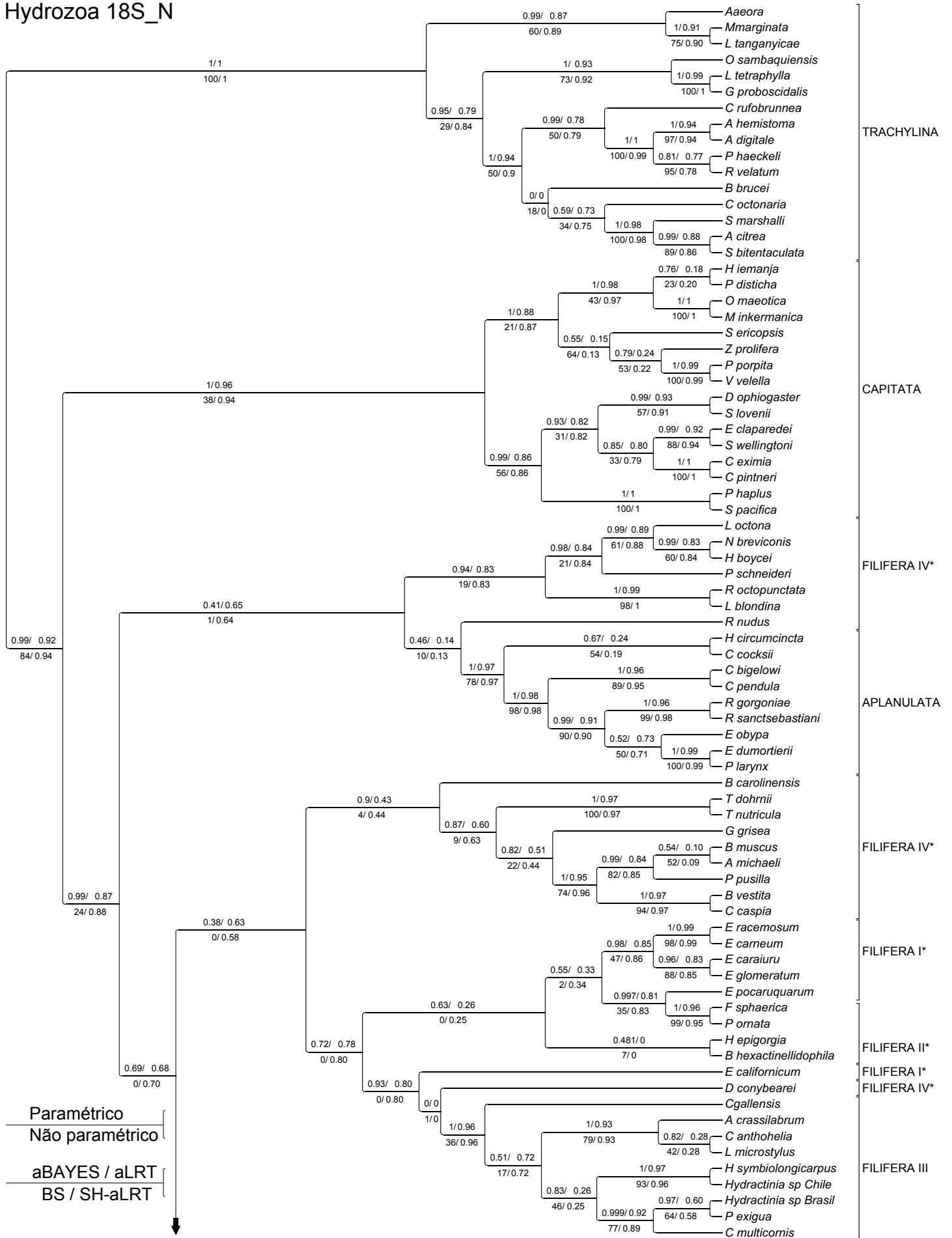


Figura Suplementar 6 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados do marcador 18S (matriz18S\_N). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

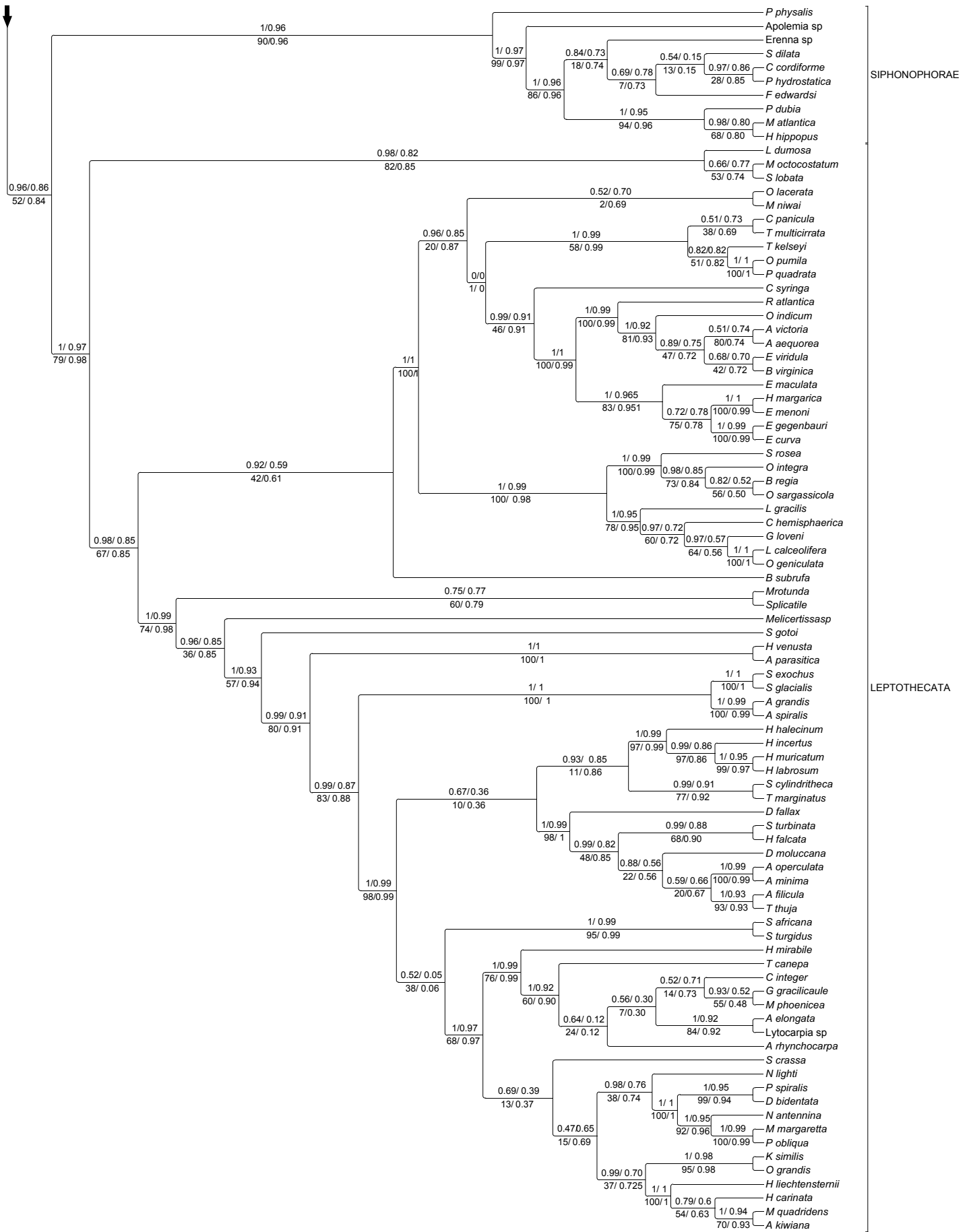


Figura Suplementar 6 (continuação)

# Hydrozoa 18S\_Nrw4

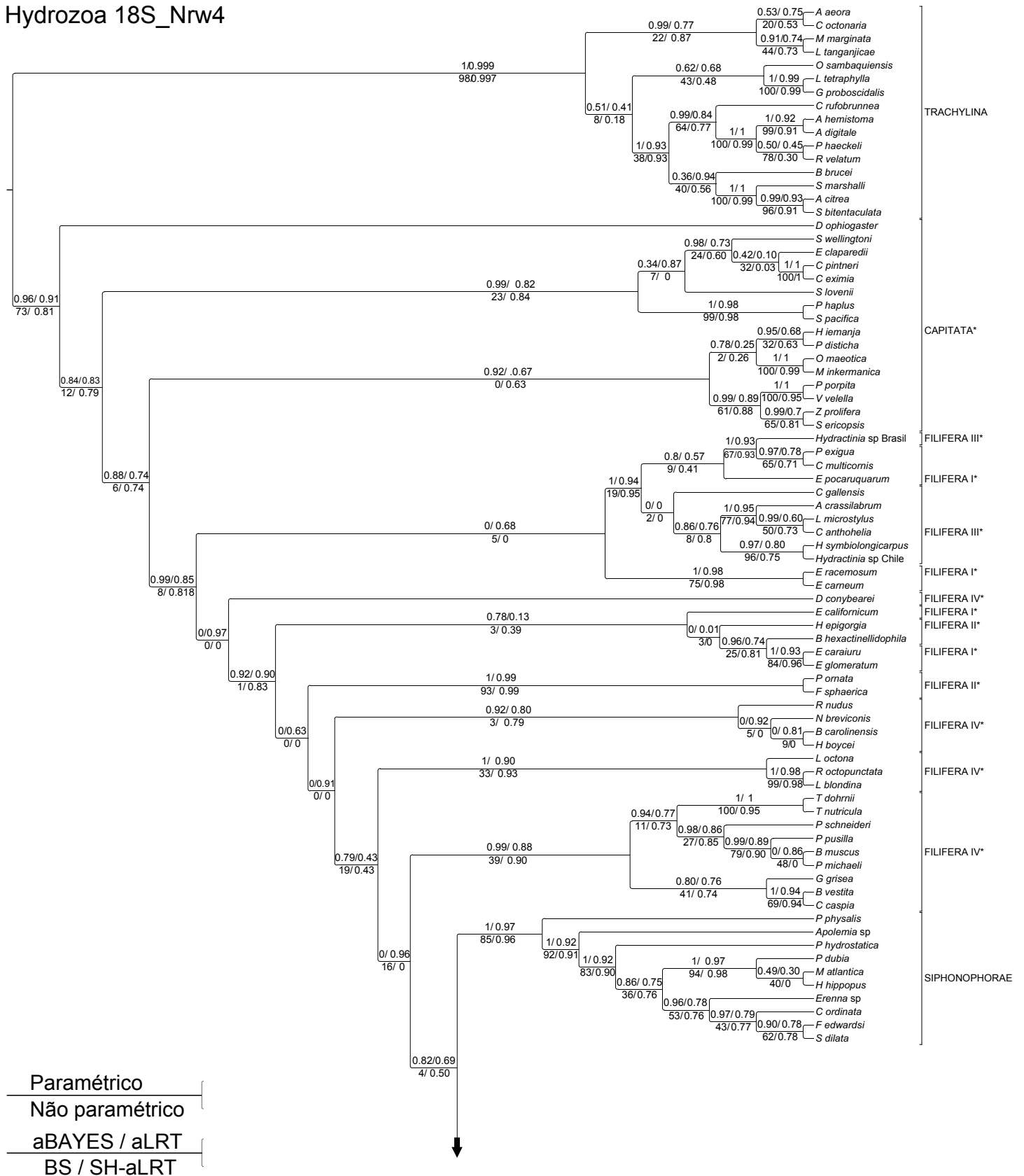


Figura Suplementar 7 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem intensiva de dados do marcador 18S (matriz 18S\_Nrw4). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes).\* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

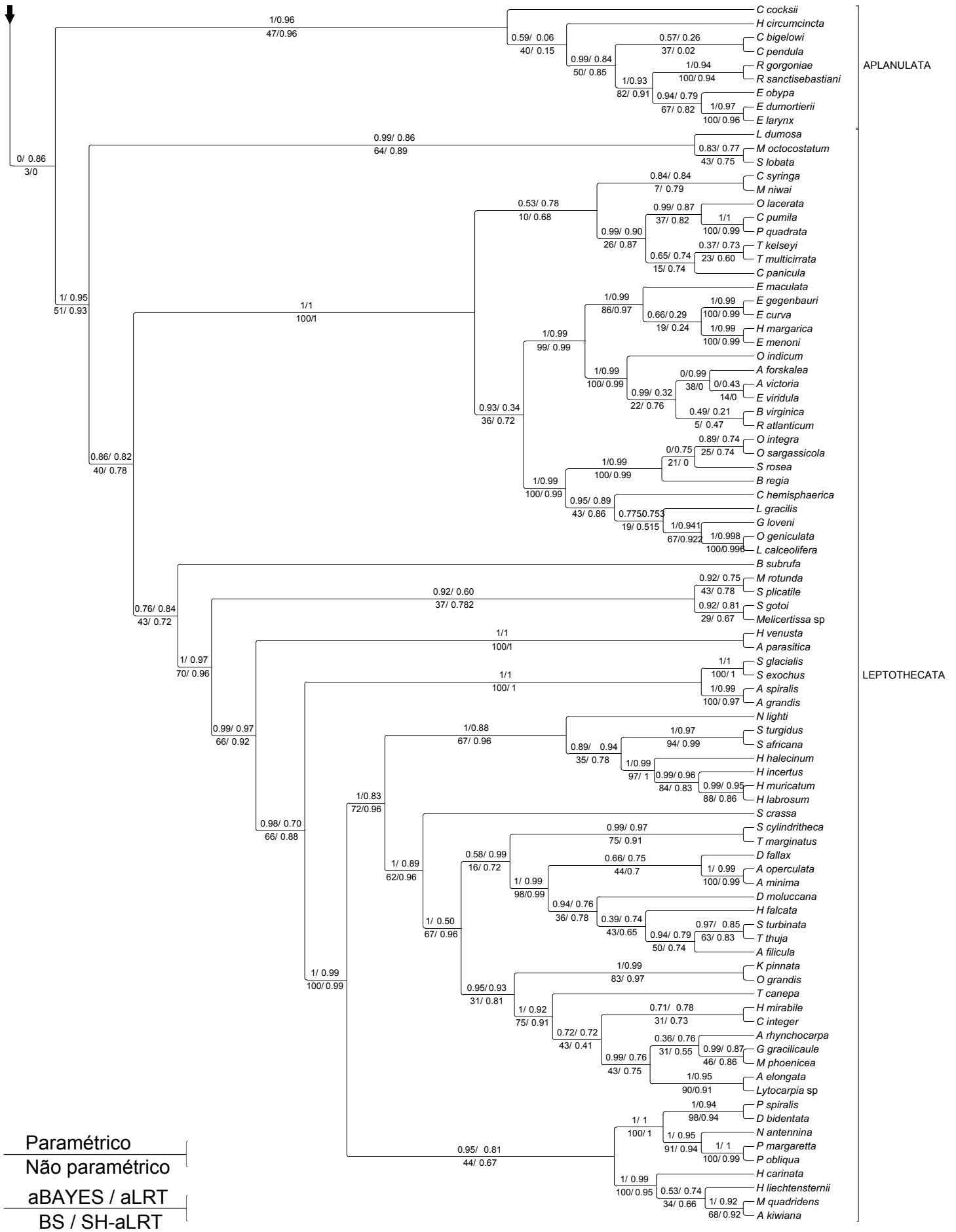


Figura Suplementar 7 (continuação)

# Hydrozoa 28S

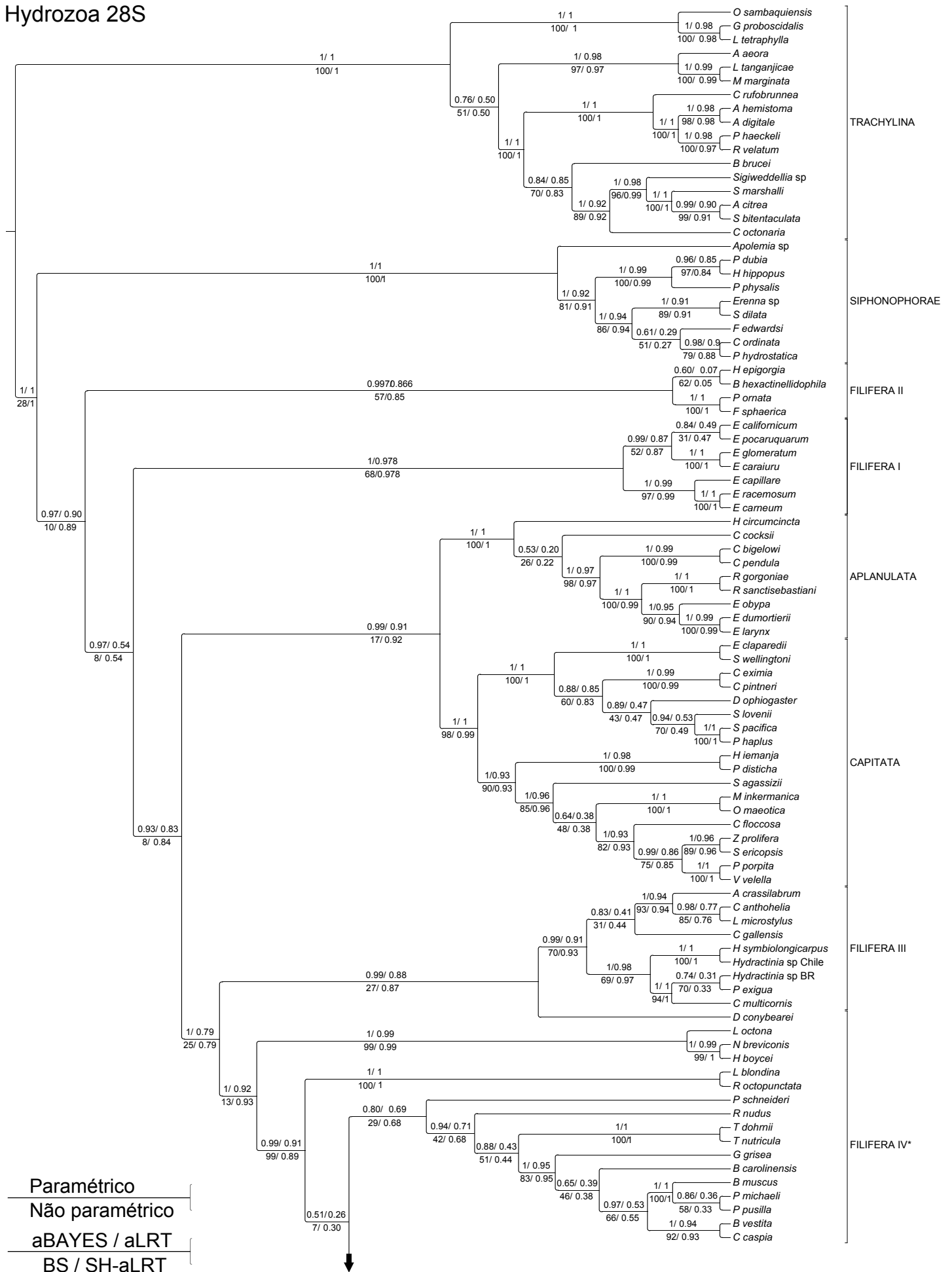


Figura Suplementar 8 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa sem filtragem de dados do marcador 28S (matriz 28S). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

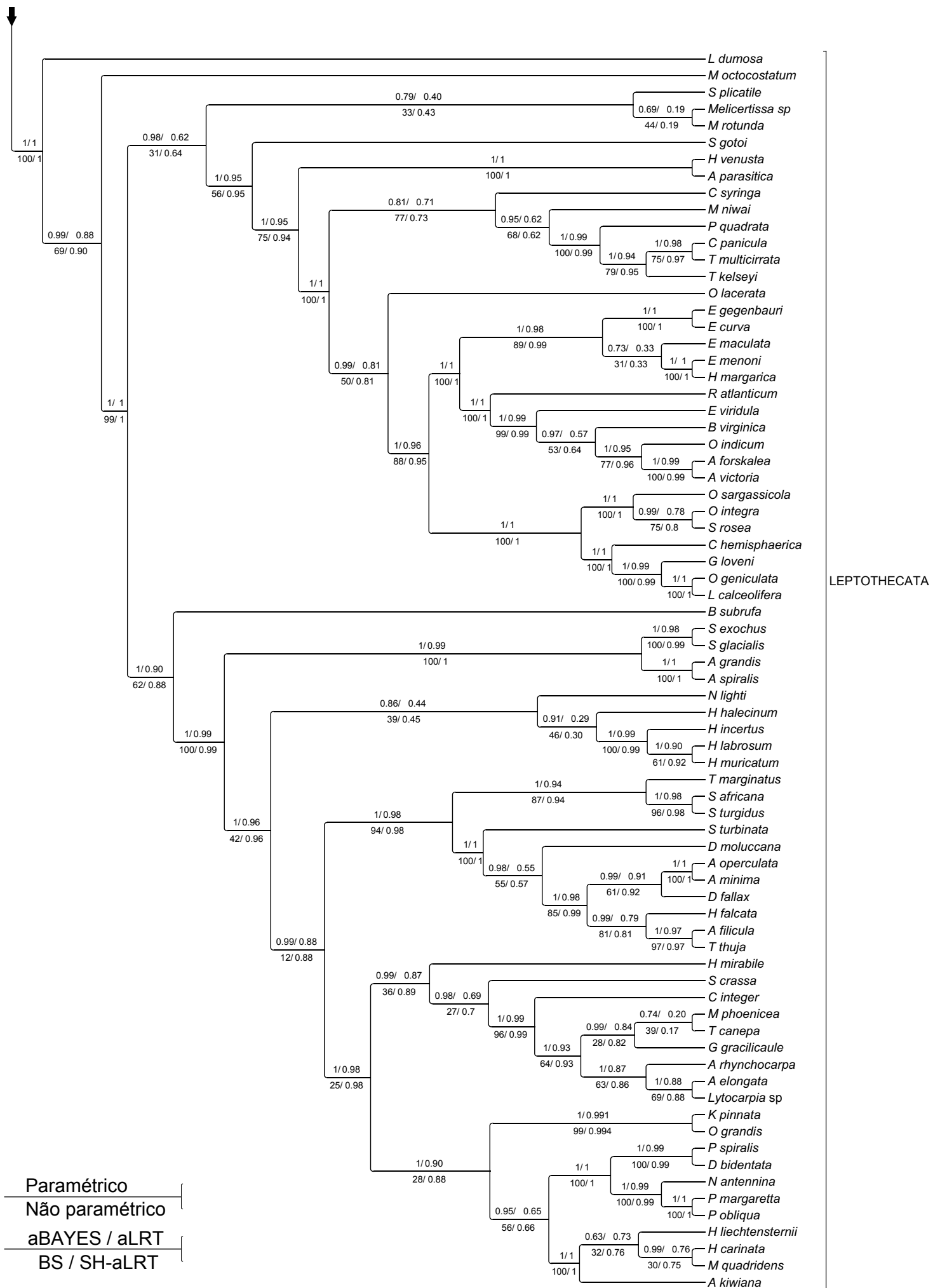


Figura Suplementar 8 (continuação)

# Hydrozoa 28S\_N

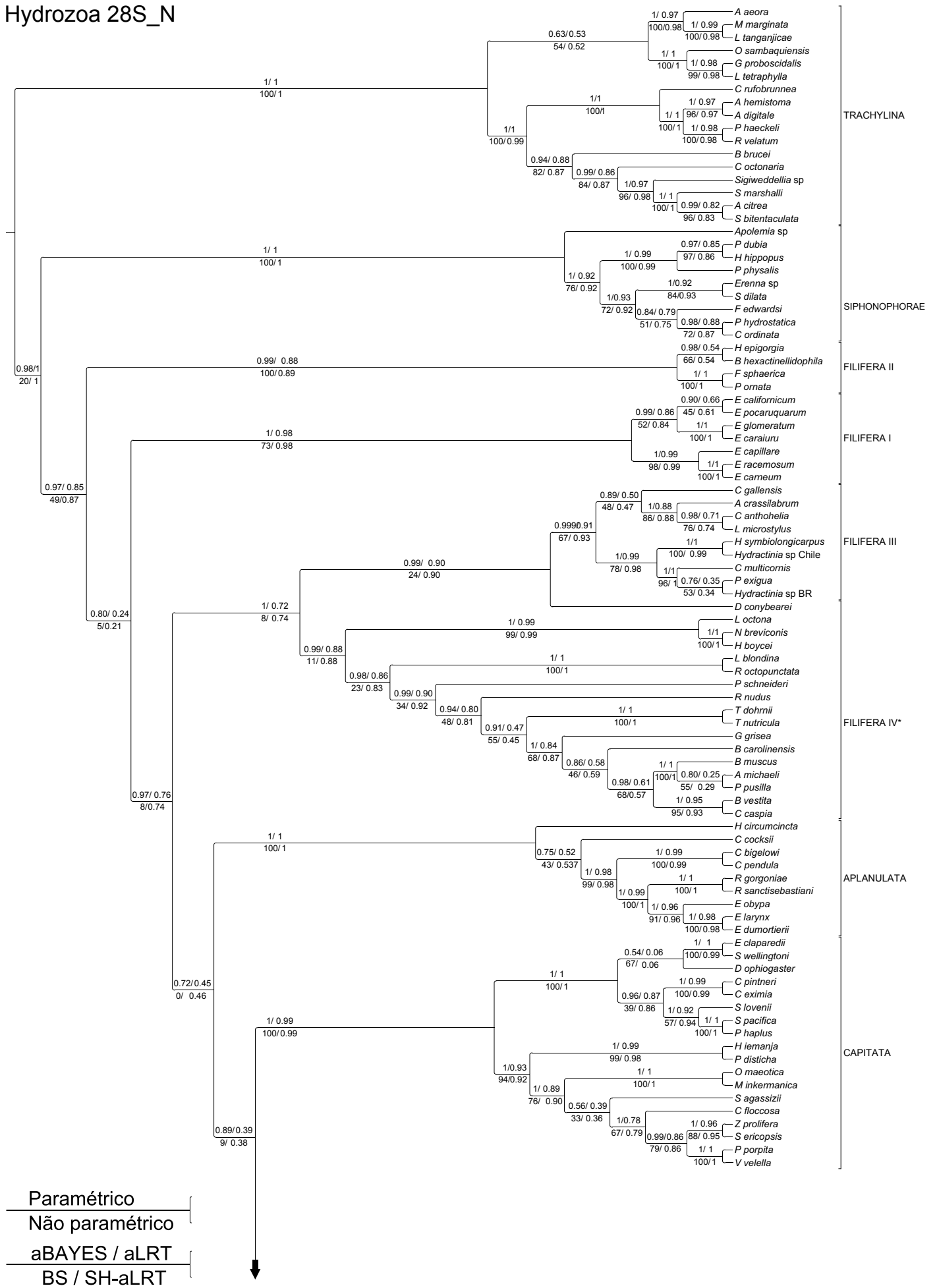


Figura Suplementar 9 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados do marcador 28S (matriz 28S\_N). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.



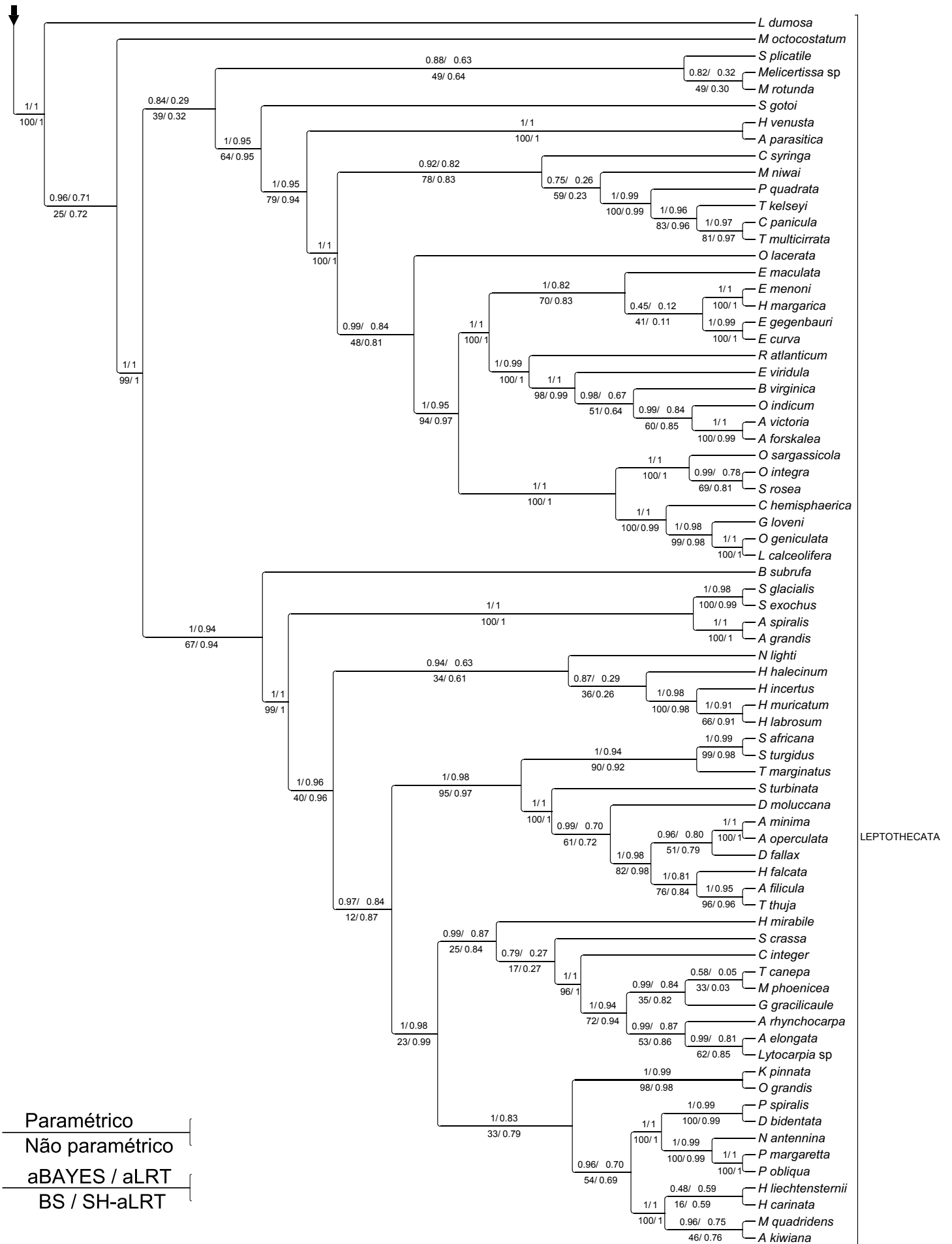


Figura Suplementar 9 (continuação)

# Hydrozoa 28S\_Nrw4

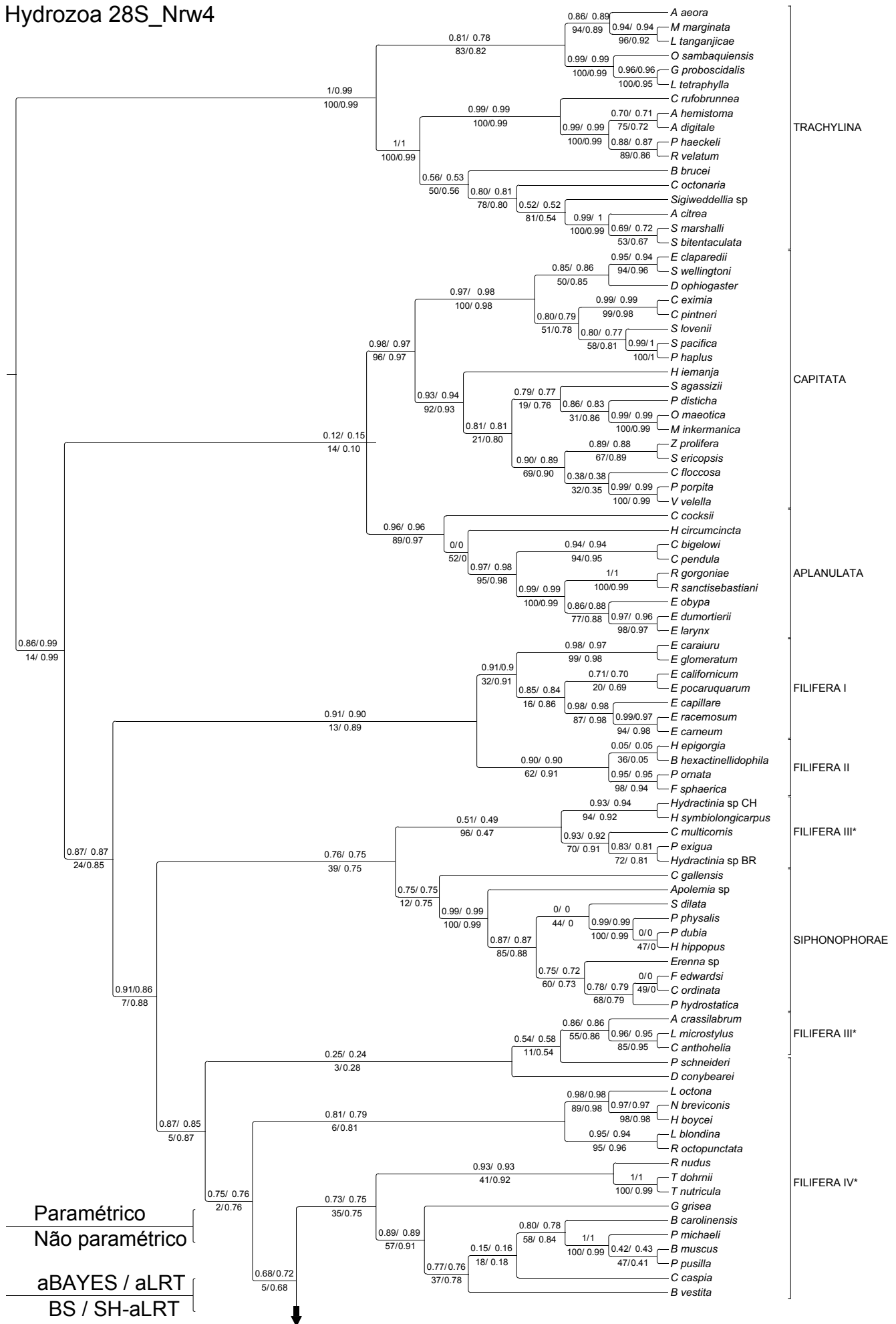


Figura Suplementar 10 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem intensiva de dados do marcador 28S (matriz 28S\_Nrw4). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

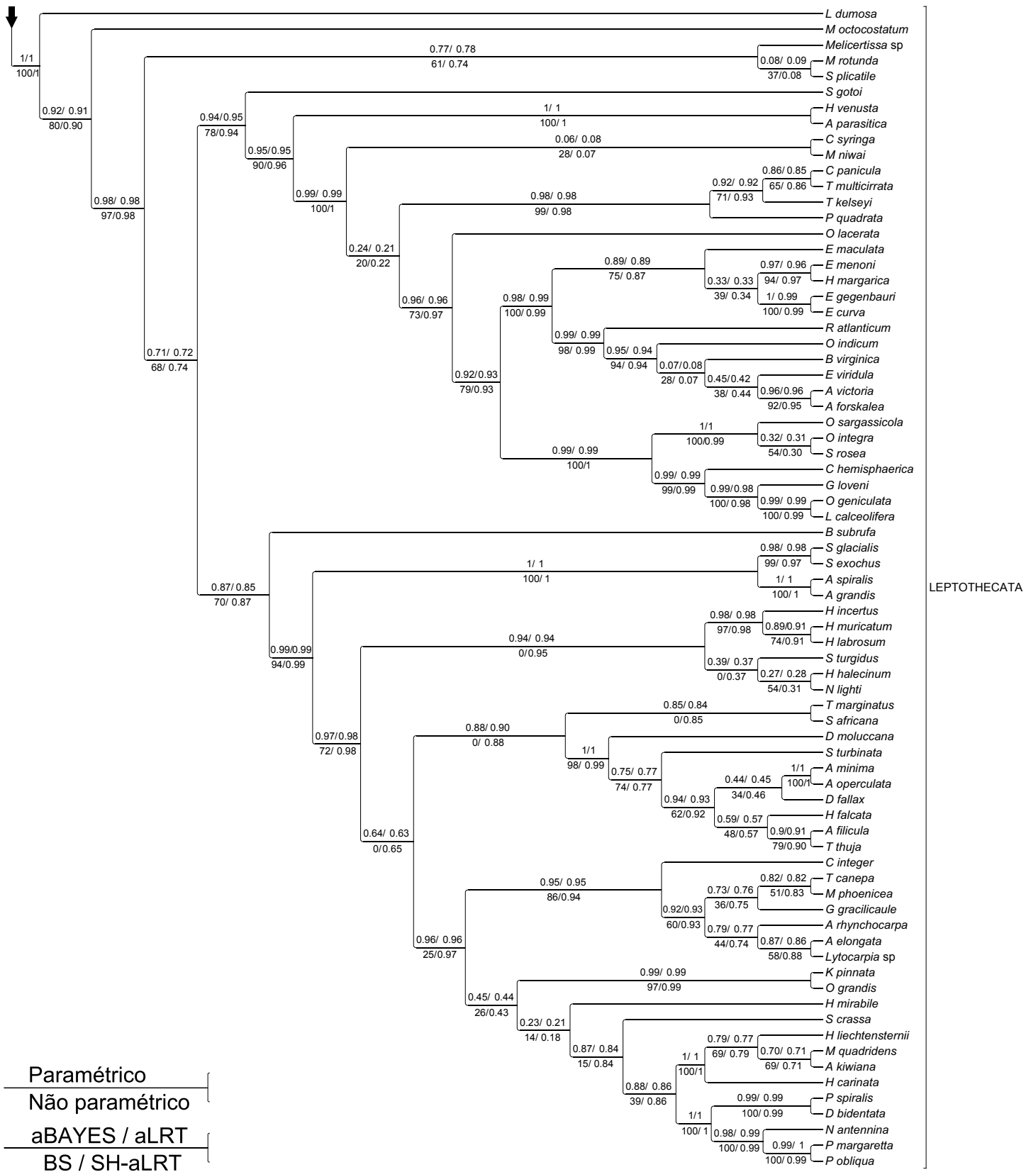


Figura Suplementar 10 (continuação)

# Hydrozoa 18S28S

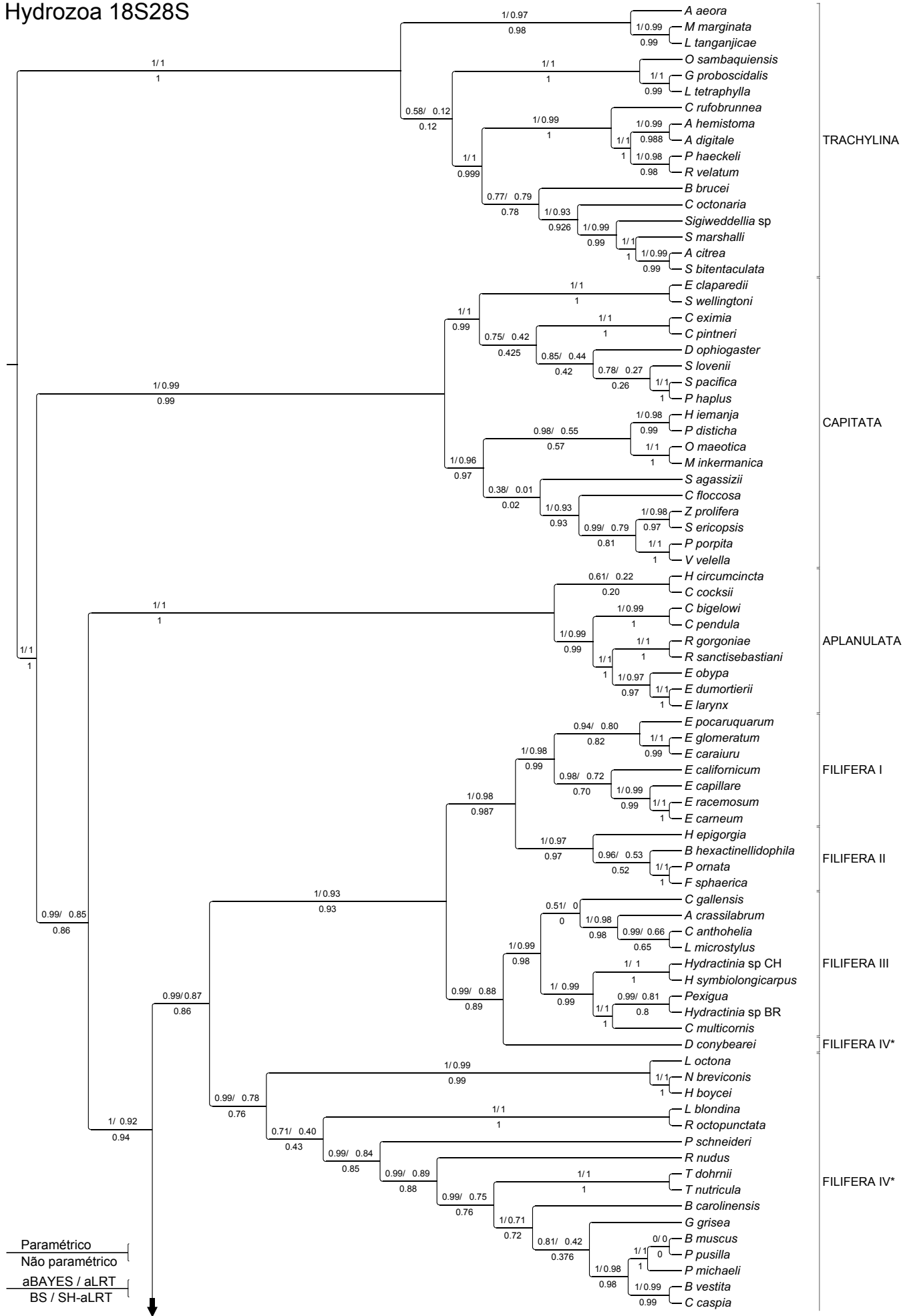


Figura Suplementar 11 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa sem filtragem de dados dos marcadores 18S e 28S (matriz 18S28S). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

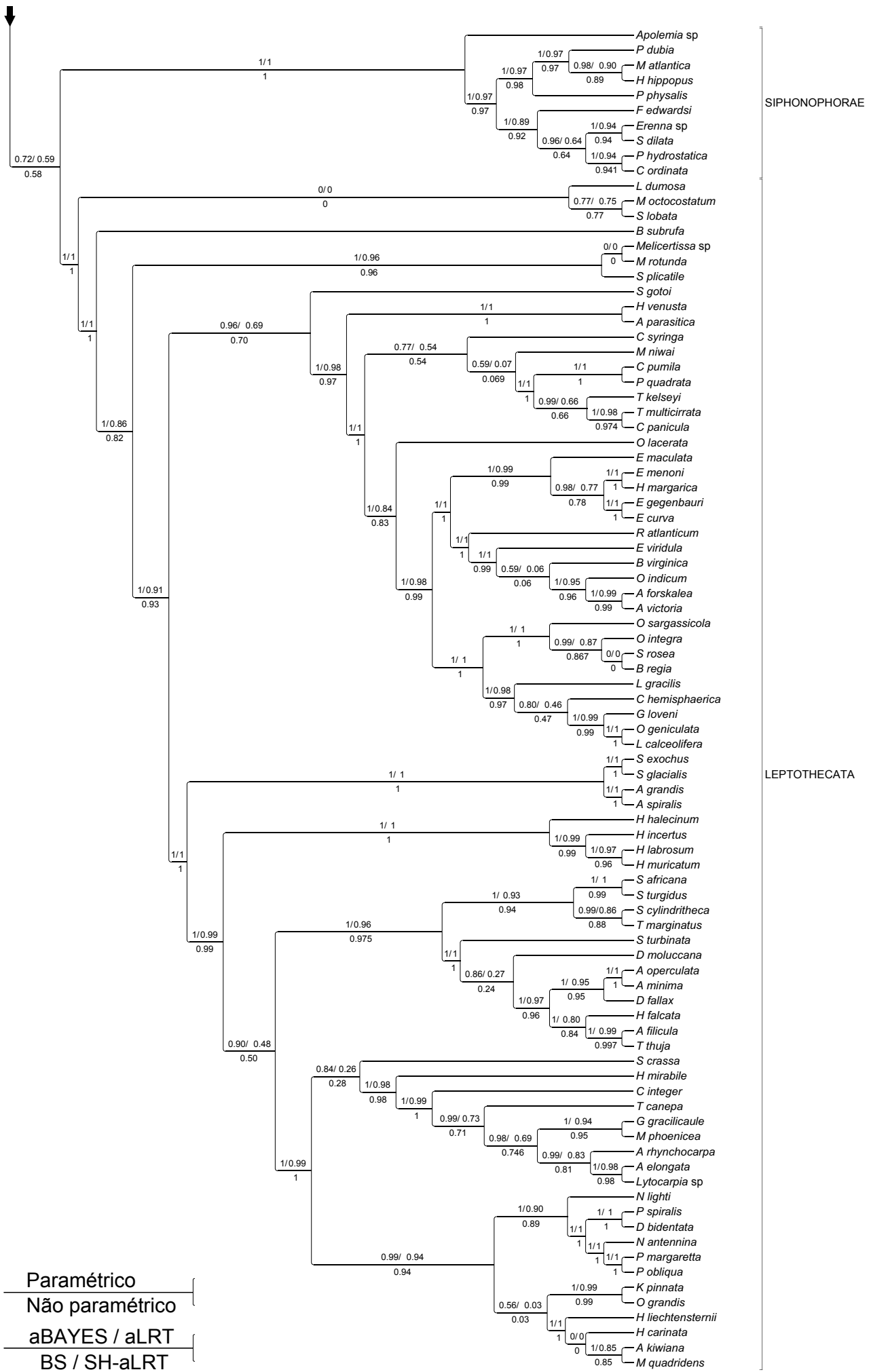


Figura Suplementar 11 (continuação)

# Hydrozoa 18S28S\_N

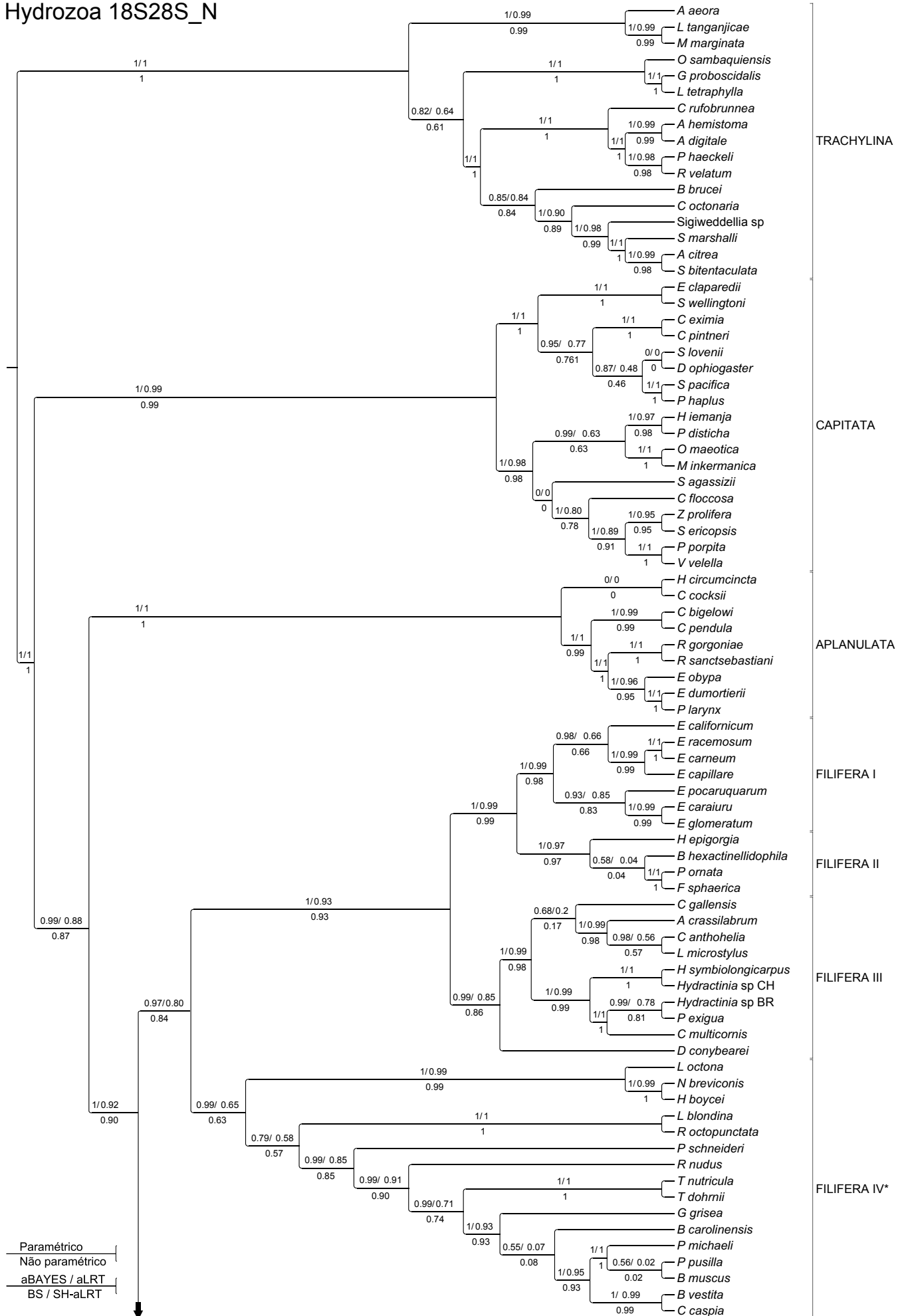


Figura Suplementar 12 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem mínima de dados dos marcadores 18S e 28S (matriz 18S28S\_N). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.

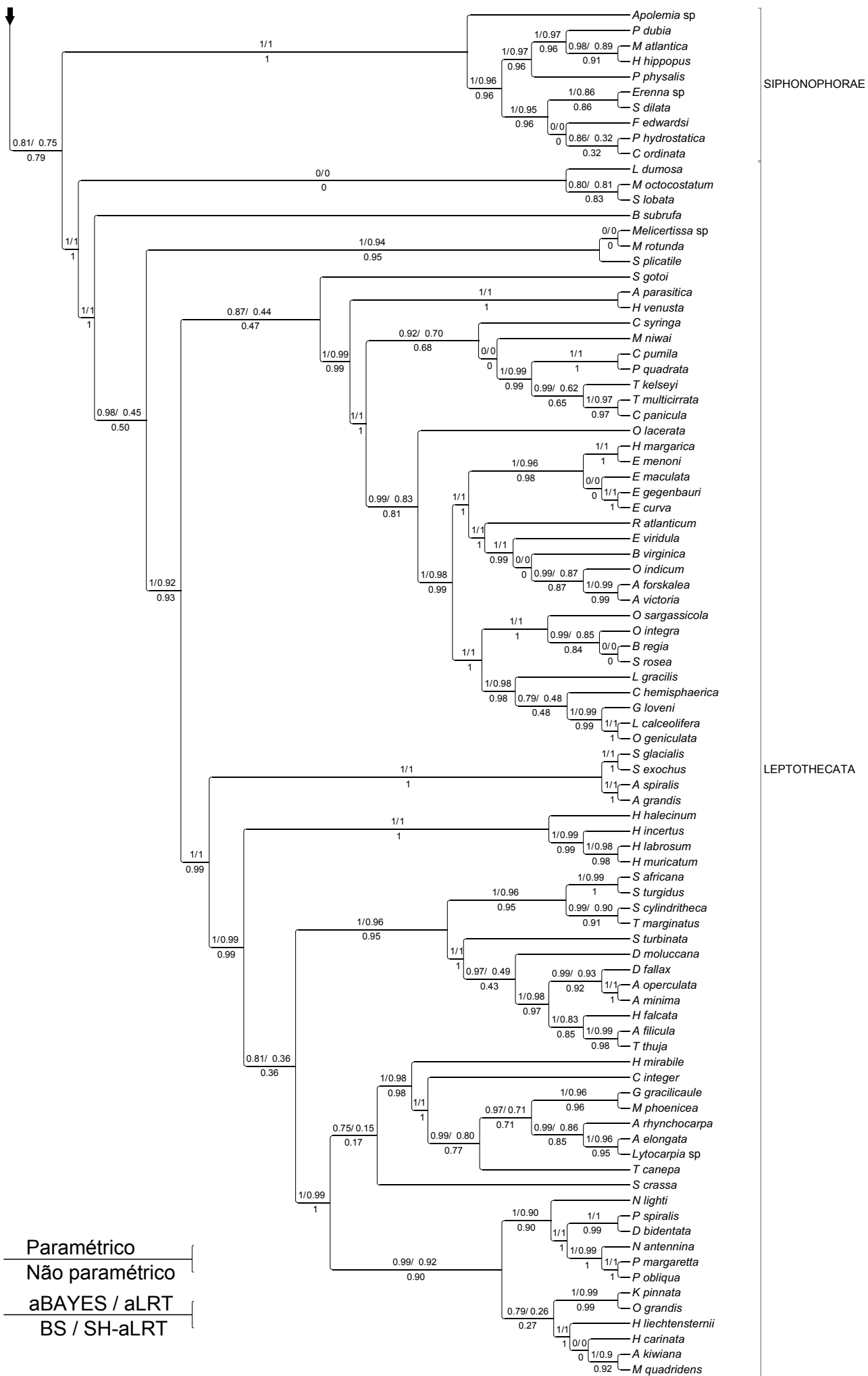


Figura Suplementar 12 (continuação)

# Hydrozoa 18S28S\_Nrw4

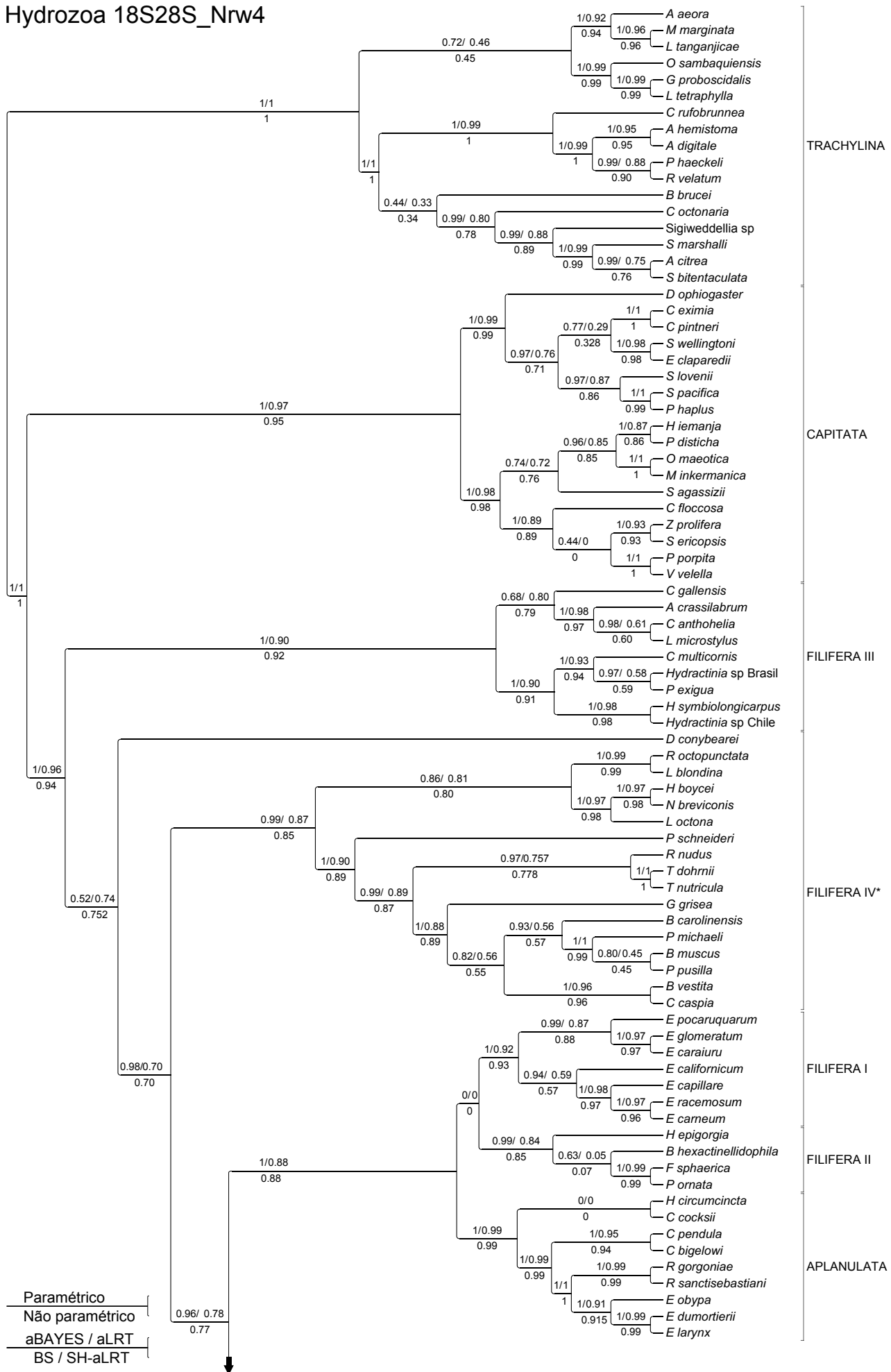


Figura Suplementar 13 - Cladograma da análise filogenética de Hydrozoa com filtragem intensiva de dados dos marcadores 18S e 28S (matriz 18S28S\_Nrw4). Para cada ramo apresenta-se quatro valores de suporte (dois paramétricos, dois não paramétricos; veja texto e detalhe na margem superior nesta figura para maiores detalhes). \* refere-se a grupos não monofiléticos no resultado.



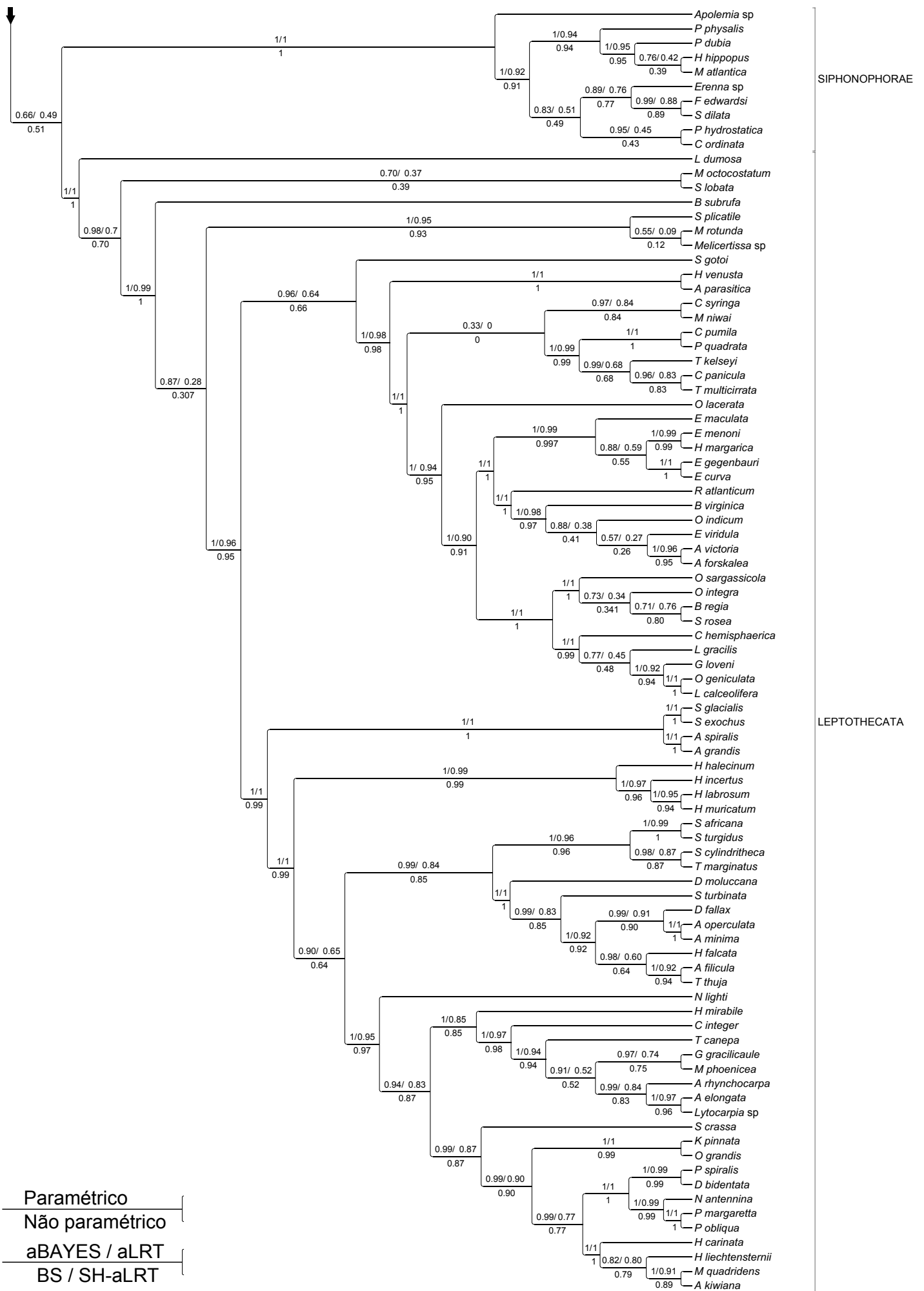


Figura Suplementar 13 (continuação)

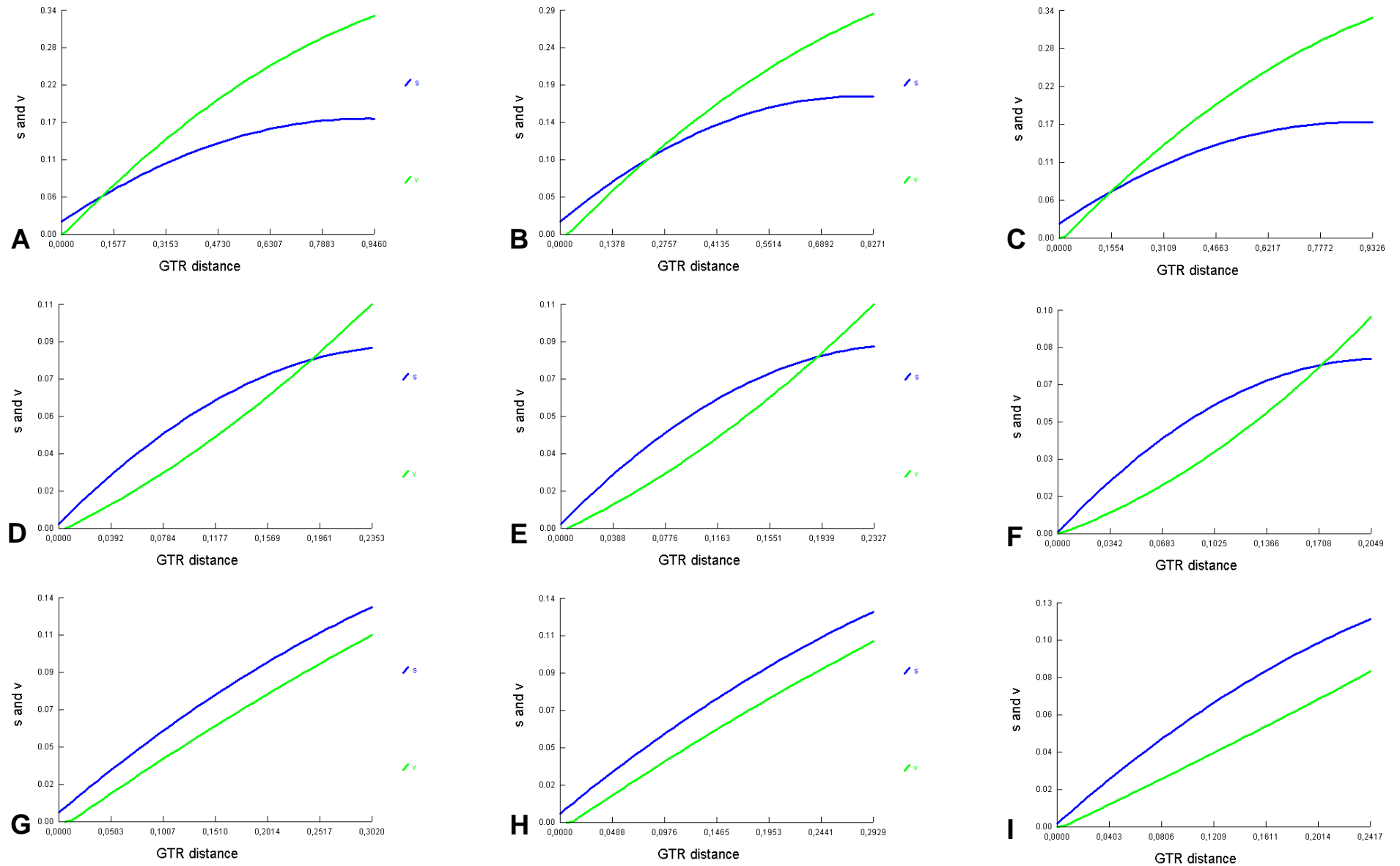


Figura Suplementar 14 – Padrões de substituição dos marcadores 16S, 18S e 28S (sem filtragem, filtragem mínimo\_N e filtragem intensivo\_Nrw4). Os números de transições (s) e transversões (v) (eixo vertical) são apresentados contra as distâncias dos parâmetros calculados com o modelo evolutivo GTR (eixo horizontal), considerando todos os sítios do alinhamento; cada ponto nas linhas representa uma comparação “par a par” entre dois terminais. (A) 16S; (B) 16S\_N; (C) 16S\_Nrw4; (D) 18S; (E) 18S\_N; (F) 18S\_Nrw4; (G) 28S; (H) 28S\_N; (I) 28S\_Nrw4.

# CAPÍTULO 3

## Uma nova classificação taxonômica dos Leptothecata (Hydrozoa)

---

### Resumo

O grupo Leptothecata é caracterizado pela presença de um exoesqueleto cobrindo completamente a região do pólip, assim como pela posição das gônadas nas medusas do grupo. Apresentam formas diversas de colônias, destacando-se aquelas eretas com várias formas de pólipos e presença de estruturas defensivas. Nestas formas de organismos com colônias complexas observa-se em geral a perda da fase de medusa tradicional, gerando um desafio classificatório ao ter que combinar informações de diferentes ciclos de vida numa única taxonomia. São limitadas as análises moleculares recentes que considerem como objetivo principal ou parcial o grupo, e observa-se nestes resultados conflitos com a sistemática tradicional do grupo. A partir deste desafio, foi gerada uma matriz de dados moleculares que represente o maior número possível de espécies para inferir uma filogenia de espécies do grupo. Nossos resultados nos permitem propor uma nova taxonomia geral dos Leptothecata, definindo grandes grupos numa classificação de base filogenética. Por último é discutido considerações recentes sobre fenômenos macroevolutivos do grupo, que poderiam ter tido impacto na origem da biodiversidade e riqueza de espécies do grupo, tão característico dos Leptothecata.

### Abstract

*The Leptothecata group is characterized by presence of exoskeleton in the fully covered polyp region, as well as the gonads position in their medusa stages. They have different colony complexity and organization, remarking those erected ones with various types and functions of polyps, some of them with remarkably defense structures. In these organism's mode of life the traditional medusa stage is absence, defining a classificatory challenge on combining information from different life cycle stages in unique group's taxonomy. Molecular analyses on Leptothecta, or part of the group as main objective, are limited and their results present conflicts with the traditional*

*systematics of the group. From this consideration, being our main objective to infer a phylogeny of species for the group, we generated a molecular datamatrix to represent the largest possible number of species. Our results allow us to propose a new general taxonomy of Leptothecata, defining large groups in a proper classification. Finally recent considerations on macroevolutionary trends of the group are discussed, taking into account their potential impact on biodiversity origin and species richness of the group, a well know attribute of Leptothecata.*

## **Introdução**

Leptothecata é o grupo mais rico dentre os Medusozoa, com aproximadamente 2.000 espécies descritas (Tabela 1, Capítulo 1). Sua história taxonômica apresenta vários táxons relacionados a partir das diversas características morfológicas dos pólipos, colônias e medusas (ver revisão em Cornelius 1995a, 1995b). O grupo foi originalmente proposto como Thecata por Fleming no século XIX, como “*Polypi surrounded by a membranaceous tube, covering the subdivisions of their compound body*” (Fleming 1828, p. 505). O ciclo de vida metagenético em Medusozoa foi descrito logo após a proposta de Fleming (Sars 1829), com consequências aos arranjos taxonômicos por gerar uma potencial situação de classificação dual, isto é, classificações semi-independentes e paralelas para as fases de pólipo e medusa.

Subsequentemente, Hincks (1868) propôs Thecaphora sendo os “*Hydroida furnished with thecae*” (p. lxxvii) [...] “*The chitinous receptacle in which the polypites are lodged in one of the Hydroid suborders (Thecaphora)*” (p. iii)”, descrevendo também vários grupos importantes como Campanulinidae, Haleciidae e Lafoeidae, entre outros táxons supraespecíficos. Seu sistema de classificação supraespecífico baseia-se em caracteres do pólipo, quando presente, a fase de medusa é reconhecida e descrita. Hincks reconheceu problemas relacionados às propostas de classificação para alguns grupos, inclusive as incertezas advindas do pouco conhecimento sobre as fases de pólipo e medusa nos ciclos de vida (Hincks 1868; Cornelius 1977; Calder 2009). As colocações de Hincks serviram de base para outros pesquisadores, embora às vezes tenham sido ligeiramente alteradas. Allman (1864, 1871) propôs o grupo Calyptoblastea como sendo “*Calyptoblastic (covered; bud). The condition of a hydroid when an external protective receptacle (hydrotheca or*

*gonangium) invests either the nutritive or generative buds. Calyptoblastea, the name of one of the sub-orders of Hydroida”* (1871, p. xvii), novamente baseado nos pólipos, ainda que ciente da diversidade de ciclos de vida.

Com uma abordagem focada nas medusas, Haeckel (1879) propôs o grupo Leptomedusae, junto a vários táxons supragenéricos (e.g., Eirenidae, Mitrocomidae e outros já sinonimizados). Essa proposta levou ao estabelecimento de uma classificação dual, com estudos “baseados” exclusivamente baseados nos pólipos ou nas medusas.

No início do século XX, Broch (1910) propôs a divisão dos leptotecados nos grupos Conica e Proboscoida, com hipostômio cônico e sem cavidade pré-gástrica e com o hipostômio globular com base pedunculada e uma cavidade pré-gástrica presente, respectivamente. Com raras exceções (e.g., Rees 1957), a prática taxonômica da classificação dual foi predominante até a segunda metade do século XX, quando Naumov (1960,1969) buscou recompor a abordagem taxonômica integrada (Cornelius 1987), ou em suas palavras, “...to create such a unified classification of medusae and polyps accurate data is needed on the individuals of different generations indicating that they belong to the same species...” (Naumov 1969, p. 94). Essa proposta, uma reedição das descrições de Hincks (1866a, 1866b, 1868, 1874), das considerações de Allman (1864, 1871) e dos trabalhos de Rees (Morton 1957; Rees 1957), reforçou o padrão classificatório nos Hydrozoa até o final do século XX (e.g., Millard 1975; Cornelius 1982; Bouillon 1984, 1985; Petersen 1990). Um dos marcos taxonômicos dessa fase, embora nomenclaturalmente inconsistente, induzia à fusão dos nomes e à definição dos mesmos com base em características de pólipos e/ou medusas (Bouillon 1984, 1985; resumo na Tabela 4 de Bouillon 1995), o que foi parcialmente aceito ou criticado posteriormente (e.g., Cornelius 1995a, 1995b; Bouillon & Boero 2000; Bouillon et al. 2006).

Finalmente, o termo Leptothecata (Cornelius 1992, p. 246) foi proposto como uma síntese para a biologia do grupo (“Leptomedusae + Thecatae”; contrapondo-se à Anthoathecata, que seria “Anthomedusae + Athecatae”). Paralelamente, houve algumas propostas filogenéticas para os Hydrozoa publicadas ao final do século XX, às quais seguiram-se estudos mais consolidados para morfologia (Marques 2001, Marques & Collins 2004) e

moleculares (Collins 2000), que testaram, rejeitando ou corroborando, as definições de diversos grupos de hidrozoários, inclusive Leptothecata.

Desde a virada do século XXI, a abordagem taxonômica para Leptothecata incorporou metodologias filogenéticas (Collins 2000; Marques 2001) e dados moleculares (Collins 2000, 2002). Em análises de Hydrozoa, Leptothecata resulta sempre como uma linhagem monofilética (e.g., Collins 2000, 2002; Marques 2001; Marques & Collins 2004; Collins et al. 2006, Cartwright et al. 2008; síntese em Van Iten et al. 2014). Algumas hipóteses de relações internas também foram publicadas para o grupo baseadas em DNA (Campanulariidae, Govindarajan et al. 2006; Plumularioidea Leclère et al. 2007; Moura et al. 2012; Lafoeidae e Hebellidae, Moura et al. 2011a) e morfologia (Lafoeidae e Hebellidae, Marques et al. 2006a). Esses estudos já contestam o monofiletismo de diversos grupos tradicionalmente aceitos, mas paradoxalmente apresentam poucas propostas taxonômicas novas, como por exemplo, Statocysta (Leclère et al. 2009) e Schizotrichidae (Peña Cantero et al. 2010).

Porém, é evidente que as fases de medusa e pólipo em cnidários dificultam interpretações taxonômicas. A organização tecidual simples e a ausência de órgãos ou sistemas contrasta com a diversidade de ciclos de vida e polimorfismo nos Hydrozoa, que varia desde pólipos bentônicos sem medusa no ciclo de vida, passando por diferentes estágios de redução do pólipo ou da medusa, até medusas planctônicas sem pólipos no ciclo de vida. Assim, há também questões evolutivas e ecológicas igualmente desafiadoras na compreensão da biologia dos Hydrozoa Leptothecata.

Nesse contexto, os objetivos desse estudo são: (1) propor uma hipótese filogenética para uma extensa amostragem dos Leptothecata, baseada em dados moleculares; (2) contrastar essa hipótese com propostas tradicionais de classificação recente (duas últimas décadas); (3) reconhecer macropadrões filogenéticos de morfologia e biologia relacionadas a essa hipótese.

## **Material e Métodos**

### **Amostragem taxonômica e dados**

Estabelecemos protocolos de extração para obter DNA total de alto peso molecular de amostras diversas, inclusive daquelas com quantidade mínima de tecido, como tecidos mesogleais de medusas e imiscuídos com quitina dos

pólipos. Essas otimizações sobre os protocolos originais foram feitas sobre as reações de extração a partir do *kit* Bio-Rad® INSTAGENE (baseado no componente químico caotrópico Chelex; Nishiguchi et al. 2002), por meio do ajuste do volume de concentração na reação de extração, importante nos casos de microtecido em que a relação de concentrações precisa ser otimizada; e por meio da alta afinidade para dissolver e separar componentes celulares do DNA total (e.g., membranas celulares, proteínas, etc.). Nos casos de extrações insatisfatórias ou para amostras de microtecido e/ou alta relação quitina/tecido, a extração foi realizada com o *kit* Agencourt® DNAdvance, baseado na separação de DNA total dos restos da lise tissular-celular, por partículas magnéticas de alta afinidade ao DNA dupla fita. A qualidade das extrações em ambos os casos foi controlada utilizando o espectrofotômetro Thermo® NanoDrop 2000c. Na etapa seguinte, procedemos a realizar reações padrão de PCR, utilizando *primers* e temperaturas de anelamento ( $T_m$ ) adequadas segundo o marcador molecular (Tabelas Suplementares 2 e 3 trazem os *primers*,  $T_m$  e protocolos gerais de PCR). Após confirmação de resultado positivo da reação de PCR por meio de gel de agarose 1,5% com corante Biotium® GelRed, as reações de PCR foram purificadas via protocolo de afinidade de partículas magnéticas por DNA dupla fita (*kit* Agencourt® AMPure®; as concentrações finais de DNA purificado checadas no Thermo® NanoDrop 2000c). A reação de sequenciamento foi realizada com o *kit* ABI Big Dye V3.1® nas condições padrão, com o uso dos *primers* originais da reação de PCR (e seus respectivos valores de  $T_m$ ). A precipitação final do DNA foi realizada com Acetato de Amônia e etanol (Sambrook & Russell 2001), e as amostras foram sequenciadas no sistema Hitachi® ABI PRISM3100 genetic analyzer® (IQUSP). Os cromatogramas obtidos foram montados nos programas GeneCodes Sequencer 4.6 ou Geneious v5.4 (Drummond et al. 2011), e as sequências consenso, obtidas para cada caso, foram controladas por potenciais casos de erro de contaminação via BLAST (Altschul et al. 1990). Submetemos as sequências finais ao GenBank usando Geneious v5.4 (Drummond et al. 2011; resumo das etapas de geração de dados na Figura 1 do Material Suplementar).

Os *primers* utilizados amplificaram quase a totalidade dos marcadores nucleares (subunidade ribossomal pequena, ou 18S, com ~1800 pb; subunidade ribossomal grande, 28S, com ~3200 pb) e mitocondrial

(subunidade mitocondrial grande, ou 16S, com sequências parciais de ~600 pb). O sucesso na geração de sequências por espécie/marcador, códigos de *vouchers* e localidade/região foram sumarizado na Tabela 1 e Figura Suplementar 2. A seleção das amostras buscou maximizar a cobertura taxonômica e de marcadores quando combinados com sequências presentes no GenBank para os Leptothecata, assim como dos grupos externos das principais linhagens de Hydrozoa, compilados em uma supermatriz (de Queiroz & Gatesy 2007) que abrange o maior número possível de gêneros de leptotecados (Tabela 1). Os nomes específicos e de táxons supraespecíficos foram comparados com a base de dados WoRMS (World Hydrozoa Database, Schuchert 2014; taxonomia até gênero) e de Bouillon 1995 (taxonomia na categoria de família), com poucas exceções (veja Tabelas 1 e 4 para maiores detalhes).

### **Alinhamento, estratégias de filtragem e combinação de marcadores moleculares**

Uma análise inicial da homologia posicional (alinhamento das sequências para cada marcador molecular) foi realizada em MAFFT v6 (Kato & Toh 2008) com perfil de parâmetros recomendados para sequências de tipo ribossomal, E-INS-i. Após a eliminação dos extremos inicial 5' e final 3' dos alinhamentos para cada marcador (setores extremos de primers 16S, 18S e 28S), testamos procedimentos de identificação e eliminação de setores com alta heterogeneidade nucleotídica não filogenética, definindo matrizes derivadas de dados “filtrados”. Essa estratégia tem o objetivo de evitar artefatos filogenéticos e obter uma topologia ótima bem resolvida com altos valores nodais (valores de ML e valores de suporte, respectivamente). Por artefato filogenético nos referimos a situações em que agrupamentos filogenéticos entre terminais são resultado de associações incorretas e não-históricas, produto de dados inadequados (e.g., erro no alinhamento inicial) ou por limitação analítica no método de reconstrução filogenético (e.g., efeito de alta heterogeneidade de dados nucleotídicos por alta taxa mutacional com perda de sinal filogenético; Bergsten 2005; Kolaczkowski & Thornton 2009; Philippe & Roure 2011). Como aproximação analítica para tratar possíveis situações de dados inadequados aplicamos o critério paramétrico do Aliscore com dois níveis de intensidade de filtragem (Kück et al. 2010). No primeiro nível de filtragem (“baixo”), *gaps* são



tratados como *missing data* (similar à condição de tratamento de *gaps* em análises filogenéticas por verossimilhança) e as matrizes geradas foram chamadas de “N” (e.g., para o marcador 16S é “16S\_N”). Na aproximação de maior “adstringência” (= “alta filtragem”), o número de sítios a serem comparados na geração do índice de similaridade (denominados *window*) é reduzido ao mínimo permitido pelo algoritmo (*window* de 4 nucleotídeos, comando “rw4”). A matriz derivada foi denominada “Nr4” (e.g., para o 18S seria “18S\_Nr4”). Portanto, cada marcador apresenta três matrizes associadas: uma “não editada” (e.g., 18S), e aquelas com intensidade de filtragem de regiões hiper-variáveis baixa (e.g., 18S\_N) e alta (e.g., 18S\_Nr4). Finalmente, realizamos a construção das três matrizes combinadas multilocus para cada tipo de matriz de dado (16S18S28S, 16S18S28S\_N e 16S18S28S\_Nr4) no SequenceMatrix (Vaidya et al. 2010), com matrizes até ~6.250 posições (16S18S28S; ver Tabela 2). Nos casos em que o terminal/espécie em estudo não estiver representado por determinado(s) marcador(es), foi considerado como *missing data*. Assim, nossa estratégia de matrizes de análises tem duas aproximações diferentes, permitindo-nos obter resultados de filogenias gênicas e multilocus, com e sem filtragem em cada caso, totalizando 12 análises filogenéticas individuais (Tabela 2).

### **Análises filogenéticas e métodos de suporte**

Procedemos 250 réplicas de análises filogenéticas para cada matriz de dados no método de verossimilhança, com o programa RAxML v7.3.0 (Stamatakis et al. 2005; Rokas 2011), com os parâmetros *default* de distribuição gama (gerada pelos próprios dados na análise) sem tratamento de dados invariáveis (perfil de análise “GTR+GAMMA”; veja manual do software). Para matrizes multilocus, cada marcador molecular foi considerado como uma partição, assim o cálculo de verossimilhança específico de cada marcador não influi no cálculo dos demais, evitando artefatos relacionados a diferenças nas taxas de evolução dos diferentes genes analisados (Tabela 2). Diferentes estratégias de suporte foram adotadas buscando aproveitar o tipo de informação e objetividade de cada método. Para os métodos paramétricos aplicamos aLRT (*approximate likelihood ratio test*) e aBAYES (*approximate transformation Bayes test*), para métodos não-paramétricos aplicamos BS (*bootstrap*) e SH-aLRT (Shimodaira–Hasegawa-like *test*) (Anisimova & Gascuel 2006; Anisimova et al. 2011). Análises de BS para matrizes multilocus foram

realizadas no RAxML v7.3.0 (1.000 réplicas BS em condições similares às análises originais); valores de aLRT, SH-aLRT e aBAYES foram calculados para cada árvore de melhor valor de verossimilhança para cada abordagem (multilocus e individuais) no PhyML 3.0.1 beta (parâmetros de análise similares às análises originais em RAxML; Guindon et al. 2010). Estabelecemos valores de “qualidade relativa” do suporte nodal *i.e.* pFN (potenciais falsos negativos para métodos não-paramétricos) e pFP (potenciais falsos positivos para os paramétricos) visando uma aproximação de comparação que permitisse aplicar nosso conhecimento sobre as limitações de cada método e discutir os valores obtidos. Assim, estabelecemos resultados como condição de pFN nodal (**BS < 75** / SH-aLRT  $\geq$  0.85 / aBAYES  $\geq$  0.95 / aLRT  $\geq$  0.9) e pFP nodal (BS < 75 / SH-aLRT  $\leq$  0.85 / **aBAYES  $\geq$  0.95** / aLRT  $\leq$  0.9; em negrito destacam-se os valores de suporte mais relevantes na nossa definição de pFN e pFP, respectivamente) (Figuras 1-3 e Figuras Suplementares 3-11; Tabela 2). Valores de qualidade nodal são discutidos em Anisimova et al. (2011), inclusive com resultados experimentais (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/benchmarks/>). Finalmente, gráficos de transição vs transversão foram criados para avaliar as condições de saturação nos marcadores 16S e 18S (Figura Suplementar 12).

Tabela 1 - Espécies de Leptohecata analisadas em relação à nova taxonomia proposta no capítulo. A coluna "Táxon / Categoria" refere-se aos grupos e linhagens destacados no resultado principal das análises (16S18S28S\_N; a ordem dos gêneros e espécies na tabela não implica monofiletismo nos nossos resultados). Nos Leptohecata a coluna "Família (no WoRMS)" destaca a família em que gênero ou espécie analisado está classificado na base de dados WoRMS; para os grupos externos, a coluna Gên/Esp Gên//Esp refere-se ao número de gêneros/número de espécies estimado para cada família (taxonomia e dados de espécies a partir da base de dados WoRMS e Collins et al. 2009). A coluna "S\_s" refere-se ao número de espécies proposto no WoRMS para o gênero, e o número de espécies do gênero em nossa análise, respectivamente. As colunas "16S info", "18S info" e "28S info" apresentam os códigos do GenBank para cada marcador molecular: marcadores obtidos neste estudo são indicados com o código "lem", sendo os marcadores incompletos indicados com o número de fragmentos obtidos em relação à totalidade de fragmentos esperados (e.g., lem\_4/5); marcadores obtidos de diferentes espécimes têm as informações do marcador e o seu código correspondente nas colunas de voucher, localidade/região e país/região marcadas em cinza. "no ID" refere-se aos casos em que não foi possível estabelecer alguma informação sobre a origem do material (i.e., voucher e/ou localidade/região e/ou país/região). Células de espécies com símbolo \* destacam aquelas espécies consideradas potenciais erros de identificação ou contaminação; células com símbolo \*\* destacam espécies consideradas com posição incerta; células com símbolo \*\*\* destacam aquelas espécies que apresentam identificação taxonômica diferente no GenBank ou WoRMS.

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Subclasse									
Leptohecata									
Clado A - Ordem Lafoeida <i>sensu novum</i>									
	Syntheceiidae	1	<i>Hincksella</i> sp	1_1	KU_570			no ID	no ID
	Lafoeidae	2	<i>Lafoea dumosa</i>	11_1	lem	lem	lem	lem_27A	Antártica
		3	<i>Acryptolaria conferta</i>	38_1	AM887981			no ID	Marrocos
Linhagem 1 (L1)	Melicertidae	4	<i>Melicertum octocostatum</i>	4_1	FJ550510	FJ550595	FJ550451	MHN:48744	Noruega
	Campanulinidae	5	<i>Stegella lobata</i>	1_1	FN424119	AY789778		no ID	Antártica
								641AN	Antártica
Clado B - Ordem Laodiceida <i>taxon novum</i>									
	Laodiceidae	6	<i>Laodicea undulata</i>	10_1	FJ550471		FJ550390	MHN:31753	França
		7	<i>Melicertissa</i> sp.	7_1	AY512515	AF358075	AY920798	no ID	Ilha d Guam
								no ID	no ID
	Tiarannidae	8	<i>Modeeria rotunda</i>	2_1	FJ550476	FJ550540	FJ550396	MHN:32967	França
		9	<i>Stegopoma plicatile</i>	5_1	FJ550513	FJ550598	FJ550454	MHN:48755	Noruega
Linhagem 2 (L2)	Hebellidae	10	<i>Anthohebella parasitica</i>	6_1	AY787918	EU272603	EU272545	MHN:29762	Espanha
		11	<i>Hebella scandens</i>	15_2	lem			lem_S44	Brasil
		12	<i>Hebella venusta</i>		FJ550496	FJ550574	FJ550431	MHN:35476	Honduras
		13	<i>Scandia gigas</i>	6_1	AY787919			MHN:29764	Espanha
	Haleciidae	14	<i>Hydrodendron gardineri</i> **	24_1	AY787923			MHN:32618	Tailândia

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
	Laodiceidae	15	<i>Staurodiscus gotoi</i>	15_1	FJ550472	FJ550535	FJ550391	MHN:33467	N Zelândia
Clado C - Ordem Statocysta									
Subordem									
Campanulinida									
<i>sensu novum</i>									
	Campanulinidae	16	<i>Calycella syringa</i>	4_1	AY789833	AY789776	FJ550372	664MA no ID	EUA França
		17	<i>Campanulina panicula</i>	7_2	FJ550511	FJ550596	FJ550452	MHN:48748	Noruega
		18	<i>Campanulina pumila</i> ***		AY789834	AY789777		781MA	EUA
	Mitrocomidae	19	<i>Mitrocomella brownei</i>	9_2		FJ550521	FJ550374	no ID	França
		20	<i>Mitrocomella niwai</i>		FJ550473	FJ550536	FJ550392	no ID	N Zelândia
	Phialellidae	21	<i>Phialella quadrata</i>	10_1	FJ550474	FJ550537	FJ550393	MHN:33466	N Zelândia
	Tiaropsidae	22	<i>Tiaropsidium kelseyi</i>	7_1	AY512517	AF358079	EU305537	AGC1033	EUA
		23	<i>Tiaropsis multicirrata</i>	1_1	FJ550468	FJ550531	FJ550386	no ID	Islândia
Linhagem 3 (L3)	Campanulinidae	24	<i>Opercularella lacerata</i>	4_1	lem	lem	lem_4/5	MZUSP:1848	EUA
Subordem Eirenida									
<i>taxon novum</i> (C_1)									
Superfamília									
Eirenoidea									
<i>sensu novum</i>									
	Aequoreidae	25	<i>Aequorea aequorea</i>	22_5	AY512518	AF358076	EU305505	no ID	EUA
		26	<i>Aequorea conica</i>		HM053552			IOCAS:36021	China
		27	<i>Aequorea coerulescens</i>		KU_575			no ID	no ID
		28	<i>Aequorea floridana</i>				EU305506	AGC333	Bahamas
		29	<i>Aequorea victoria</i>		EU305469	AF358077	AY920799	no ID	no ID
		30	<i>Rhacostoma atlantica</i> ***	1_1	lem	lem	lem	lem_S65	Brasil
	Blackfordiidae	31	<i>Blackfordia virginica</i>	3_1	lem	lem	lem	lem_S42	Brasil
	Eirenidae	32	<i>Eirene hexanemalis</i>	23_5	FJ418647			LMZ-200612-2	China
		33	<i>Eirene kambara</i>		FJ418649	FJ418670		LMZ-200704	China
		34	<i>Eirene lacteoides</i>		FJ418650	FJ418671		LMZ-200712	China
		35	<i>Eirene pyramidalis</i>		FJ418652	FJ418673		LMZ-200705	China
		36	<i>Eirene viridula</i>		FJ550502	FJ550588	FJ550445	no ID	França
		37	<i>Eutonina indicans</i>	2_1	lem		lem_3/5	lem_S131	Brasil
	Malagazziidae	38	<i>Octophialucium indicum</i>	8_1	AY787897	EU272626	EU272577	MHN:29970	N Zelândia
	Sugiuridae	39	<i>Sugiura chengshanense</i>	1_1	HM053546			IOCAS:36023	China
Clado ("Eirenidae" + Lovenellidae) (C_2)									
	Eirenidae	40	<i>Eirene ceylonensis</i>	23_2	FJ418647	FJ418669		LMZ-200612-1	China
		41	<i>Eirene menoni</i>		FJ418651	FJ418672		LMZ-200706	China
		42	<i>Eugymnanthea japonica</i>	3_1	AY285162	FJ418674		no ID	China

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
								no ID	Japão
		43	<i>Eutima curva</i>	24_5	FJ550514	FJ550599	FJ550455	MHN:33468	N Zelândia
		44	<i>Eutima gegenbauri</i>		FJ550515	FJ550600	FJ550456	MHNG INVE31748	França
		45	<i>Eutima krampi</i>		FJ418653	FJ418675		LMZ-200606-1	China
		46	<i>Eutima levuka</i>		FJ418654	FJ418676		LMZ-200707	China
		47	<i>Eutima sapinha</i>			EU305493	EU305515	AL548	no ID
		48	<i>Helgicirrha brevistyla</i>	11_2	FJ418655	FJ418677		LMZ-200606-2	China
		49	<i>Helgicirrha malayensis</i>		FJ418645	FJ418668		LMZ-200612-3	China
	Lovenellidae	50	<i>Eucheilota maculata</i>	18_2	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S132</b>	Brasil
		51	<i>Eucheilota menoni</i>		FJ550493	FJ550570	FJ550427	MHN:33457	N Zelândia
		52	<i>Hydranthea margarica</i>	1_1	DQ855932	FJ550567	FJ550424	no ID	Espanha
Subordem Proboscoida <i>sensu</i> <i>novum</i> (Clado C_3) Infraordem Campanulariida <i>sensu novum</i> (C_3.1)									
	Bonneviellidae	53	<i>Bonneviella regia</i>	10_4	AY789805	AY789740		818AS	EUA
		54	<i>Bonneviella</i> sp. 2 819AS		AY789806	AY789741		819AS	EUA
		55	<i>Bonneviella</i> sp. 3 830AS		AY789807	AY789742		830AS	EUA
		56	<i>Bonneviella</i> sp. 4 839AS		AY789808	AY789743		839AS	EUA
	Campanulariidae	57	<i>Campanularia hincksii</i>	36_2	AY789794	AY789794		37IT	Itália
		58	<i>Campanularia</i> sp.		FN424118	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_17A</b>	Antártica
		59	<i>Campanularia volubilis</i>		AY789804	AY789739		USNM:1106166	EUA
		60	<i>Orthopyxis everta</i>	16_3	AY789793	AY789728		66IT	Itália
		61	<i>Orthopyxis everta</i> 2***		FJ550466		FJ550383	no ID	N Zelândia
		62	<i>Orthopyxis integra</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:4107</b>	Brasil
		63	<i>Orthopyxis sargassicola</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:4247</b>	Brasil
		64	<i>Rhizocaulus verticillatus</i>	2_1	AY789803	AY789738		USNM:1106183	EUA
		65	<i>Silicularia rosea</i>	3_1	FJ550482	FJ550549	FJ550406	MHN:25072	N Zelândia
Infraordem Obeliida <i>taxon novum</i> (C_3.2)									
	Campanulariidae	66	<i>Clytia hummelincki</i>	58_6	AY789809	AY789744		856SA	África do Sul
		67	<i>Clytia gracilis</i>		DQ068062	DQ068052		USNM:1078723	Brasil
		68	<i>Clytia hemisphaerica</i>		AY789814	AY789753	FJ550457	826NS	Dinamarca
								no ID	França
		69	<i>Clytia hemisphaerica</i> 2***		AY346365			no ID	no ID
		70	<i>Clytia linearis</i>		AY789810	AY789748		USNM:1078729	EUA

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
		71	<i>Clytia noliformis</i>		DQ064792	EU272611	EU272554	no ID	Brasil
								no ID	Brasil
		72	<i>Clytia paulensis</i>		AY346361	AY789746		USNM:1106158	Itália
		73	<i>Gonothyraea loveni</i>	3_2	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1845</b>	EUA
		74	<i>Gonothyraea inornata</i> ***		AY789822	AY789761		564WA	EUA
		75	<i>Laomedea calceolifera</i>	6_2	AY789829	AY789768	FJ550447	721MA	EUA
								MHN:37296	França
		76	<i>Laomedea flexuosa</i>		AY789824	AY789763		864IC	Islândia
		77	<i>Obelia bidentata</i>	10_4	AY789815	AY789754	FJ550446	76NC	EUA
								MHN:37294	França
		78	<i>Obelia dichotoma</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1776</b>	EUA
		79	<i>Obelia geniculata</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1866</b>	EUA
		80	<i>Obelia longissima</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1807</b>	EUA
	Eirenidae	81	<i>Eirene brevistylis</i> *	23_1	FJ418646			no ID	China
	Lovenellidae	82	<i>Eucheilota bakeri</i> *	18_3	AY789831	AY789774		704CA	EUA
		83	<i>Lovenella gracilis</i>	13_1	AY789830	AY789773		848NJ	EUA
Linhagem 4 (L4)	Lafoeidae	84	<i>Billardia subrufa</i> **	4_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S124</b>	Antártica
Clado ((D,E)(F(G(H,I)))) - Ordem Macrocolonia									
Subordem									
Staurothecida <i>taxon novum</i>									
Staurothecidae									
<i>família nova</i> (D)	Sertulariidae	85	<i>Staurotheca antarctica</i>	24_4	FN424141	<b>lem</b>	<b>lem_4/5</b>	<b>lem_S155</b>	Antártica
		86	<i>Staurotheca compressa</i>		FN424143			no ID	Antártica
		87	<i>Staurotheca nonscripta</i>		FN424144			no ID	Antártica
		88	<i>Staurotheca pachyclada</i>		FN424145			no ID	Antártica
Symplectoscyphidae									
<i>família nova</i> (E)	Sertulariidae	89	<i>Antarctoscyphus elongatus</i>	10_3	FN424138			<b>lem_S154</b>	Antártica
		90	<i>Antarctoscyphus grandis</i>		FN424139	<b>lem</b>	<b>lem_2/5</b>	<b>lem_46A</b>	Antártica
		91	<i>Antarctoscyphus spiralis</i>		FN424140	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S151</b>	Antártica
		92	<i>Symplectoscyphus curvatus</i>	104_7	FN424146	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S156</b>	Antártica
		93	<i>Symplectoscyphus exochus</i>		FN424147	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S123</b>	Antártica
		94	<i>Symplectoscyphus glacialis</i>		FN424148	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S153</b>	Antártica
		95	<i>Symplectoscyphus liouvillei</i>		FN424149			no ID	Antártica
		96	<i>Symplectoscyphus plectilis</i>		FN424150			no ID	Antártica
		97	<i>Symplectoscyphus tricuspидatus</i>		AY787907			MHN:29953	Islândia
Subordem Haleciida									
<i>sensu novum</i> (F)									

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Superfamília Halecioidea Haleciidae <i>sensu novum</i>	Haleciidae	98	<i>Halecium beanii</i>	119_13	FJ550488	FJ550560	FJ550417	MHN:34009	África do Sul
		99	<i>Halecium delicatulum</i>		FN424123			no ID	Antártica
		100	<i>Halecium halecinum</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1782</b>	EUA
		101	<i>Halecium incertus</i>		FN424124	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_150</b>	Antártica
		102	<i>Halecium labrosum</i>		AY787916	FJ550550	FJ550407	MHN:29030	Islândia
		103	<i>Halecium lankesterii</i> ***		AM888316			no ID	Reino Unido
		104	<i>Halecium lenticulare</i>		FJ550469	FJ550532	FJ550387	MHN:33461	N Zelândia
		105	<i>Halecium mediterraneum</i>		FJ550492	FJ550566	FJ550423	MHN:34437	França
		106	<i>Halecium mirabile</i> ***		KU_569			no ID	no ID
		107	<i>Halecium muricatum</i>		AY787915	EU272619	FJ550408	MHN:29028	Islândia
		108	<i>Halecium petrosum</i>		AY787893			MHN:29763	Espanha
		109	<i>Halecium pusillum</i>		FJ550499	FJ550580	FJ550437	MHN:36295	França
		110	<i>Halecium tenellum</i>		AM888322			no ID	Reino Unido
Subordem Sertulariida <i>taxon novum</i> (Clado G) Sertularellidae <i>família nova</i> (G_1)	Sertulariidae	111	<i>Sertularella africana</i>	124_11	FJ550490	FJ550563	FJ550420	MHN:34017	África do Sul
		112	<i>Sertularella diaphana</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1725</b>	Brasil
		113	<i>Sertularella ellisii</i>		FJ550478	FJ550545	FJ550402	MHN:32156	Espanha
		114	<i>Sertularella gayi</i>			FJ550579	FJ550436	MHN:36302	França
		115	<i>Sertularella mediterranea</i>		FJ550479	FJ550546	FJ550403	MHN:32948	França
		116	<i>Sertularella polyzonias</i>		AM888340			no ID	G de Cádiz
		117	<i>Sertularella robusta</i>		AM888339			no ID	G de Cádiz
		118	<i>Sertularella rugosa</i>		AY787906			MHN:29032	Islândia
		119	<i>Sertularella sanmatiasensis</i>		FN424141	<b>lem</b>	<b>lem_4/5</b>	<b>lem_S158</b>	Antártica
		120	<i>Sertularella tenella</i>			<b>lem_2/3</b>	<b>lem_1/5</b>	<b>lem_S112</b>	Brasil
		121	<i>Symplectoscyphus turgidus</i> *	104_1	FJ550462	FJ550524	FJ550377	MHN:29467	EUA
Thyroscyphidae (G_2)	Thyroscyphidae	122	<i>Thyroscyphus ramosus</i>	10_2	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1664</b>	Brasil
		123	<i>Thyroscyphus marginatus</i>		FJ550495	FJ550573	FJ550430	MHN:35477	Honduras
		124	<i>Sertularelloides cylindritheca</i> ***	1_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>		<b>MZUSP:1677</b>	Brasil
Sertulariidae <i>sensu novum</i> (G_3)	Lafoeidae	125	<i>Abietinella operculata</i>	1_1	FN424136			no ID	Antártica
		126	<i>Cryptolaria pectinata</i>	4_1	AM887994			no ID	G de Cádiz



Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
		127	<i>Zygophylax biarmata</i>	47_1	AM888343			no ID	G de Cádiz
	Sertulariidae	128	<i>Abietinaria abietina</i>	37_2	FJ550484	FJ550554	FJ550411	MHN:29446	Islândia
		129	<i>Abietinaria filicula</i>		FJ550485	FJ550555	FJ550412	MHN:29947	Islândia
		130	<i>Amphisbetia minima</i>	29_2	AY787903	EU272602	EU272544	MHN:25071	N Zelândia
		131	<i>Amphisbetia operculata</i>		FJ550489	FJ550561	FJ550418	MHN:34014	África do Sul
		132	<i>Diphasia fallax</i>	28_2	AY787901	EU305491	FJ550414	MHN:29950	Islândia
		133	<i>Diphasia rosacea</i>		AM888306			no ID	Reino Unido
		134	<i>Dynamena crisioides</i>	18_5	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_4/5</b>	<b>MZUSP:1679</b>	Brasil
		135	<i>Dynamena disticha</i>		AY787909			MHN:29754	Espanha
		136	<i>Dynamena moluccana</i>		FJ550494	FJ550572	FJ550429	no ID	Tailândia
		137	<i>Dynamena obliqua</i>		KU_565			no ID	no ID
		138	<i>Dynamena pumila</i>		AY787902	FJ550558	FJ550415	MHN:29026	Islândia
		139	<i>Hydrallmania falcata</i>	4_1	FJ550487	FJ550559	EU305519	MHN:29948	Islândia
		140	<i>Idiellana pristis</i>	2_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_4/5</b>	<b>MZUSP:1651</b>	Brasil
		141	<i>Salacia desmoides</i>	22_1	FJ550464	FJ550528	FJ550381	no ID	França
		142	<i>Sertularia argentea</i>	60_8	FJ550461	FJ550520	FJ550373	no ID	França
		143	<i>Sertularia cupressina</i>		FJ550475	FJ550539	FJ550395	MHN:29949	Islândia
		144	<i>Sertularia distans</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1705</b>	Brasil
		145	<i>Sertularia marginata</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1656</b>	Brasil
		146	<i>Sertularia perpusilla</i>		AY787894		EU305532	MHN:29765	Espanha
		147	<i>Sertularia tumida</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S54</b>	Brasil
		148	<i>Sertularia turbinata</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1704</b>	Brasil
		149	<i>Sertularia unguiculata</i>		AY787904			MHN:29969	N Zelândia
		150	<i>Thuiaria thuja</i>	49_2	AY787908	EU305503	EU305536	MHN:29951	Islândia
		151	<i>Thuiaria cornigera</i> ***			Z92899		no ID	no ID
Linhagem 5 (L5)	Haleciidae	152	<i>Hydrodendron mirabile</i>	24_1	DQ855933	FJ550568	FJ550425	MHN:34779	Espanha
		153	<i>Nemalecium lighti</i>	2_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S17</b>	Brasil
Subordem Plumupheniida <i>taxon novum</i> (H,I) Infraordem Aglaopheniida <i>taxon novum</i> (Clado H) Aglaopheniidae	Aglaopheniidae	154	<i>Aglaophenia acacia</i>	70_14	FJ550507			MHN:37535	Itália
		155	<i>Aglaophenia elongata</i>		FJ550508	FJ550593	FJ550450	MHN:37539	Itália
		156	<i>Aglaophenia harpago</i>		FJ550506	FJ550592	FJ550449	MHN:37531	Itália
		157	<i>Aglaophenia kirchenpaueri</i>		AM887983	DQ831276		no ID	Reino Unido
		158	<i>Aglaophenia latecarinata</i>		<b>lem</b>			<b>lem_S48</b>	Brasil



Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
		159	<i>Aglaophenia lophocarpa</i>		AM887988			no ID	G de Cádiz
		160	<i>Aglaophenia octodonta</i>		AM887989	FJ550541	FJ550397	MHN:32875	França
		161	<i>Aglaophenia parvula</i>		DQ855914			MHN:34013	África do Sul
		162	<i>Aglaophenia picardi</i>		AY787891			MHN:29758	Espanha
		163	<i>Aglaophenia pluma</i>		DQ855916	FJ550542	FJ550398	MHN:38220	França
		164	<i>Aglaophenia rhynchocarpa</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1656</b>	Brasil
		165	<i>Aglaophenia struthionides</i>		KU_332			no ID	no ID
		166	<i>Aglaophenia tubiformis</i>		AM887991	EU272601	EU272543	MHN:32960	França
		167	<i>Aglaophenia tubulifera</i>		AM887992			no ID	Reino Unido
		168	<i>Cladocarpus integer</i>	52_1	FJ550512	FJ550597	FJ550453	MHN:48754	Noruega
		169	<i>Gymnangium gracilicaule</i>	38_3	DQ855934	FJ550585	FJ550442	MHN:36839	Madagascar
		170	<i>Gymnangium hians</i>		AY787922	Z86122		MHN:32586	Tailândia
								no ID	no ID
		171	<i>Gymnangium montagui</i>		AM888313			no ID	Reino Unido
		172	<i>Lytocarpia phyteuma</i>	39_2	AY787921			MHN:32597	Tailândia
		173	<i>Lytocarpia canepa</i> ***		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_4/5</b>	<b>lem_S139</b>	Argentina
		174	<i>Lytocarpia</i> sp.		FJ550505	FJ550591	FJ550448	MHN:36828	Madagascar
		175	<i>Macrorhynchia philippina</i>	25_2	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1728</b>	Brasil
		176	<i>Macrorhynchia phoenicea</i>		DQ855935	FJ550584	FJ550441	MHN:36813	Madagascar
		177	<i>Macrorhynchia phoenicea</i> 2***		FJ550500	FJ550586	FJ550443	MHN:36832	Madagascar
Infraordem Plumulariida sensu novum (Clado I)									
Schizotrichidae (I_1)	Halopterididae	178	<i>Schizotricha crassa</i>	21_5	FN424125	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S162</b>	Antártica
		179	<i>Schizotricha falcata</i>		FN424126	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S157</b>	Antártica
		180	<i>Schizotricha nana</i>		FN424127	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S127</b>	Antártica
		181	<i>Schizotricha trinematotheca</i>		FN424128			no ID	Antártica
		182	<i>Schizotricha turqueti</i>		FN424129	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S159</b>	Antártica
Kirchenpaueriidae (I_2)	Kirchenpaueriidae	183	<i>Kirchenpaueria pinnata</i>	14_1	AY787911	FJ550578	FJ550435	MHN:29965	França
		184	<i>Kirchenpaueria pinnata</i> 2***		DQ855923	FJ550581	FJ550438	MHN:36296	França
		185	<i>Oswaldella grandis</i>	26_5	FN424139	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_13A</b>	Antártica
		186	<i>Oswaldella incognita</i>		FN424133			no ID	Antártica
		187	<i>Oswaldella laertesi</i>		FN424134	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S129</b>	Antártica
		188	<i>Oswaldella shetlandica</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S128</b>	Antártica
		189	<i>Oswaldella stepanjantsae</i>		FN424135	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S130</b>	Antártica
		190	<i>Pycnotheca mirabilis</i>	3_1	FJ550465	FJ550529	FJ550382	MHN:25847	N Zelândia

Táxon / Categoria	Família (WoRMS)	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Halopterididae (I_3)	Halopterididae	191	<i>Ventromma haleciooides</i> ***	3_1	AY787895	FJ550530	FJ550385	MHN:29766	França
		192	<i>Ventromma haleciooides 2</i> ***		<b>lem</b>		<b>lem_2/5</b>	<b>lem_S106</b>	Brasil
		193	<i>Antennella ansini</i>	23_3	FJ550470	FJ550533	FJ550388	MHN:32157	Espanha
		194	<i>Antennella kiwiana</i>		DQ855918	FJ550534	FJ550389	MHN:33623	N Zelândia
		195	<i>Antennella secundaria</i>		DQ883445	FJ550575	FJ550432	MHN:32969	França
		196	<i>Halopteris alternata</i>	35_8	DQ855939			no ID	Brasil
		197	<i>Halopteris catharina</i>		DQ855920	FJ550517	FJ550370	no ID	França
		198	<i>Halopteris carinata</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1681</b>	Brasil
		199	<i>Halopteris diaphana</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1662</b>	Brasil
		200	<i>Halopteris liechtensternii</i>		AY787888	FJ550526	FJ550379	MHN:30116	Espanha
		201	<i>Halopteris minuta</i>		AY787912	EU272620	EU272567	MHN:25073	N Zelândia
		202	<i>Halopteris schucherti</i>			FJ550577	FJ550434	no ID	Chile
		203	<i>Halopteris tenella</i>		DQ855938			AL575	Brasil
Plumulariidae (I_4)	Plumulariidae	204	<i>Monostaechas quadridens</i>	6_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:4632</b>	Brasil
		205	<i>Polyplumaria flabellata</i> ***	8_1	AM888338			no ID	Marrocos
		206	<i>Dentitheca bidentata</i>	4_1	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP1731</b>	Brasil
		207	<i>Nemertesia antennina</i>	43_2	AY787910	EU305498	EU305523	MHN:29954	França
		208	<i>Nemertesia ventriculiformis</i>		AM888336			no ID	Marrocos
		209	<i>Plumularia filicaulis</i>	89_10	DQ855926	FJ550565	FJ550422	MHN:34020	África do Sul
		210	<i>Plumularia habereri</i>			FJ550571	FJ550428	no ID	Tailândia
		211	<i>Plumularia habereri 2</i> ***		DQ855927			no ID	Tailândia
		212	<i>Plumularia hyalina</i>		AY787913	FJ550552	FJ550409	MHN:25333	Reino Unido
		213	<i>Plumularia insignis</i>			<b>lem_1/3</b>	<b>lem_2/5</b>	<b>lem_S134</b>	Argentina
214	<i>Plumularia lagenifera</i>		DQ855928	FJ550527	FJ550380	MHN:25120	EUA		
215	<i>Plumularia margaretta</i>		FJ550483	FJ550553	FJ550410	MHN:29760	Espanha		
216	<i>Plumularia margaretta 2</i> ***		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>MZUSP:1734</b>	Brasil		
217	<i>Plumularia setacea</i>		<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem</b>	<b>lem_S144</b>	Argentina		
218	<i>Plumularia obliqua</i>		DQ855929	FJ550544	FJ550401	no ID	França		
219	<i>Plumularia pulchella</i>		DQ855930	FJ550562	FJ550419	MHN:34016	África do Sul		
220	<i>Plumularia spiralis</i>		AY787920	FJ550569	FJ550426	MHN:32600	Tailândia		
Táxon / Categoria	G/Sp G//Sp	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Ordem									
“Anthoathecata”									
Subordem									
Capitata									
Corynidae	13/55 3//3	221	<i>Coryne pintneri</i>	19_1	AJ878717	GQ424330	GQ424303	MHN:31976	França
		222	<i>Sarsia lovenii</i>	11_1	GQ395329	GQ424337	GQ395329	MHN:48736	Noruega

Táxon / Categoria	G/Sp G//Sp	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
		223	<i>Stauridiosarsia ophiogaster</i> ***	8_1	EU305473	EU272615	EU272560	MHN:32963	França
Cladocorynidae	2/7 1//1	224	<i>Cladocoryne floccosa</i>	7_1	lem	lem	lem	lem_S40	Brasil
								MHN:34228	França
Moerisiidae	3/10 1//1	225	<i>Moerisia inkermanica</i>	9_1	lem	lem	lem	lem_S41	Brasil
Pennariidae	1/5 1//1	226	<i>Pennaria disticha</i>	5_1	lem	lem	lem	MZUSP:1670	Brasil
Porpitiidae	2/3 1//1	227	<i>Porpita porpita</i>	2_1	AY935322	GQ424319	EU883551	no ID	México
								no ID	no ID
Zanclidae	3/40 1//1	228	<i>Zanclaea prolifera</i>	33_1	EU305488	EU272639	EU272598	no ID	no ID
Subordem									
Aplanulata									
Candelabridae	3/18 1//1	229	<i>Candelabrum cocksii</i>	13_1	AY512520	AY920758	AY920796	MHN:29591	França
								no ID	França
Corymorphidae	11/75 1//1	230	<i>Corymorpha pendula</i>	42_1	EU876538	EU876565	EU879936	KUNHM:2962	EUA
Hydridae	1/40 1//1	231	<i>Hydra circumcincta</i>	40_1	GU722769	EU876568	EU879939	DMAK13c	EUA
Tubulariidae	7/68 1//2	232	<i>Ectopleura obypa</i>	33_2	lem	lem	lem	MZUSP:0257	Brasil
		233	<i>Ectopleura larynx</i>		lem	lem	lem	MZUSP:1807	EUA
Subordem									
Filifera I									
Eudendriidae	2/75 1//3	234	<i>Eudendrium caraiuru</i>	1_3		lem	lem	lem	lem_S105
		235	<i>Eudendrium carneum</i>		lem	lem	lem	MZUSP:1700	Brasil
		236	<i>Eudendrium glomeratum</i>		AM991301	lem	lem	lem_S58	Itália
									França
Ptilocodiidae	5/9 1//1	237	<i>Hydrichthella epigorgia</i>	2_1	EU305478	EU272622	EU272569	KUNHM:2665	no ID
Proboscidactylidae	1/9 1//1	238	<i>Proboscidactyla ornata</i>	9_1	EU305481	EU272631	EU272587	KUNHM:2767	no ID
Laingiidae	3/4 1//1	239	<i>Fabienna sphaerica</i>	2_1	AM183133	AY920767	AY920797	MHN:33453	N Zelândia
Subordem									
Filifera III									
Hydractiniidae	13/119 1//1	240	<i>Hydractinia</i> sp. Chile	1_1	lem	lem	lem	lem_S104	Chile
Stylasteridae	28/280 1//1	241	<i>Adelopora crassilabrum</i>	1_1	EU645356	EU272642	EU272541	USNM:1027760	N Caledônia
Subordem									
Filifera IV									
Bougainvilliidae	15/99 2//2	242	<i>Bimeria vestita</i>	7_1	lem	lem	lem	MZUSP:1651	Brasil
		243	<i>Bougainvillia muscus</i>	29_1	lem	lem	lem	MZUSP:4104	Brasil
Cytaeididae	3/17 1//1	244	<i>Perarella schneideri</i>	1_1	AM411414	HM357626	HM357628	MHN:49086	Itália
Pandeidae	21/96 1//1	245	<i>Leuckartiara octona</i>	19_1	AM411421	EU272624	AM411421	no ID	França
Oceaniidae	7/26 1//1	246	<i>Turritopsis nutricula</i>	8_1	lem	lem	lem	MZUSP:4093	Brasil
Rathkeidae	5/14 1//1	247	<i>Lizzia blondina</i>	5_1	AM411417	EU272625	EU272574	Sch493	França

Táxon / Categoria	G/Sp G//Sp	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Ordem									
Siphonophorae									
Subordem									
Calycophorae									
Prayidae	13/27 1//1	248	<i>Praya dubia</i>	2_1	AY935285	AY937326	AY935285	YPM:35346	EUA
Subordem									
Physonectae									
Apolemiidae	1/5 1//1	249	<i>Apolemia</i> sp. CWD-2005	5_1	AY935290	AY937331	EU272546	YPM:35090	O Pacífico
Physophoridae	1/2 1//1	250	<i>Physophora hydrostatica</i>	2_1	AY93531	AY935300	EU272582	YPM:35046	NO Atlântico
Subordem									
Cystonectae									
Physaliidae	1/1 1//1	251	<i>Physalia physalis</i>	1_1	AY935284	AY358065	EU448095	YPM:35345	EUA
Agalmatidae	11/23 1//1	252	<i>Cordagalma ordinata</i> ***	1_1	AY935275	AY937317	EU272555	YPM:35032	NO Atlântico
Forskaliidae	1/5 1//1	253	<i>Forskalia edwardsii</i> ***	5_1	AY935278	AY937354	EU305516	YPM:35036	NO Atlântico
Rhodaliidae	8/13 1//1	254	<i>Stephalia dilata</i>	2_1	AY935315	AY937357	EU305534	YPM:35358	México
Táxon / Categoria	G/Sp G//Sp	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Subclasse									
Trachylina									
Superfamília									
Narcomedusae									
Aeginidae	8/10 1//1	255	<i>Solmundella bitentaculata</i>	1_1	EU293998	EU247812	EU247795	MHN:31746 USNM:1107456	no ID Antártica
Superfamília									
Trachymedusae									
Geryoniidae	4/4 2//2	256	<i>Geryonia proboscidalis</i>	1_1	EU293979	EU247816	EU247807	JAMSTEC RB- BWD-4 Hy68.1.1	Japão N Atlântico
		257	<i>Liriope tetraphylla</i>	1_1	lem	lem	lem_4/5	lem_S10	Brasil
Rhopalonematidae	15/35 3//3	258	<i>Aglantha digitale</i>	3_1	EU293985	EU247821	AY920791	USNM:1073329 no ID	EUA no ID
		259	<i>Crossota rufobrunnea</i>	5_1	EU293986	EU247824	EU247800	JAMSTEC I060319b-N4	Japão
		260	<i>Pantachogon haeckeli</i>	3_1	EU293988	AF358062	AY920792	MBARI dive T981 SS1 no ID	no ID no ID
alicreatidae	6/9 1//1	261	<i>Botrynema brucei</i>	2_1	EU293982	EU247822	EU247798	no ID Hy07.2.3	Japão O Ártico
Superfamília									

Táxon / Categoria	G/Sp G//Sp	nro	Espécie	SP_sp	16S info	18S info	28S info	Voucher	Pais/Região
Limnomedusae									
Olindiidae	17/45 2//2	262	<i>Maeotias marginata</i>	1_1	AY512508	AF358056	EU247810	no ID	EUA
		263	<i>Olindias sambaquiensis</i>	6_1	lem	lem	lem	lem_S01	Brasil

Táxon / Categoria	Nro	16S info	18S info	28S info
<b>TOTAL Leptothecata</b>	<b>220</b>	211	165	139
<b>TOTAL "Anthoathecata"</b>	<b>27</b>	27	27	27
<b>TOTAL Siphonophorae</b>	<b>7</b>	7	7	7
<b>TOTAL Trachylina</b>	<b>9</b>	9	9	9
<b>TOTAL HYDROZOA</b>	<b>263</b>	<b>254</b>	<b>208</b>	<b>182</b>

## Resultados

Incorporamos ao conhecimento dados novos para 74 espécies de Leptothecata, totalizando 220 espécies de leptotecados analisadas. Além dessas, há 43 espécies usadas como grupo-externo (14 incorporadas nesse estudo), totalizando 263 espécies de Hydrozoa nas matrizes multilocus (Tabela 1). A partir da qualidade geral do suporte nodal da maioria dos nós, o resultado da hipótese de trabalho é o da matriz 16S18S28S\_N (ver Discussão; nova proposta taxonômica para Leptothecata destacada nas Figuras 1 e 4, e Tabelas 1 e 5).

## Grupos externos

A grande maioria das linhagens externas (Tabela 1) resultou como monofilética nas análises combinadas (e.g., Aplanulata; Figuras 1-3), mas cada análise resultou em um grupo de Hydroidolina diferente como grupo irmão dos leptotecados, sendo que a linhagem Filifera IV+*Hydractinia* sp. na análise 16S18S28S\_Nw4 (Figura 3) foi a única que apareceu na condição de alto suporte nodal (veja também os resultados das análises 28S\_N e 28S\_Nrw4; Figuras Suplementares 10 e 11). As filogenias gênicas de 16S apresentaram um artefato derivado da atração de ramos longos (*long branch attraction*), resultando em Leptothecata como não monofilético (e.g., Figura Suplementar 3).

## Linhagens basais de Leptothecata ou de seus grupos mais inclusivos

A linhagem basal de Leptothecata inclui duas espécies de Lafoeidae (*Lafoea dumosa* e *Acryptolaria conferta*) e *Hincksella* sp., formando o **clado A Lafoeida sensu novum** + *Hincksella*, com posição basal estável (Figuras 1-3; Tabela 3).

*Laodiceida taxon novum* é outra linhagem com posição estável e corroborada, incluindo espécies de Laodiceidae (monofilética ao se desconsiderar *Staurodiscus gotoi*) e Tiarannidae (não monofilética) (Figura 1).

Uma série de linhagens mono ou oligoespecíficas também aparecem em posições relativamente basais nas filogenias combinadas, ora monofiléticas ora relativamente próximas em termos patrísticos (Figura 1). Quando instáveis com relação ao seu posicionamento, foram aqui tratadas como “Linhagens” (marcadas com letra L).

Na base de Leptothecata ou de seus subgrupos mais inclusivos aparecem as seguintes linhagens tratadas à parte: *Stegella lobata* + *Melicertum octocostatum*; “Hebellidae” como um grado; e *Billardia subrufa* (Figuras 1-3, Tabela 3).

### **Statocysta**

A hipótese derivada de 16S18S28S\_N (Figura 1) corrobora Statocysta e Macrocolonia (Leclère e al. 2009), com alto suporte. Statocysta inclui a grande maioria de espécies com medusa no ciclo de vida (Figuras 1-3; Tabela 3), divididas em três grandes clados: Campanulinida *sensu novum* basal em relação aos clados irmãos Eirenida *taxon novum* (dividido em dois subclados) e Proboscoida *sensu novum* (também dividido em dois subclados) (Figuras 1-3).

O clado Campanulinida *sensu novum* inclui espécies de Campanulinidae (*Calycella syringa* e *Campanulina panicula*), Phialellidae (*Phialella quadrata* e *Opercularella pumila*), Mitrocomidae (*Mitrocomella brownei*, *Mitrocomella niwai* e *Tiaropsidium kelseyi*) e Tiarannidae (*Tiaropsis multicirrata*), sendo que apenas Mitrocomidae resulta como monofilética (Figura 1; ver valores altos de suporte nos nós). A posição do clado Campanulinida *sensu novum* como grupo irmão de Eirenida *taxon novum* + Proboscoida *sensu novum* ocorre nos resultados sem filtragem (16S18S28S) e de filtragem baixa (16S18S28S\_N), mas no de alta filtragem (16S18S28S\_Nrw4) Campanulinida *sensu novum* é grupo irmão de Eirenida *taxon novum* (Figuras 1-3; veja a discussão abaixo sobre efeito de *O. lacerata* na posição basal do clado Campanulinida *sensu novum*).

Há duas linhagens em Eirenida *taxon novum*, bem suportadas em todos os resultados combinados: Eirenoidea *sensu novum* e (Eirenidae\*<sup>1</sup> + Lovenellidae). O primeiro clado, Eirenoidea *sensu novum*, apresenta espécies de Aequoreidae (*Rhacostoma atlantica* e espécies de *Aequorea*), Eirenidae (*Eutonina indicans* e *Eirene* spp.), *Octophialucium indicum* (única espécie de Malagazziidae em nossa análise) e espécies de Blackfordiidae (*Blackfordia virginica*) e Sugiuridae (*Sugiura chengshanense*) (Figuras 1-3). O segundo clado, (Eirenidae\* + Lovenellidae), apresenta gêneros agrupados em duas linhagens com alto suporte na maioria dos nós para 16S18S28S e

---

<sup>1</sup> Destaca-se com o símbolo\* o clado que apresenta espécies consideradas tradicionalmente da família Eirenidae. Entretanto, nos nossos resultados principais estas espécies formam parte de uma linhagem separada (veja Figuras 1-3).

16S18S28S\_N, incluindo principalmente espécies de Eirenidae, como *Helgicirra*, *Eirene* (*Eirene menoni*, *Eirene ceylonensis*), e da família Lovenellidae (*Hydranthea margarica* e *Eucheilota menoni*). A linhagem irmã apresenta espécies do gênero *Eutima* e a espécie *Eugymnanthea japonica*.

A última linhagem de Statocysta, o clado Proboscoida *sensu novum*, inclui gêneros de Campanulariidae, Bonneviellidae, Lovenellidae (ver provável erro de identificação para *E. bakeri* abaixo); além da espécie *Eirene brevistylis* (Eirenidae) (Figura 1), que também atribuímos ser um potencial erro de identificação ou atração de ramos longos associada à sequência de 16S (ver Zheng et al. 2014). Dado o alto suporte nodal das duas linhagens principais, propomos nomes para seus dois novos táxons: Campanulariida *sensu novum* contém os gêneros *Orthopyxis*, *Campanularia*, *Bonneviella* e as espécies *Rhizocaulus verticillatus* e *Silicularia rosea*; a contraposição são os Obeliida *taxon novum* que estão representados quase na totalidade por Obeliidae (*Laomedea*, *Obelia*) e Clytiidae, além de Lovenellidae (com as espécies *Lovenella gracilis* e as nominais *Eucheilota bakeri* e *Eirene brevistylis*, provavelmente identificadas incorretamente) (Figura 1, Tabela 1).

### **Macrocolonia**

Este clado, o mais rico em espécies, foi dividido em grandes clados basais (clados D, E e F) e mais apicais (clados e subgrupos G, H e I), além das linhagens avulsas e de posição instável como *Billardia subrufa*, *Nemalecium lighti* e *Hydrodendron mirabile* (Figura 1; Tabela 3). Há demanda de reestruturação dos clados de Macrocolonia *sensu novum*, ao que propomos uma série de redefinições e novos táxons.

O **clado D** inclui espécies do gênero *Staurotheca*, sendo *Staurotheca antarctica* a única com os marcadores nucleares analisados. O suporte nodal do clado na topologia de trabalho é alto, mas diminui com aumento da filtragem de dados (Figuras Suplementares 6-8). Dada à distinção morfológica desse táxon, propomos a criação de Staurothecidae *família nova*.

O **clado E** corresponde à Symplectoscyphidae *família nova*, e inclui *Antarctoscyphus* e *Symplectoscyphus* (Figuras 1-3), gêneros monofiléticos e com alto suporte, à exceção de *Symplectoscyphus curvatus*.

O **clado F** corresponde aos Haleciida *sensu novum*, incluindo apenas espécies de *Halecium*, com alto suporte e uma posição estável nas diferentes análises multilocus, como grupo basal de Plumulariida *sensu novum*.



O **clado G** corresponde aos Sertulariida *taxon novum*, nos quais se caracterizam três clados: Sertularellidae *taxon novum* (grupo G\_1; inclui *Symplectoscyphus turgidus*); Thyroscyphidae (G\_2; com *Thyroscyphus* e *Sertularelloides cylindritheca*) e Sertulariidae (G\_3; em que apenas *Diphasia* resulta monofilético nas três análises multilocus). Os suportes nodais de clados de Sertulariida *taxon novum* diminuem com a filtragem dos dados (Figuras 1-3).

*Nemalecium lighti* e *Hydrodendron mirabile* são espécies tradicionalmente atribuídas a Haleciidae, cujas posições foram instáveis nas diferentes filtragens (**L-5**). Ressaltamos que, com a maior filtragem, *H. mirabile* forma um clado com *Hydrodendron gardineri* e este é grupo irmão de Aglaopheniida *taxon novum* e Plumulariida *sensu novum* (Figuras 1 e 3).

O **clado H** é definido como Aglaopheniida *taxon novum*, com a estrutura geral do clado mantida nas análises combinadas (Figuras 1-3; Tabela 3). Por último, o **Clado I** corresponde aos Plumulariida, *sensu novum*, com Schizotrichidae (**I\_1**; altos valores nodais nos três resultados combinados e posição relativa mantida nas análises multilocus), Kirchenpaueriidae (**I\_2**), Halopterididae (**I\_3**; em que nenhum dos gêneros tradicionais resultam monofiléticos nas análises combinadas) e Plumulariidae (**I\_4**; em que somente *Nemertesia* resulta monofilético).

Nas análises de relação de frequências transição: transversão (ts:tv) para 16S e 18S (28S não foi computado por limitações de *buffer* na última versão de DAMBE), a relação de valores entre os tipos de mudanças apresenta tendências diferentes, mas não há alterações substanciais nas diferentes matrizes gênicas analisadas. Para o 16S, as frequências relativas dos nucleotídeos e a relação ts:tv é muito similar nas análises sem filtragem e com filtragem mínima (Figura Suplementar 12; Tabela 2), mas as frequências se alteram e a relação ts:tv diminui o desvio original nas frequências nucleotídicas (Figura Suplementar 10; Tabela 2). Nas matrizes do marcador 18S, as frequências nucleotídicas praticamente não mudam em nenhuma das matrizes (sem/com filtragem). O ts:tv é similar para as análises das matrizes sem e com baixa filtragem, sendo que as curvas de ts:tv se separam com alta filtragem (Figura Suplementar 10; Tabela 2).

**Tabela 2** - Dados básicos e resultados obtidos nas análises filogenéticas, considerando cada matriz com e sem filtragem de dados; em negrito o resultado principal (multilocus: 16S1828S, 16S18S28S\_N, 16S18S28S\_Nrw4; filogenias gênicas: 16S, 16S\_N, 16S\_Nrw4, 18S, 18S\_N, 18S\_Nrw4, 28S, 28S\_N, 28S\_Nrw4). O número de espécies analisadas em cada caso, o número de sítios presentes nas matrizes, os sítios conservados-variáveis-com informação (para parcimônia)-*singletons* são informados. Percentuais do número de *gaps* e *missing data* totais são apresentados e, no caso do resultado da filtragem do programa Aliscore, apresentamos o número e porcentagem de sítios eliminados, respectivamente. O Log-likelihood apresentado representa o Log-likelihood total para os casos de matrizes combinadas e matrizes individuais (análise particionada para matrizes com mais de um marcador molecular calculada no programa RAxML). Informamos também frequências de nucleotídeos totais, proporção de sítios invariantes e frequências de tipos de mudanças nucleotídicas, calculadas nos programas PhyML e MEGA, junto com os resultados de cálculos de parâmetros alfa e gamma em ambos programas. \* = não se aplica.

<b>Análises LEPTOTHECATA; informação básica</b>	<b>16S18S28S</b>	<b>16S18S28S_N</b>	<b>16S18S28S_Nrw4</b>	<b>16S</b>	<b>16S_N</b>	<b>16_Nrw4</b>
Táxons terminais	263	<b>263</b>	263	254	254	254
Sítios (total)	6.254	<b>5.608</b>	4.548	647	582	452
Sítios conservados	2.522	<b>2.463</b>	2.413	118	117	112
Sítios variáveis	3.677	<b>3.131</b>	2.132	526	465	340
Sítios com informação (Parcimônia)	2.861	<b>2.478</b>	1.551	462	417	300
Sítios <i>singleton</i>	757	<b>637</b>	581	61	46	40
Gaps e caracteres <i>missing data</i> (%)	38,55%	<b>33,02%</b>	28,94%	15,97%	8,72%	3,64%
Aliscore (% sítios que são mantidos)	*	<b>89,67%</b>	72,72%	*	89,95%	69,86%
Log-likelihood (RAxML)	-174250,26	<b>-155975,06</b>	-74738,77	-39040,32	-36397,24	-19898,97
Freq A C G T (PhyML)	0,28 0,19 0,26 0,26	<b>0,28 0,19 0,26 0,25</b>	0,29 0,19 0,26 0,25	0,40 0,12 0,15 0,31	0,40 0,12 0,15 0,31	0,38 0,13 0,17 0,30
Freq A↔C A↔G A↔T (PhyML)	0,83 2,28 1,73	<b>0,90 2,51 1,81</b>	1,33 3,84 2,23	2,24 7,29 4,20	2,22 7,95 4,16	2,02 8,38 3,65
Freq C↔G C↔T G↔T (PhyML)	1,13 4,91 1,0	<b>1,09 5,21 1,0</b>	1,11 7,74 1,0	1,03 15,34 1,0	0,93 15,51 1,0	0,72 14,24 1,0
Proporção invariante: MEGA (Gamma+I; "use all sites")	~36%	<b>~39%</b>	~43%	~16%	~18%	~21%
Parâmetros: (alfa PhyML) [Gamma MEGA]	(0,345) [0,647]	<b>(0,325) [0,651]</b>	(0,292) [0,548]	(0,424) [0,587]	(0,425) [0,571]	(0,6361) [0,443]

Continuação Tabela 2

<b>Análises LEPTOTHECATA; informação básica</b>	<b>18S</b>	<b>18S_N</b>	<b>18S NrW4</b>	<b>28S</b>	<b>28S N</b>	<b>28S NrW4</b>
Táxons terminais	207	207	207	181	181	181
Sítios (total)	1.955	1.802	1.566	3.652	3.224	2.530
Sítios conservados	888	862	848	1.516	1484	1.453
Sítios variáveis	1.050	940	718	2.101	1.726	1.074
Sítios com informação (Parcimônia)	782	708	506	1,617	1,353	745
Sítios <i>singleton</i>	262	229	212	434	362	329
Gaps e caracteres <i>missing data</i> (%)	14,40%	7,93%	2,86%	20,39%	12,67%	7,31%
Aliscore (% sítios que são mantidos)	*	92,17%	80,10%	*	88,28%	69,28%
Log-likelihood (RAxML)	-37348,89	-35029,30	-21383,44	-91649,78	-78681,31	-29528,53
Freq A C G T (PhyML)	0,26 0,19 0,26 0,26	0,26 0,19 0,26 0,26	0,27 0,19 0,26 0,26	0,26 0,21 0,28 0,24	0,26 0,21 0,28 0,23	0,27 0,20 0,27 0,23
Freq A↔C A↔G A↔T (PhyML)	1,13 2,41 1,17	1,10 2,47 1,15	1,31 2,99 1,12	0,64 1,90 0,69	0,70 2,02 0,72	1,31 3,93 1,08
Freq C↔G C↔T G↔T (PhyML)	0,91 5,00 1,0	0,89 4,92 1,0	1,09 6,22 1,0	0,88 4,11 1,0	0,88 4,43 1,0	1,25 6,61 1,0
Proporção invariante: MEGA (Gamma+I; "use all sites")	~38%	~40%	~42%	~38%	~42%	~44%
Parâmetros: (alfa PhyML) [Gamma MEGA]	(0,296) [0,601]	(0,296) [0,595]	(0,273) [0,561]	(0,319) [0,633]	(0,295) [0,643]	(0,247) [0,530]

# Leptothecata 16S18S28S\_N

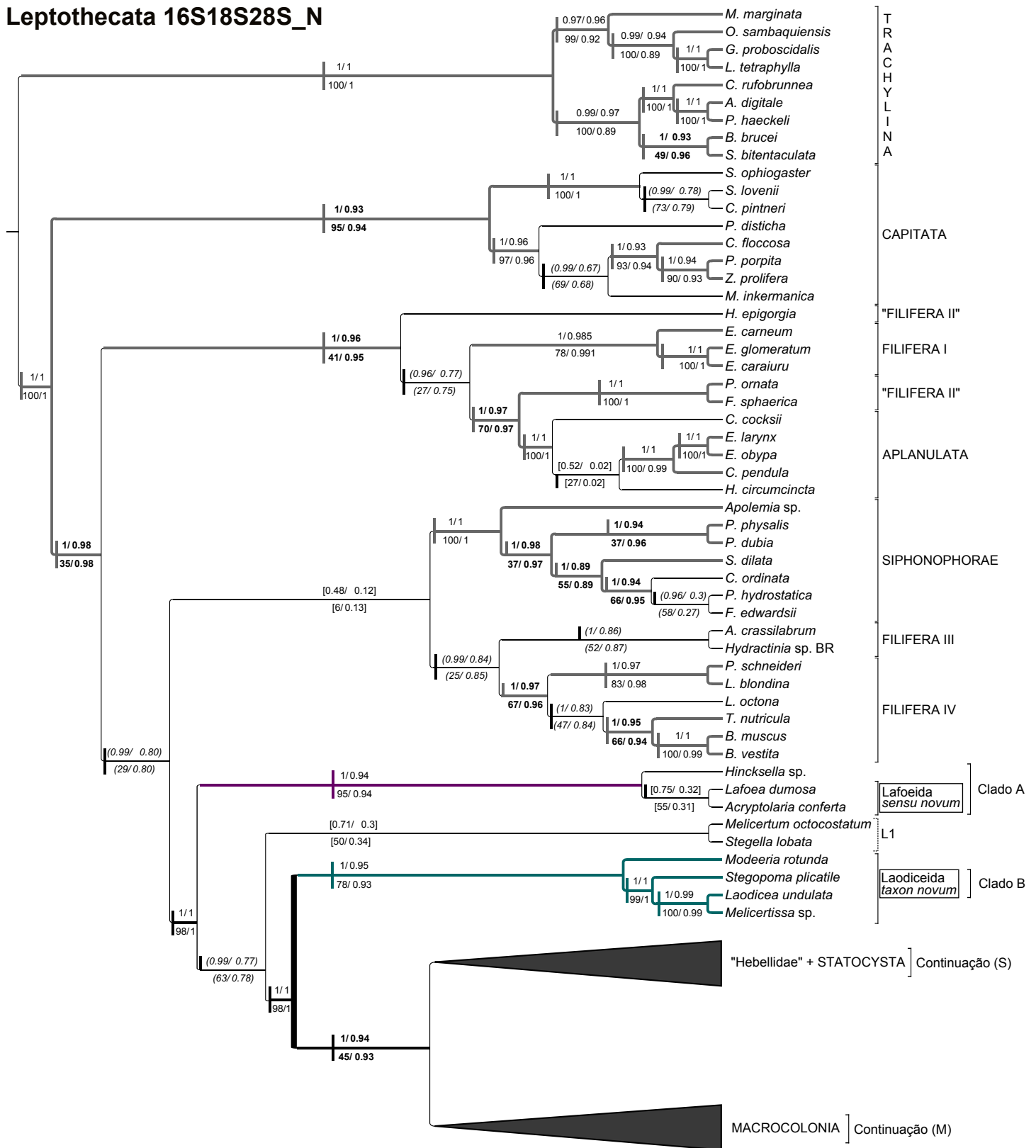


Figura 1 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem mínima de dados (matriz 16S18S28S\_N). Suportes paramétricos acima do ramo (aBAYES/aLRT), suportes não-paramétricos embaixo do ramo (BS/SH-aLRT); valores sem destaque: alto suporte em todos os casos (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS > 75%; SH-aLRT > 0.85) ou presença de valores de suporte altos em apenas dois métodos; em **negrito** destacam-se os casos de potencial falso negativo (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS < 75%; SH-aLRT > 0.85); em cursiva e remarcados com parênteses ( ) casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85); casos com baixo suporte em todos ou na maioria dos casos, remarcados com colchetes [ ] (aBAYES < 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85). Principais linhagens encontram-se representadas em cores naqueles casos em que o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (ramos com potencial falso positivo e baixo suporte, em preto e linhas finas). A barra acima do ramo representa presença do clado no resultado Leptothecata16S18S28S; a barra embaixo do ramo representa presença do clado no resultado Leptothecata 16S18S28S\_Nrw4. Na posição direita da descrição de grandes clados detalham-se novos grupos propostos, com destaque para os subordens e ordens (caixa preta). Os terminais com um ponto no extremo do ramo referem-se às espécies com posição filogenética basal instável nas diferentes análises (em roxo), ou potenciais casos de erro taxonômico (em amarelo). Aqueles terminais em cor roxo não são considerados na avaliação de presença de clados nas demais análises, e junto com aqueles em cor amarelo são considerados *incertae sedis* na nova taxonomia proposta. Para detalhes das filogenias de Statocysta e Macrocolonia, veja continuação (S) e (M) nas próximas páginas. Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

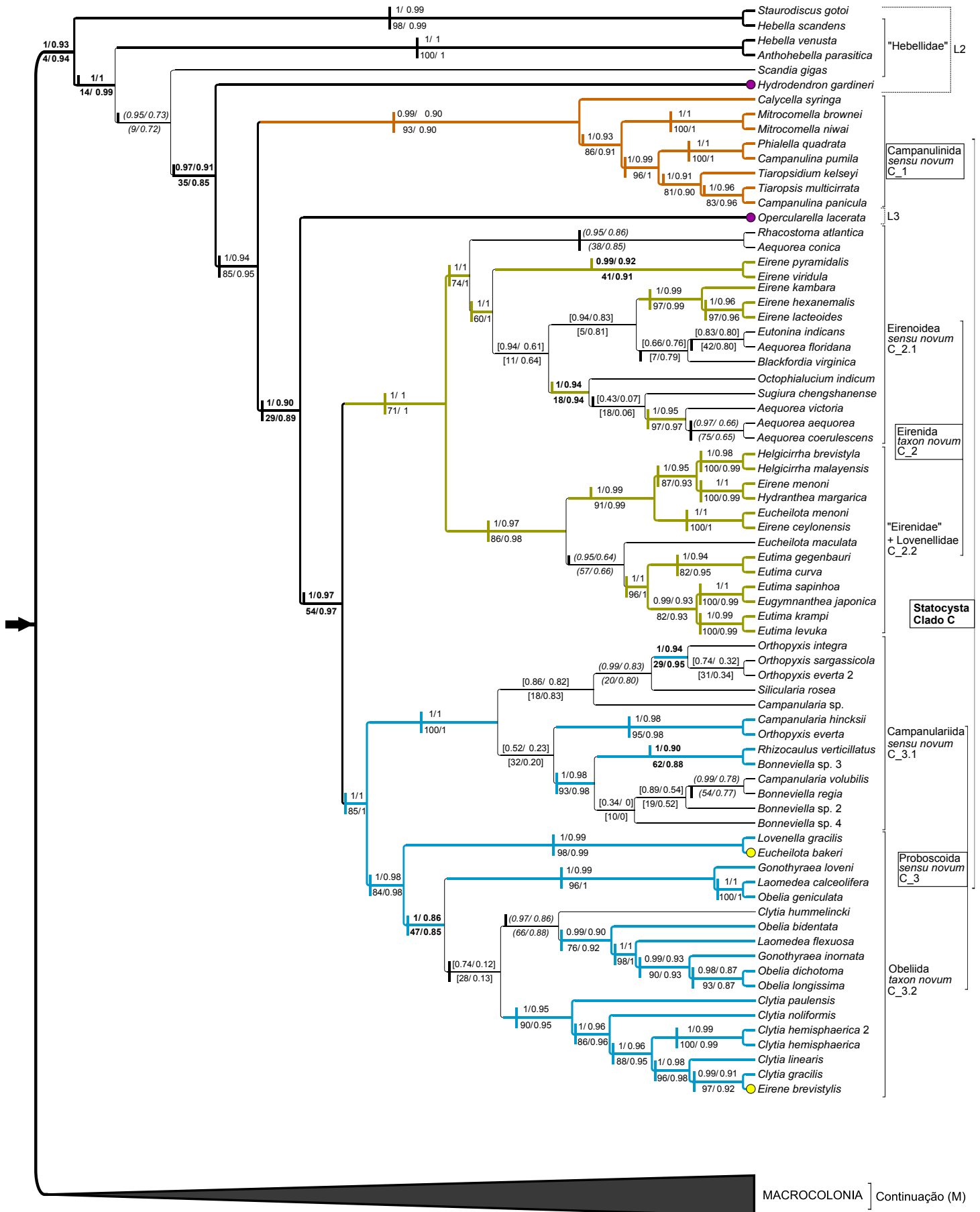


Figura 1 - continuação S ("Hebellidae" + STATOCYSTA)

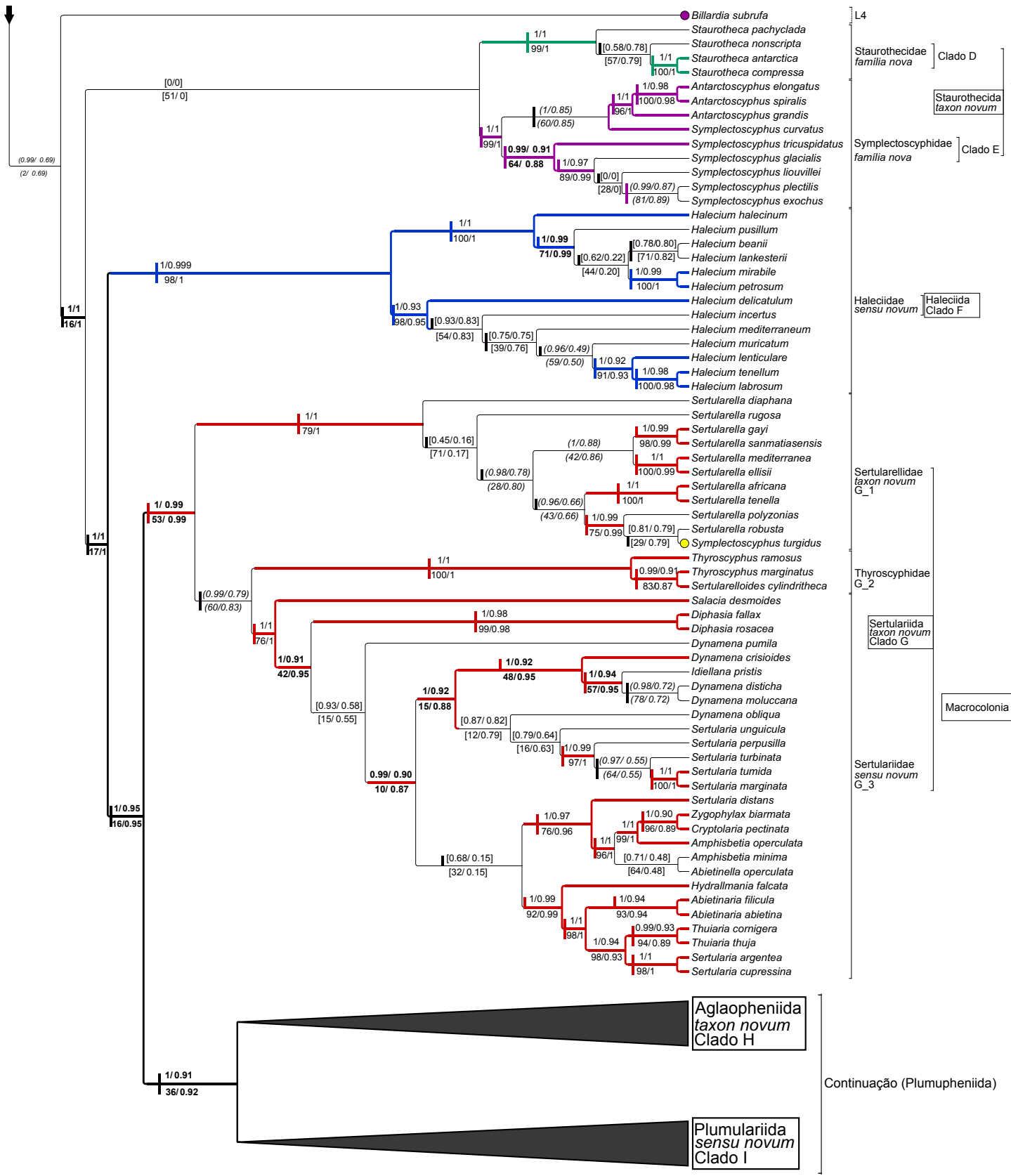


Figura 1 - continuação: Macrocolonia (M)

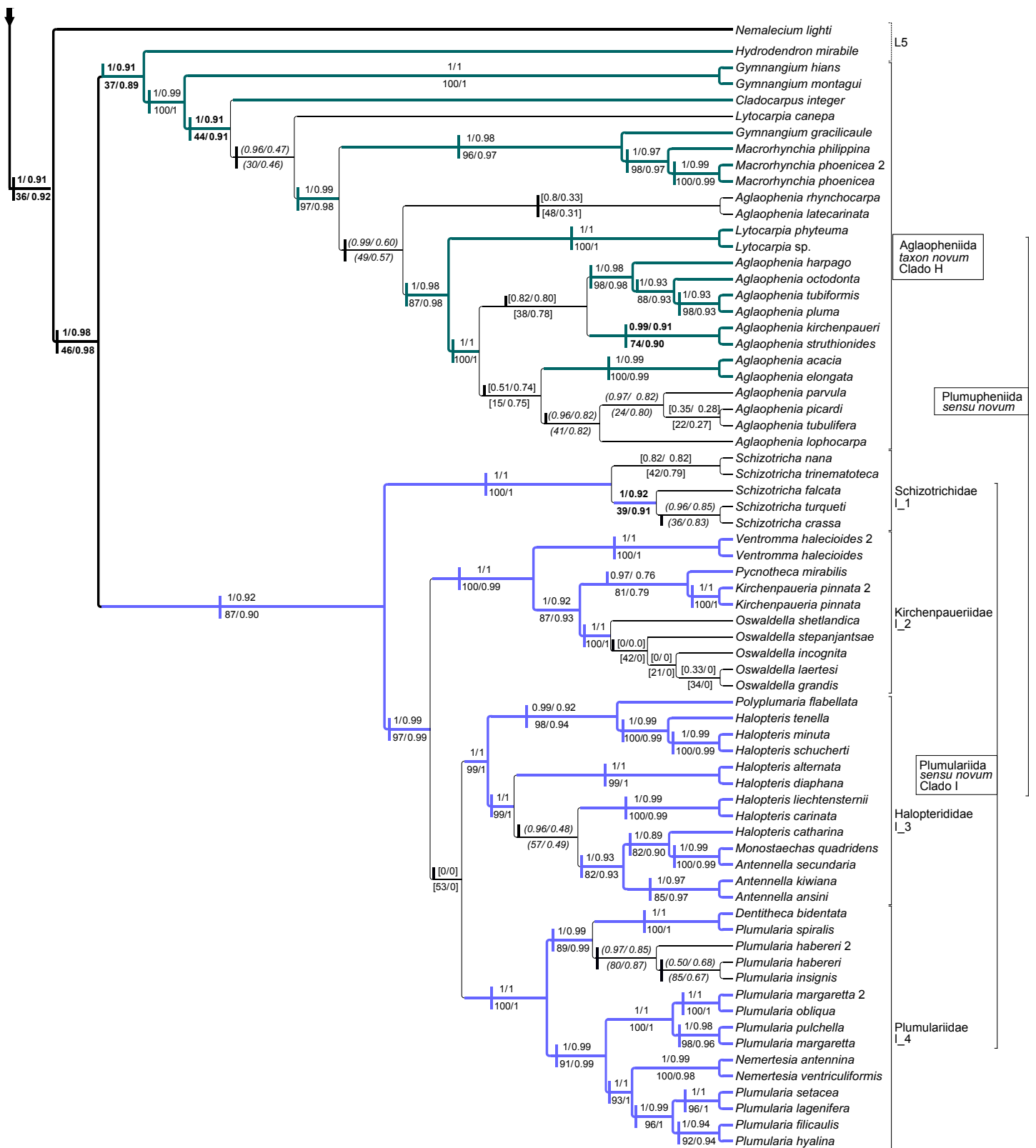


Figura 1 - continuação: Plumupheniida

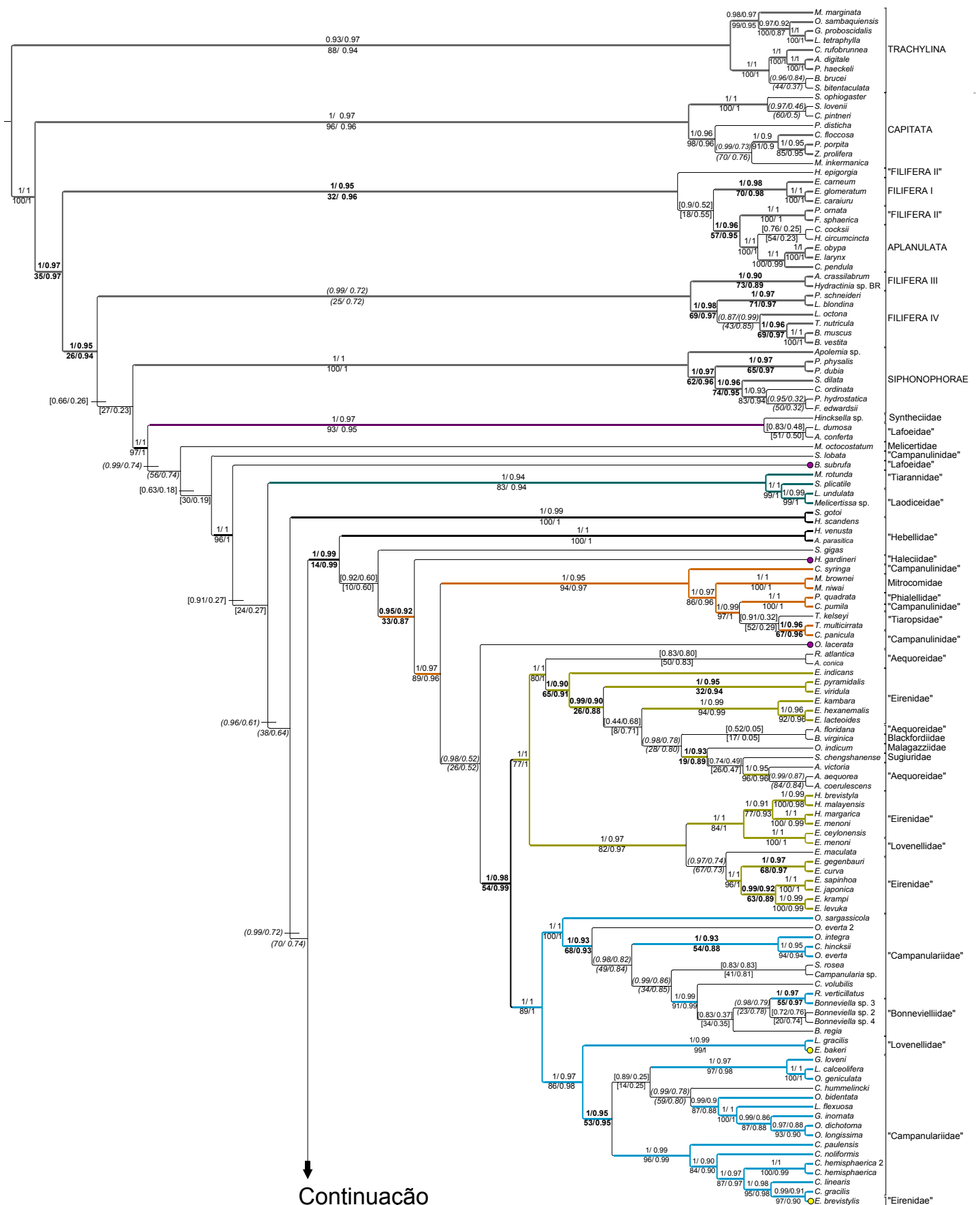


Figura 2 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata sem filtragem de dados (matriz 16S18S28S). Suportes paramétricos acima do ramo (aBAYES/aLRT), suportes não-paramétricos embaixo do ramo (BS/SH-aLRT); valores sem destaque: alto suporte em todos os casos (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS > 75%; SH-aLRT > 0.85) ou presença de valores de suporte altos em apenas dois métodos; em **negrito** destacam-se os casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT > 0.9; BS < 75%; SH-aLRT > 0.85); em cursiva e remarcados com parênteses ( ) casos de potencial falso positivo (aBAYES > 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85); casos com baixo suporte em todos ou na maioria dos casos, remarcados com colchetes [ ] (aBAYES < 0.95; aLRT < 0.9; BS < 75%; SH-aLRT < 0.85). Principais linhagens encontram-se representadas em cores naqueles casos em que o suporte é considerado alto ou de potencial falso negativo (ramos com potencial falso positivo e baixo suporte, em cor preta e linhas finas). Os nomes de grupos destacados com aspas " " referem-se a grupos não monofiléticos no resultado (taxonomia "tradicional", a partir da base de dados WoRMS). Os terminais com um ponto no extremo do ramo referem-se às espécies com posição filogenética basal instável nas diferentes análises (em roxo), ou potenciais casos de erro taxonômico (em amarelo).



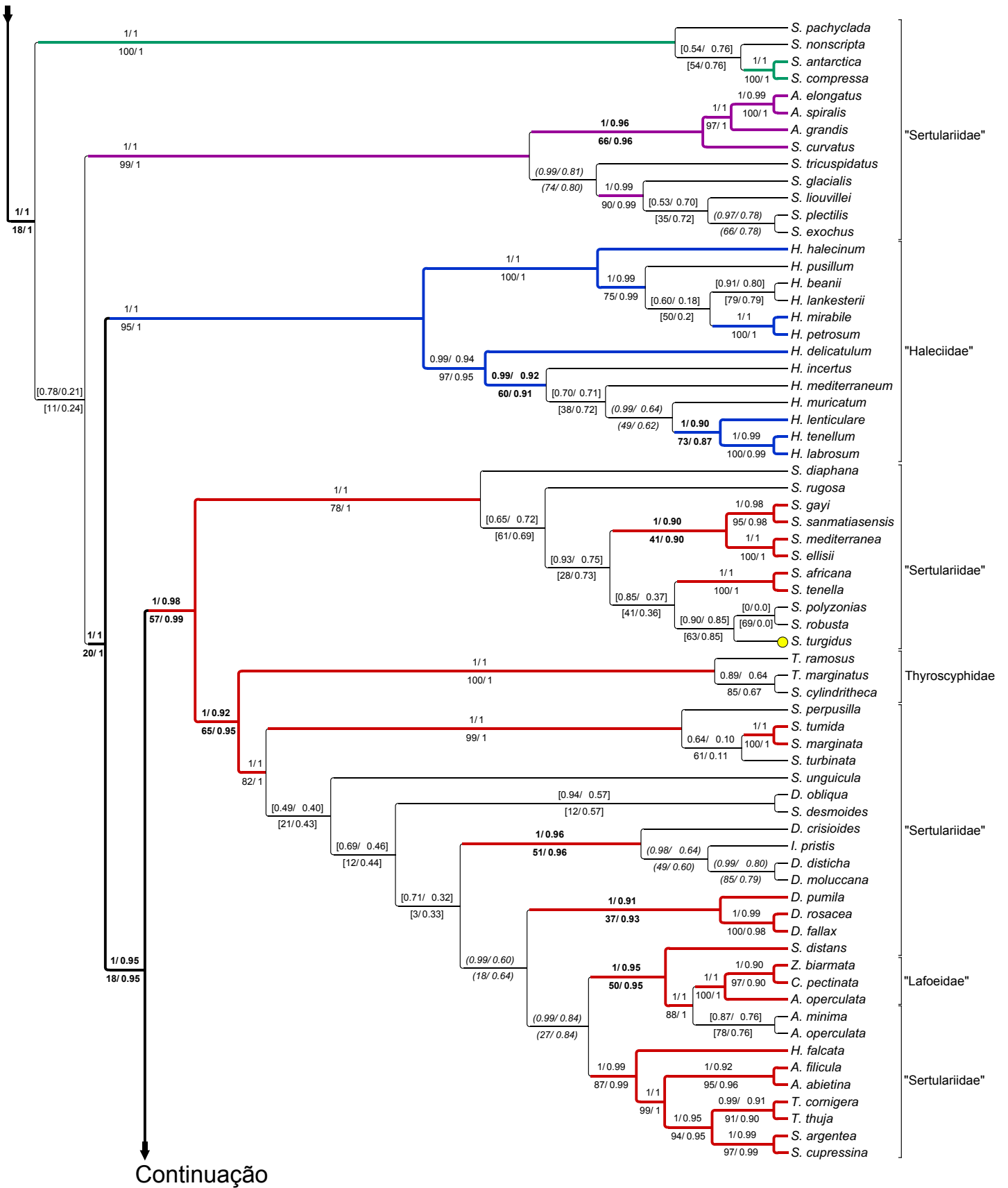


Figura 2 - continuação

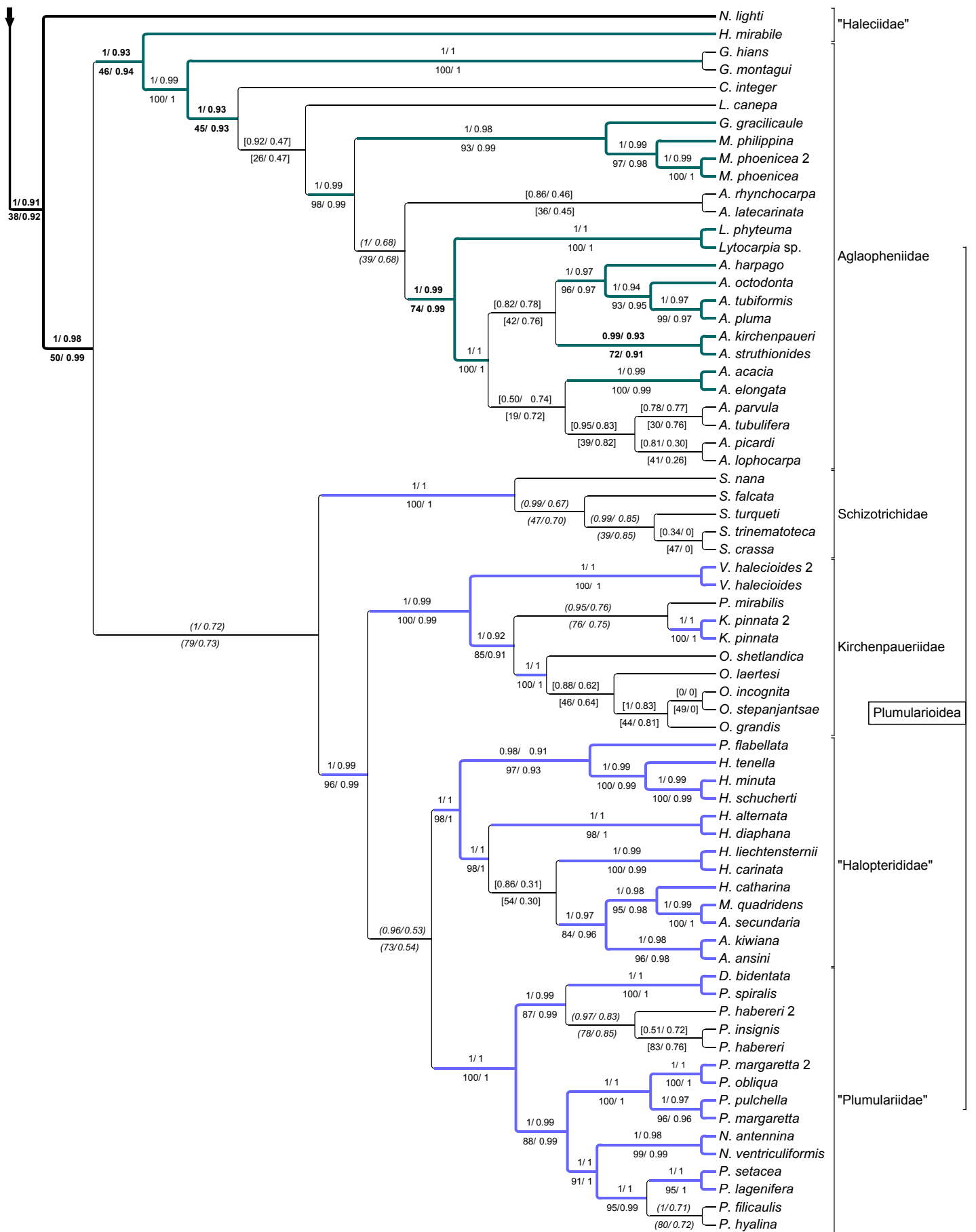
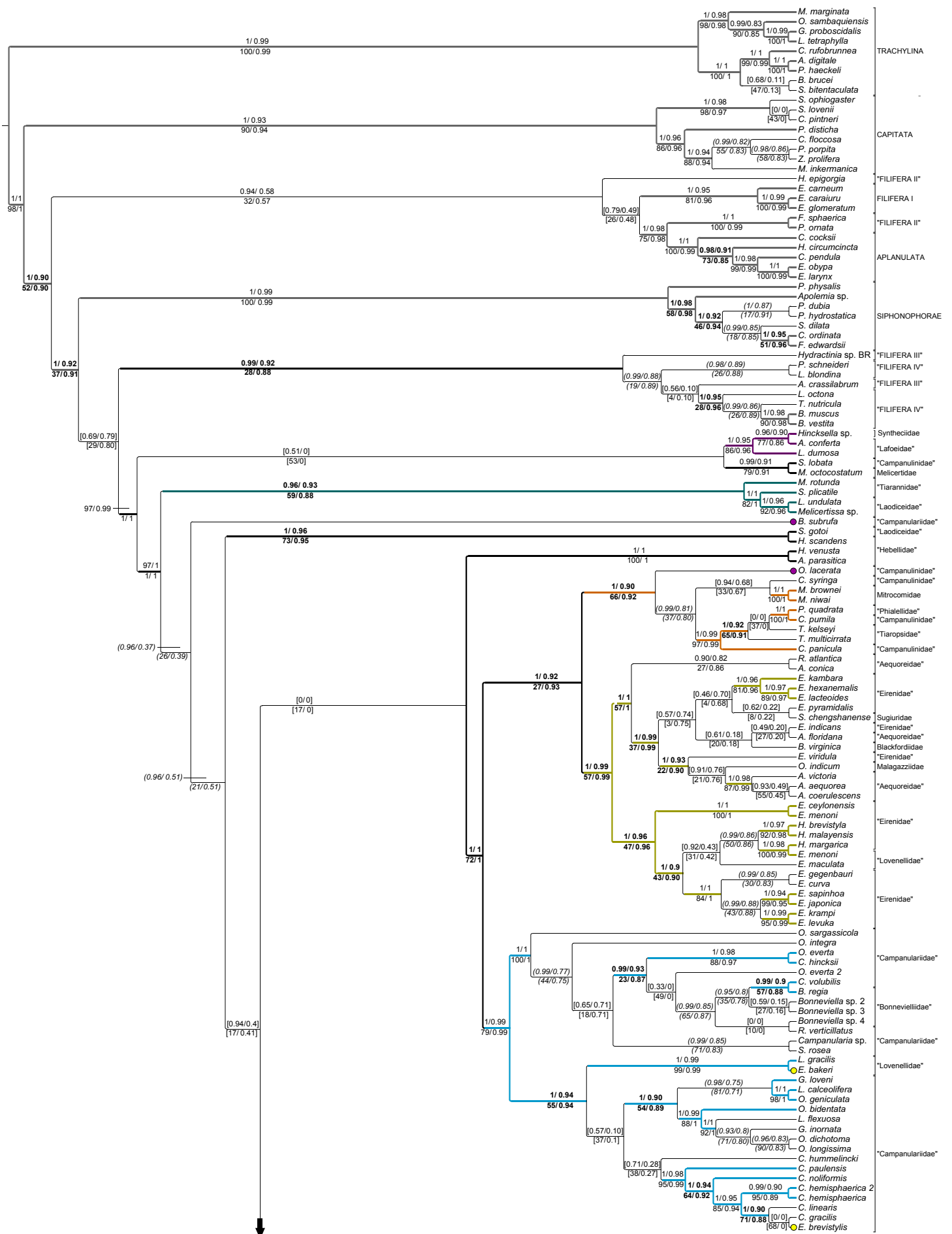
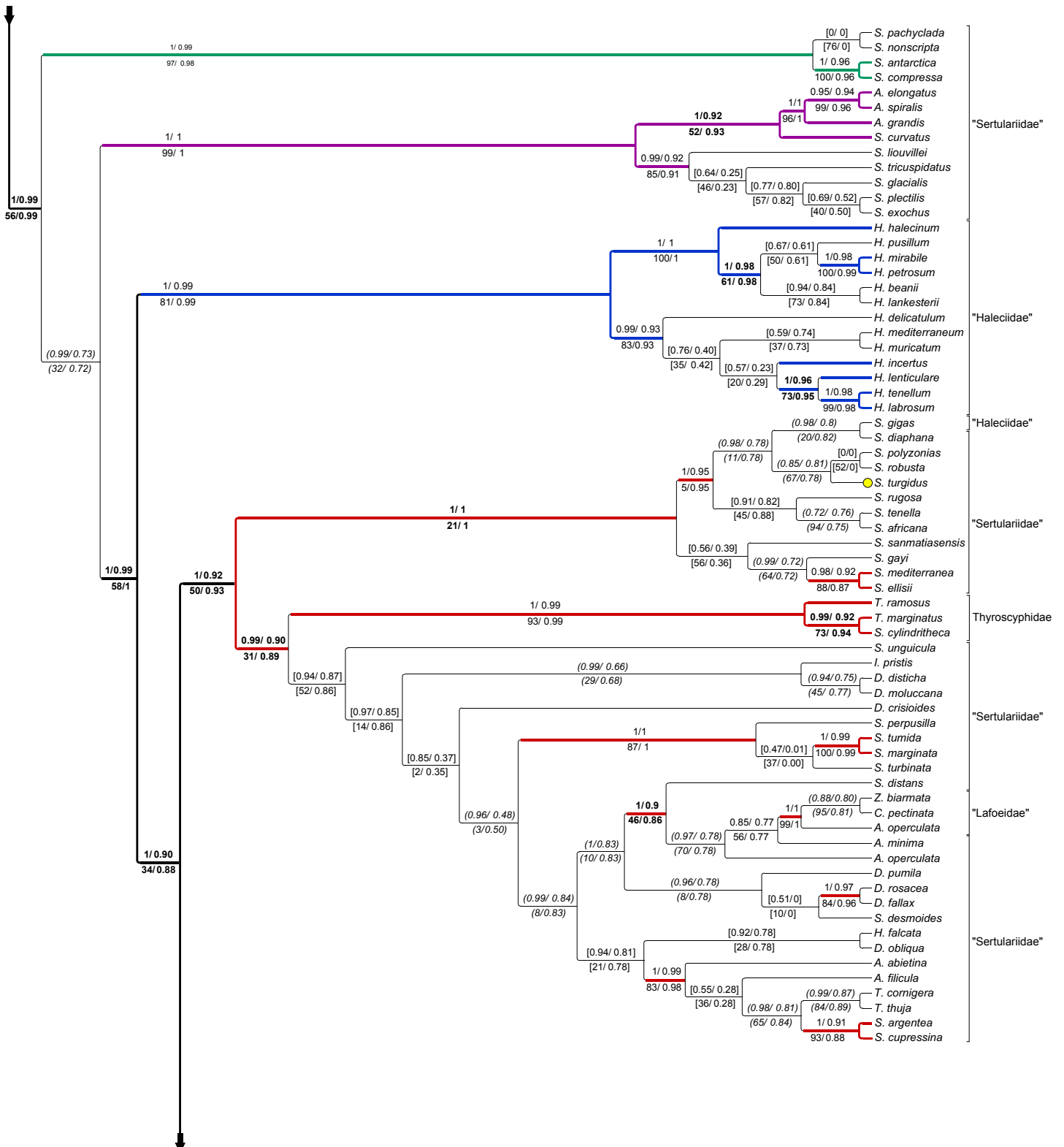


Figura 2 - continuação



Continuação

Figura 3 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem intensiva de dados (matriz 16S18S28S\_Nrw4). Posição de valores de suportes, relação de valores (potenciais casos de falso negativo e falso positivo) e representação de cores nas linhagens principais, similar à Figura 1. Os nomes de grupos destacados com aspas " " referem-se a grupos não monofiléticos no resultado (taxonomia "tradicional", a partir da base de dados WoRMS). Os terminais com um ponto no extremo do ramo referem-se às espécies com posição filogenética basal instável nas diferentes análises (em roxo), ou potenciais casos de erro taxonômico (em amarelo).



Continuação: "Haleciidae" + Plumularioidea

Figura 3 - continuação

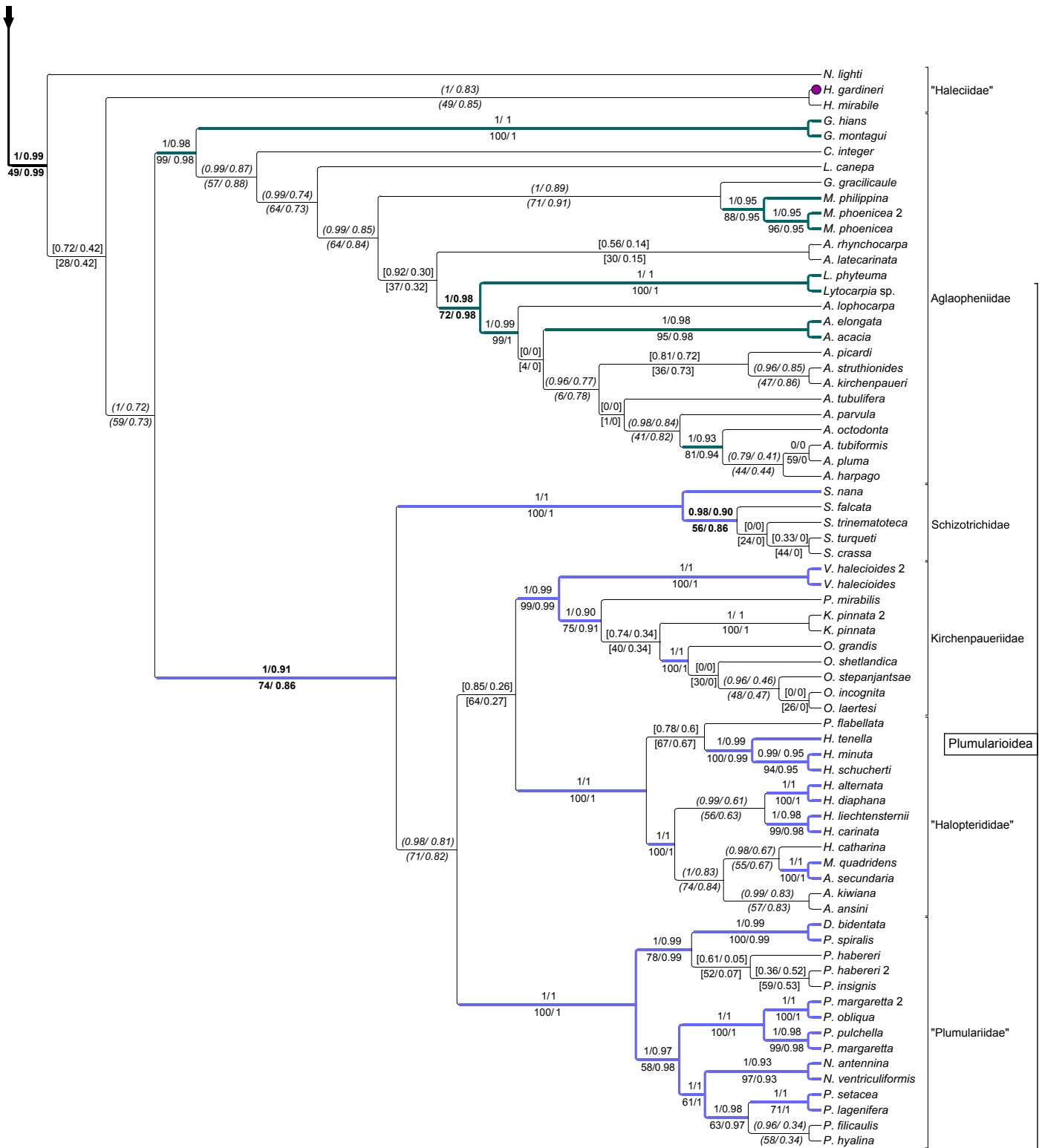


Figura 3 - continuação

Tabela 3 - Resultados de suporte nodal para os grupos principais apresentados no resultado 16S18S28S\_N (Figura 1), considerando todas as topologias obtidas no presente estudo. As células pretas representam nós com alto suporte em todos ou na maioria dos métodos (veja Figura 1) e casos de potencial falso positivo (veja Figura 1); células cinzas com parênteses ( ) representam nós com potencial falso positivo (veja Figura 1); células brancas com colchetes [ ] representam nós com baixo suporte em todos ou na maioria dos métodos (veja Figura 1). Símbolo \*= grupo ausente na topologia, mas com formação para ou polifítica (i.e., com baixa distância patrística entre seus terminais); Símbolo \*\*= grupo ausente no resultado e no qual seus terminais apresentam alta distância patrística entre si (veja figuras e texto para maiores detalhes); x = a matriz de dados não apresenta todos os dados para definir a posição filogenética e suporte nodal do grupo.

Grupos presentes em Leptothecata 16S18S28S_N (à exceção de agrupamentos alternativos +++)	16S18S28S						16S			18S			28S				
	total		_N		_NrW4		total	_N	_NrW4	total	_N	_NrW4	total	_N	_NrW4		
	i	ii	i	ii	i	ii	i	i	i	i	i	i	i	i	i		
CLADO A Lafoeida + Hincksella: (i) monofilético; (ii) grupo irmão de restante de Leptothecata		( )		( )		não*						x	x	x	x	x	x
CLADO B Laodiceida <i>taxon novum</i> : (i) monofilético; (ii) grupo irmão de restante de Leptothecata				( )		( )	não*	não*	não*	não*	não*	( )	[ ]	[ ]	não**		
CLADO C = Statocysta: (i) Clado_2 (C_2.1,C_2.2); (ii) Clado 3 monofilético (C_3.1,C_3.2)							não**	não**	não**	não*	não*	não*					
CLADO C_1 Campanulinida <i>sensu novum</i> : (i) monofilético; (ii) grupo irmão de restante do Clado C				( )		não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*	[ ]	não*
CLADO C_2 Eirenida <i>taxon novum</i> : (i) monofilético; (ii) grupo irmão do Clado C_3						não*	não**	não**	não**	não*	não*	não*					
CLADO D Staurothecidae <i>família nova</i> : (i) monofilético; (ii) grupo irmão do Clado E		[ ]		não*		não*						x	x	x	x	x	x
CLADO E Symplectoscyphidae <i>família nova</i> : (i) monofilético; (ii) +++ incluído no Clado (E, F, G, H, I)		não*		[ ]		( )	não*	não*	não*								
CLADO (F(G(H,I))) = Macrocolonia: (i) monofilético; (ii) grupo F irmão de (G, H, I)							não*	não**	não*						( )	( )	
CLADO G Sertulariida <i>taxon novum</i> : (i) monofilético (G_1,G_2,G_3); (ii) grupo G irmão de (L-5,H,I)				( )			não**	não*	não**	não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*	não*
CLADO (H,I) Plumupheniida <i>sensu novum</i> : (i) monofilético; (ii) grupo H irmão de (I)				( )		( )						( )	não*				( )
CLADO I Plumulariida <i>sensu novum</i> : (i) monofilético; (ii) Clado I_1 grupo irmão de (I_2, I_3, I_4)				( )		( )	não*	não*	não*	não*	não*	não*					( )
CLADO I Plumulariida <i>sensu novum</i> : (i) cladros I_2, I_3 e I_4 monofiléticos; (ii) I_2 grupo irmão de (I_3, I_4)		[ ]		( )		não*											

## Discussão

A discussão busca contrastar a taxonomia tradicional do grupo e propostas classificatórias recentes com os resultados das análises combinadas (resultados das análises de marcadoras individuais nas Tabelas 2-3, graficamente apresentados de forma completa nas Figuras Suplementares 3-11). Ao final são explorados alguns processos macroevolutivos que podem estar relacionados à diversificação dos Leptothecata. Para manter a coerência taxonômica com as demais seções do capítulo, os números de espécies consideradas nos gêneros discutidos foram obtidos da base de dados WoRMS.

### Marcadores moleculares e avaliação dos resultados filogenéticos

O padrão geral dos resultados obtidos é consistente com hipóteses recentes (Leclère et al. 2007, 2009; Peña Cantero et al. 2010), mas alguns detalhes podem ser ressaltados. O marcador mitocondrial 16S acumula variação nucleotídica maior que os marcadores nucleares 18S e 28S, o que pode ser determinado pelas diferenças de sítios conservados, *singletons* e sítios informativos para a parcimônia, em relação ao tamanho total das sequências (Tabela 2). O marcador 16S apresenta um menor número de sítios e maior proporção de sítios filtrados em relação ao tamanho do marcador em relação aos marcadores 18S e 28S (Tabela 2). Por isso, é esperado que, conjuntamente, seja mais afetado em suportes não paramétricos, especialmente em técnicas como o bootstrap.

Clados definidos exclusivamente pelo marcador 16S têm valores menores de suporte nodal e maior tendência a apresentar alterações nas posições filogenéticas em diferentes inferências, individuais e combinadas, especialmente em terminais representantes de linhagens basais e pouco amostradas, por exemplo, *Hydrodendron gardineri* (pouca informação genética) e *Hincksella* sp. (pouca informação genética e representante de linhagem pouco amostrada) (Figuras 1-3). Artefatos taxonômicos associados ao 16S incluem a atração de ramo longo (*long branch attraction*, LBA) (ver também Peña Cantero et al. 2010; e Capítulo 2), como ocorre entre Siphonophorae e Plumularioidea, grupo com maior variabilidade nucleotídica nos leptotecados (Figuras Suplementares 3-5). Estudos prévios tentaram contornar este efeito não incluindo terminais de sifonóforos no grupo externo (Leclère et al. 2007). É interessante notar que grupos mais apicais, como Plumularioidea, apresentam

maiores valores de variação nucleotídica para o 16S, quando o esperado, caso ocorresse uma condição de evolução linear, seria que as linhagens basais apresentassem maior heterogeneidade e saturação genética. Embora o 16S recupere a maioria das linhagens dos Plumularioidea, o artefato de LBA, resultante da alta acumulação de variação nucleotídica, causa a convergência não-histórica de Siphonophorae e Plumularioidea, grupos com alterações substanciais nos ciclos de vida, como perda da fase de medusa e alto polimorfismo e especialização das colônias.

Os padrões obtidos para 16S, em que a grande maioria das linhagens não-Plumularioidea de leptotecados não são monofiléticas, contrastam com os padrões dos marcadores nucleares 18S e 28S que apresentam filogenias gênicas similares, embora as árvores obtidas com 18S tenham menor resolução (Figuras Suplementares 6-8). O 28S define uma grande parte estruturação filogenética para Leptothecata devido ao número de sítios de nucleotídeos variáveis, a frequência gênica relativa nas diferentes matrizes (com e sem filtragem) e os valores de suporte nos estudos de filogenias individuais. Os resultados das análises das matrizes concatenadas recuperam os nós basais presentes na filogenia de 28S e outros agrupamentos filogenéticos (e.g., Clado G), com valores de suporte superiores, na média, em relação aos suportes nodais de filogenias gênicas para marcadores individuais.

As diferentes matrizes (combinadas ou de marcadores individuais, com ou sem filtragem) combinadas aos quatro métodos de suporte permitiram avaliar a estabilidade nodal a partir da congruência entre dados e condições de análise (e.g., Tabela 3). Os nós principais são geralmente estáveis, com melhor resultado de suporte geralmente para filtragem menos intensa. Nas matrizes com filtragem de dados mais intensa, a qualidade do resultado diminuiu (e.g., geralmente com menor suporte nodal) e ficou comprometida (e.g., com perda de clados ou aparecimento de clados alternativos com suporte nodal baixo). Fica clara a necessidade de explorar os dados (e.g., por filtragem de dados com alta heterogeneidade nucleotídica) conjugados a condições de avaliação de suporte nodal para alcançar topologias mais robustas. No futuro será interessante desenvolver técnicas de sumarização de filogenias que permitam a combinação de subclados com melhores condições de suporte e outros critérios similares, e com diferentes perfis analíticos (e.g., diferentes níveis de filtragem de dados).



## **Grupos externos e grupo irmão de Leptothecata**

O grupo irmão dos leptotecados permanece impreciso (e.g., Leclère et al. 2009; Cartwright & Nawrocki 2010), com diferentes táxons escolhidos ou explicitamente evitados para compor análises variadas de diferentes grupos de Leptothecata (e.g., a exclusão de Siphonophorae; Leclère et al. 2007). Nossas topologias de matrizes combinadas apresentam diferentes linhagens como grupo irmão putativo dos Leptothecata. Ao avaliarmos as análises, e diante do baixo número de espécies (n=2) amostradas para Filifera III, verificamos que os únicos resultados com suporte nodal alto e sem presença de artefatos filogenéticos são aqueles com o 28S (análises 28S\_N e 28\_Nrw4), em que Filifera IV (membros de Bougainvilliidae) aparece como grupo irmão de Leptothecata (relações basais similares a 16S18S28S). Entretanto, consideramos que a amostragem de espécies de Filifera III e Filifera IV é fundamental para uma melhor aproximação sobre o grupo irmão dos leptotecados.

## **Conflitos com o passado na filogenia de Leptothecata**

Estudos com dados moleculares e um número representativo de espécies de leptotecados têm contradito grupos tradicionais como monofiléticos, tais como Conica, Proboscoida e Plumulariida (Leclère et al. 2009; Cartwright & Nawrocki 2010). Porém, há exceções de grupos similares tradicionais (e.g., os de Bouillon 1984, 1985) corroborados como monofiléticos. Esses são, em geral, grupos baseados em caracteres taxonômicos diagnósticos de estruturas e polimorfismos, incluindo pólipos especializados em funções únicas, como em Plumularioidea (Tabela 4; Figura 4). Nosso estudo apresenta a maior cobertura de dados e grupos de Leptothecata até o presente e, por isso, compararemos clados considerados bem suportados em nossas análises de matrizes de dados concatenados, com ênfase em 16S18S28S\_N (Tabela 4; Figuras 1 e 4). A proposta de nomes será conservadora, em alguns casos para adequar classificação atual, baseada em características diagnósticas básicas (Figura 1).

## **Lafoeida *sensu novum* + *Hincksella* (Clado A)**

O clado Lafoeida *sensu novum* está representado por somente duas espécies, e pode ser definido como possuindo colônias eretas ou estolonais, ausência de ceco abcaulinar nos hidrantes, hidroteca geralmente sem diafragma (considerando-se outros gêneros potenciais) e opérculo, geralmente formando copínias (agregado de gonotecas que podem incluir nematotecas em Lafoeidae; Cornelius 1995a) que produzem gonóforos fixos. O monofiletismo do grupo e sua posição basal em leptotecados têm suportes nodais altos.

Propostas taxonômicas anteriores listam os subgrupos Hebellinae, Zygothylacinae e Lafoeinae incluídos em Lafoeidae (cf. Marques et al. 2006a), sendo que Hebellidae e Zygothylacidae já foram propostos no *status* de família (Tabelas 1 e 4; Figuras 1 e 4), e Zygothylacinae já foi também relacionado à Sertulariidae (cf. Marques et al. 2006a; Daly et al. 2007). Em nossa hipótese (Figura 1), Lafoeidae seria o único grupo, nominotípico, de Lafoeida, não relacionado a “Hebellidae” e Zygothylacidae (ver abaixo comentários sobre estes táxons), corroborando estudos prévios (Cartwright et al. 2008; Leclère et al. 2009; Moura et al. 2011a).

No escopo de análises moleculares, Lafoeidae inclui *Filellum*, *Lafoea* e *Acryptolaria* (Moura et al. 2011a; este estudo), porém seu escopo taxonômico deve ser mais amplo, já que ainda não foram amostradas espécies de *Grammaria* (seis espécies) e *Cryptolarella* (três espécies). A relação desses gêneros com Lafoeidae tem base morfológica (Marques et al. 2006a; Peña Cantero et al. 2007). Outra questão pendente para Lafoeida é sua relação com Clathrozoidae (Bouillon 1984, 1985), uma família com dois gêneros monoespecíficos não avaliados em inferências moleculares.

*Hincksella* sp. (tradicionalmente em Syntheciidae) é o terminal que completa este clado, com uma posição estável como grupo irmão de Lafoeida. Uma eventual relação entre espécies de Syntheciidae e Lafoeidae já foi aventada (Rees & Vervoort 1987). Morfologicamente, o trofossomo de *Hincksella* pode grosseiramente lembrar características presentes em alguns Lafoeida (e.g., como *Acryptolaria* e *Lafoea*), mas seu gonossomo não é similar a Lafoeida (cf. Millard 1975 para argumentos contrários à afinidade de *Hincksella* e Lafoeidae). Entretanto, a hipótese só será devidamente testada com a inclusão de *Parathuiaria* (uma espécie) e *Syntheticium* (vinte e três espécies) em análises mais amplas, e com dados multilocus para *Hincksella*.

Outras referências relevantes: Rees & Vervoort (1987); Vervoort (1987); Calder (1991); Migotto & Marques (1999); Schuchert (2001); Marques et al. (2005a, 2011); Bouillon et al. (2006); Peña Cantero et al. (2007).

### ***Stegella lobata* e *Melicertum octocostatum* (L1)**

O gênero monoespecífico *Stegella lobata* (tradicionalmente considerado Campanulinidae) e *Melicertum octocostatum* (Melicertidae) ocupam posições basais em Leptothecata (Figuras 1-2), corroborando Leclère et al. (2009) mas contradizendo Peña Cantero et al. (2010). Em diferentes análises, esses terminais apresentam mudanças em seus agrupamentos com suportes nodais variáveis (Figuras 1-3).

*Stegella lobata* já foi associada à Campanulariidae antes de sua inclusão como gênero monoespecífico de Campanulinidae (Stechow 1919; originalmente *Stegella grandis*). É caracterizada por sua hidoteca adnata, colônias “rizocaulômicas” (hidrorriza ereta formada em estolões paralelos), opérculo com quatro abas e ausência de medusa (gonóforos fixos ou brotos indeterminados) (Blanco 2000; Vervoort 1972).

Uma maior amostragem de espécies resulta necessária para definir de forma mais acurada a posição relativa destas espécies, assim como os gêneros que representam; similar situação acontece com as demais famílias não amostradas da superfamília Dipleurosomatoidea (Orchistomatidae, seis espécies; Dipleurosomatidae, oito espécies; Tabela 1).

*Melicertum octocostatum* é o primeiro terminal leptotecado expressando medusas com gônadas em seus canais radiais, a condição típica dos leptotecados. É o único gênero de Melicertidae (quatro gêneros, oito espécies) com pólipos conhecidos, sendo a família caracterizada por colônias estolonais, sem hidoteca ao redor do hidrante (Bouillon et al. 2006) e medusa sem estruturas sensoriais marginais, presumidamente sem ocelos (Cornelius 1995a).

Outras referências relevantes: Bouillon (1985, 1994); Govindarajan et al. (2006).

### ***Laodiceida taxon novum* (Clado B)**

O clado *Laodiceida taxon novum* é caracterizado por colônias estolonais (exceto *Stegopoma*, com colônias eretas), pólipos com opérculo e diafragma fino ou ausente; medusas com gônadas sobre os canais radiais e contíguas à região do estômago, sem estatocistos, mas com cordões (Cornelius 1995a). Ele

inclui duas famílias com medusa em seus ciclos de vida, Laodiceidae e Tiarannidae, embora medusas sejam ainda desconhecidas em várias espécies.

O monofilatismo de Laodiceida *taxon novum* e sua posição basal nos Leptothecata são bem suportados (Tabela 1, Figuras 1-3; cf. Leclère et al. 2009). Na análise combinada, Tiarannidae não é monofilética, e Laodiceidae se tornaria monofilética caso *Staurodiscus gotoi* fosse excluída dela, como sugere a topologia (Figura 1). *Staurodiscus gotoi* de fato tem colônias morfológicamente semelhantes às de *Hebella* (Migotto & De Andrade 2000; cf. Leclère et al. 2009; Moura et al. 2011a), o que também sugeriria uma homoplasia do cordile marginal.

Discussões sobre a validade das famílias de Laodiceida *taxon novum* focam a posição relativa das gônadas nas medusas (Bouillon 1985; Cornelius 1995a; Migotto & De Andrade 2000), mas contribuem para essas incertezas (a) a deficiência amostral sobre vários gêneros e (b) a limitação na identificação baseada nos pólipos das espécies, que geralmente apresentam um padrão geral do tipo “Cuspidella” (Bouillon et al. 2006). Iguamente conturbada é a situação de *Staurodiscus*, cujo monofilatismo e posição taxonômica ainda são duvidosos.

Outras referências relevantes: Pagès et al. (1992); Migotto & De Andrade (2000); Vito et al. (2006).

### **“Hebellidae”, *Staurodiscus gotoi* e *Hydrodendron gardineri* (L2)**

A hipótese de trabalho apresenta um agrupamento não monofilético que inclui quatro espécies de “Hebellidae” e *Staurodiscus gotoi* (ver acima), com suporte geralmente alto na posição relativa entre essas linhagens (Figuras 1-3). Parte desse padrão condiz com análises anteriores com um menor número de terminais de “Hebellidae” (Leclère et al. 2009), inclusive na relação de *S. gotoi* com “Hebellidae” (Moura et al. 2011b), o que pode ter base inclusive em dados do ciclo de vida (Migotto & De Andrade 2000). Já o posicionamento de um terminal próximo, *Hydrodendron gardineri* (tradicionalmente “Haleciidae”), é incerto, por assumir posições diferentes nas análises combinadas (Figuras 1-3, Tabela 4) e, por possuir apenas o marcador 16S como fonte de dados, não podendo ser concluído nesse momento.

A relação filogenética das espécies amostradas e seus ciclos de vida demarcam a ancestralidade da presença de medusa em *Hebella* e, ao menos, *Staurodiscus gotoi*, com modificações derivadas em *Anthohebella* (gonóforos

livre-natantes) e *Scandia* (gonóforos fixos). Os pólipos desses animais são colônias estolonais, com hidrotecas campanuladas com diafragma ou espessamento anelar, e gonotecas morfologicamente simples (Marques et al. 2006a). Embora com afinidade morfológica (Marques et al. 2006a), outros gêneros de “Hebellidae” precisarão ser avaliados em análises moleculares, inclusive com relação a seus ciclos de vida, como por exemplo em *Bedotella* (uma espécie) com gonóforos fixos e em *Halisiphonia* (quatro espécies) com aparente produção de medusa (Marques et al. 2004, 2006b).

Vale ainda ressaltar a posição basal que essas linhagens não monofiléticas tem em relação aos Statocysta, o que pode denotar a evolução basal do grupo, com colônias pequenas e expressão da medusa.

Outras referências relevantes: Calder (1991); Cornelius (1995a); Boero et al. (1997); Marques et al. (2004, 2006b).

### **Statocysta (Clado C)**

Statocysta foi caracterizado pela presença de estruturas de equilíbrio da medusa, os estatocistos (Leclère et al. 2009). Há duas linhagens principais bem suportadas em Statocysta (Figura 1) e os padrões encontrados deixam evidente que a hipótese taxonômica de divisão dos leptotecados em Conica e Proboscoida (senso tradicional) não é suportada, já que Statocysta é uma combinação de partes de ambos, ainda que linhagens de Proboscoida (senso tradicional) assumam uma condição mais apical que as de Conica (Figuras 1-3 e 6; Tabela 4). A estrutura básica do grupo apresenta os Campanulinida *sensu novum* e Eirenida *taxon novum* + Proboscoida *sensu novum*, com uma posição duvidosa para *Opercularella lacerata* (Figuras 1 e 3; Tabela 4). Eventualmente estudos futuros podem avaliar a posição de grupo irmão das linhagens incluídas em L2 (“Hebellidae”, *S. gotoi* e *H. gardineri*) dos Statocysta. Se for corroborada essa posição filogenética, Statocysta teria um senso taxonômico ampliado (Statocysta *sensu novum*).

### **Statocysta I: Campanulinida *sensu novum* (Clado C\_1)**

Esse grupo inclui espécies de diversas famílias e superfamílias da taxonomia tradicional (Bouillon 1984, 1985). Adicionalmente, sua composição não corrobora o monofiletismo da concepção tradicional de Campanulinida (cf. Bouillon 1984, 1985). Famílias e gêneros de Campanulinida no senso tradicional têm sido frequentemente questionados sobre seu monofiletismo, devido à dificuldade em definir caracteres diagnósticos e informativos na

morfologia simplificada dos pólipos, pela falta de conhecimento do ciclo de vida de numerosas espécies e pela dubiedade na forma de tratamento das espécies sem medusa em seu ciclo de vida (e.g., *Calycella* e *Campanulina*; Bouillon et al. 2006). Um exemplo claro da importância do conhecimento do ciclo de vida no contexto dos Campanulinida tradicionais ocorre entre *Lafoeina* (Campanulinidae) e *Cirrholovenia* (Lovenellidae; não amostrado com relação a dados moleculares) (Migotto & Cabral 2005). Nomenclaturalmente, como Campanulinidae e *Campanulina* são os táxons nominotípicos que ancoram o clado Campanulinida, e como há uma espécie de *Campanulina* nesse clado, optamos para defini-lo como Campanulinida *sensu novum*. Ainda, ressaltamos que *Opercularella lacerata* (Campanulinidae) não está incluída em Campanulinida *sensu novum* devido às suas posições variadas equívocas e com baixo suporte nas diferentes análises.

Nossas análises não recuperam nenhuma das linhagens e *rankings* de classificação tradicionais da literatura no que se referem aos grupos envolvidos nesse táxon, exceto pelo monofiletismo de Mitrocomidae (Figuras 1-3 e Tabelas 4-5). Isso é esperado, já que grande parte dos táxons supraespecíficos de Campanulinida no senso tradicional sequer tem sinapomorfia proposta (Daly et al. 2007). Conservadoramente, mantemos a validade dos gêneros para os terminais amostrados, embora indicando suas famílias como indefinidas. Em síntese, o clado apresenta espécies variando desde o tipo “cuspidella” (colônia estolonar, pólipo com opérculo mas sem diafragma) até poucos casos de um tipo “campanulinida-genérico” (colônia estolonar ou ereta, pólipo com opérculo e diafragma). Para as espécies em que se conhece a medusa, elas possuem quatro canais radiais simples, numerosos estatocistos, tentáculos ocos e ausência de cirro (exceto *Mitrocomella*).

#### **Statocysta II: Eirenida *taxon novum* (Clado C\_2)**

Esse clado inclui espécies de famílias que complementam os Campanulinida tradicionais. Há dois grupos definidos nas análises: os Eirenoidea *sensu novum* e os Eirenidae\* + Lovenellidae, apresentados abaixo.

- Statocysta II Eirenida: Eirenoidea *sensu novum* (Clado C 2.1).— Reúne diversos gêneros de Campanulinoidea com espécies de Eirenidae *Eirene* (gênero e família polifiléticos, vide abaixo) e *Eutonina* (uma das duas espécies válidas do grupo). Como Campanulinidae e *Campanulina* são os táxons

nominotípicos que ancoram o clado Campanulinida *sensu novum* (ver acima), torna-se necessário adotar Eirenoidea *sensu novum*, uma superfamília já proposta com base em Eirenidae Haeckel, 1879 (ver Bouillon 1984, 1985) e baseada na espécie-tipo *Eirene viridula* (Péron & Lesueur, 1809), que está amostrada neste clado.

A dificuldade em definir caracteres diagnósticos e delimitar níveis de família, gêneros e espécies é notória para diversos táxons hoje aceitos em Hydrozoa. Nesse escopo, Bouillon (1984, 1995) propõe um clado de “Campanulinoidea” que exclui “Campanulinidae”, que obviamente não tem lógica nomenclatural (notar que a hipótese filogenética da página 12 de Bouillon 1984 propõe Campanulinoidea não-monofilético), e seria caracterizado por medusas sem cirros exumbrelares (Figura 4; Tabela 4). Por outro lado, *Eirene* é reconhecidamente de difícil diagnóstico, demandando a medusa para sua determinação taxonômica que, entre outras características, também pode ser reconhecida pela “ausência de cirros”. Entretanto, outros grupos externos a Eirenoidea têm medusas sem cirros (e.g., Phialellidae), o que determina essa característica como homoplástica.

Os pólipos do grupo são de tipo “campanulinida”, com colônias estolonais (exceto *Aequorea* e *Eirene*), presença de um opérculo formado por abas (“flaps”) sem demarcação definida na hidroteca; hidrantes com membrana intertentacular e hidroteca com diafragma. As medusas têm gônadas nos canais radiais e distantes do manúbrio; não possuem ocelos e cirros, mas têm numerosos estatocistos fechados (Cornelius 1995a) (Tabela 5). As relações internas no grupo geralmente tem suporte baixo (Figuras 1-3).

Outras referências relevantes: Bouillon & Boero (2000); Govindarajan et al. (2005); Kubota (2008); Bardi & Marques (2009); Leclère et al. (2009).

Statocysta II Eirenida: Eirenidae\* + Lovenellidae (Clado C 2.2).— Esse clado inclui dois subclados com alto suporte (Figuras 1-3): espécies de “Eirenidae” (família polifilética em sua concepção tradicional, ver acima em Eirenoidea) e duas espécies de Lovenellidae (outra espécie de *Eucheilota* aparece em Campanulariida *sensu novum* junto com *Lovenella gracilis*; Miranda et al. 2013). Não está incluída, entretanto, a espécie-tipo *Eucheilota ventricularis* McCrady, 1857, ainda não amostrada em análises moleculares.

Um dos grupos apresenta os gêneros *Helgicirra* monofilético (duas espécies amostradas) e outras espécies de *Eirene* (Eirenidae), *Hydranthea* (já

considerada como Lovenellidae por Bouillon et al. 2006) e *Eucheilota* (Lovenellidae). Seu grupo irmão inclui espécies de *Eutima*, corroborando sua afinidade com *Eugymnanthea* (Kubota 2000). A discussão sobre esses grupos está relacionada à morfologia e ao estilo de vida dos pólipos, em que *Eugymnanthea* spp. habitam a cavidade do manto de moluscos bivalves e produzem eumedusóides, assim como *Hydranthea*.

Esse clado possui colônias do tipo “campanulinida”, hidroteca reduzida e hidrantes protegidos por um perissarco delgado, com membrana intertentacular; medusa com cirro lateral e estatocistos fechados e gônadas no canal radial (Bouillon et al. 2006).

### **Statocysta III: Proboscoida *sensu novum* (Clado C\_3)**

O senso original de Proboscoida inclui Bonneviellidae e Campanulariidae (Broch 1908) e, posteriormente, Phialuciidae, que compartilha o hipostômio em forma de trompeta (Bouillon 1985). Exceto por Phialuciidae (família monotípica e não incluída na análise, de fato nossa topologia mostra uma relação entre os demais Proboscoida, com a adição de alguns poucos outros terminais. Porém, não é basal nos Leptothecata (cf. Bouillon, 1994).

Assim, Proboscoida *sensu novum* inclui duas linhagens, mas passa a englobar parte dos Lovenelloidea (Figuras 1-4; Tabelas 4 e 5). Os dois cladogramas principais de Proboscoida *sensu novum* são aqui nomeados Campanulariida *sensu novum* e Obeliida *taxon novum*, ambos com alto suporte e, ao menos em Obeliida *taxon novum*, também alto suporte nodal nos grupos menos inclusivos.

- Statocysta III Proboscoida *sensu novum*: Campanulariida *sensu novum* (Clado C 3.1).— O novo táxon inclui espécies das famílias tradicionais Campanulariidae e Bonneviellidae. O clado é caracterizado por colônias eretas, ocasionalmente polissifônicas, como em *Rhizocaulus* (Cornelius 1982) e com medusas presentes ou, no máximo, eumedusóides (como em *Orthopyxis*, ao menos na concepção clássica do gênero). *Bonneviella*, que já foi relacionada à Lafoeidae (ver Marques et al. 2006a) e, mais corretamente, aos Campanulariidae e Proboscoida (“Proboscoidea” em Broch 1910; Naumov 1969), tem colônias polissifônicas, hidroteca sem diafragma, medusa ausente (gonóforos fixos). O monofiletismo dos gêneros amostrados possui baixo suporte na maioria dos resultados, sobrando questões já discutidas na



literatura tradicional, como o monofiletismo de *Campanularia* e *Orthopyxis* (e.g., Millard 1975).

Outras referências relevantes: Berrill (1950); Govindarajan et al. (2006).

- Statocysta III Proboscoida sensu novum: Obeliida taxon novum (Clado C 3.2).— No grupo *Obeliida taxon novum*, se apresentam as restantes famílias de Proboscoida, aqui definidas como Clytiidae e Obeliidae, além da inclusão de Lovenellidae. Obeliidae é monofilético nos resultados com melhor suporte nodal para o grupo (Figura 3, topologia 16S18S28S\_Nrw4). Clytiidae também é monofilético, embora haja a posição de “*Eirene brevistylis*”, que deve corresponder a um potencial erro de identificação ou artefato filogenético (atração de ramos longos). Esse clado é caracterizado por pólipos com diafragma, e grande variedade de alterações da fase de medusa: medusas com morfologia única (*Obelia*), meconídios (*Gonothyraea*) e gonóforos fixos (*Laomedea*) (Cornelius 1982, 1990a, 1995b).

Com relação à Lovenellidae, nossa análise resulta em “*Eucheilota bakeri*” relacionada à *Lovenella gracilis* (Figura 1). Esses materiais não são nossos, e não sabemos se as sequências foram geradas a partir de uma amostra de pólipo ou medusa. Como esses hidroides são de identificação pouco usual e eventualmente próximos (cf. Russell 1953), suspeitamos que *E. bakeri* esteja incorretamente identificado. Historicamente, *Lovenella* já foi associada à Campanulariidae (Hincks 1868, baseado no pólipo), como família própria (Russell 1953, baseado na medusae) e até mesmo com *Campalecium* (Haleciidae). Hipóteses para Lovenellidae também já incluíram *Eucheilota* (Russell 1953), *Cirrholovenia* (Kramp 1959) e *Hydranthea* (ver histórico em Miranda et al. 2013a).

Outras referências relevantes: Cornelius (1990b); Govindarajan et al. (2004); Lindner et al. (2011).

#### ***Billardia subrufa* (L4)**

A posição sistemática de *Billardia* é incerta, com argumentos que a associaram a diversas linhagens, como Campanulariidae (Totton 1930), Lafoeidae e Syntheciidae (Millard 1975; Cornelius 1982). O gênero apresenta colônias eretas, ausência de diafragma ou “espessamento anelar”, gonóforos fixos, gonoteca comprimida e anelada (Ralph 1957; Blanco 1967). Obtivemos novas sequências de *B. subrufa* a partir de material antártico, com alta similaridade nucleotídica com a anterior sequência presente no GenBank;

análises moleculares anteriores propuseram *B. subrufa* próxima à Lafoeidae, na base da topologia dos leptotecados (Govindarajan et al. 2006; Leclère et al. 2009). Em nossas análises, o terminal apareceu como basal em relação à Macrocolonia *sensu novum*, ou próximo à Lafoeidae + *Hincksella*, ou próximo a espécies de Lafoeidae e à única espécie amostrada de Syntheceidae (Figuras 1-3). Devido à instabilidade de sua posição e aos baixos suportes de seus nós, optamos por manter *B. subrufa* como *incertae sedis* nesse momento.

Outras referências relevantes: Cornelius (1995b).

### **Macrocolonia (Clado ((D,E)(F(G(H,I))))))**

Macrocolonia foi proposto simultaneamente a Statocysta, incluindo linhagens de Plumularioidea, Sertulariidae e Haleciidae, grupos com colônias eretas complexas e com formas polipoides diversas (Leclère et al. 2009). Macrocolonia coincide majoritariamente com a proposta tradicional do grupo, definido por Plumulariida e Haleciida (no original Haleciida inclui a família Syntheceidae; Bouillon 1984, 1995; nó C\_2 Tabela 4, Figura 4), caracterizados por hidrantes com endoderme gástrica diferenciada em duas regiões bem definidas, com simetria bilateral sem diafragma: “Hydranthes à hypostome conique, et dont le feuillet endodermique est différencié em deux régions distinctes, hydranthes rétractables dans leurs hydrotèques. Celles-ci ont une symétrie bilatérale, sont dépourvues de diaphragme mais leur plancher est perforé par un hydropore” (Bouillon 1984, p. 20; Shimabukuro & Marques 2006). Macrocolonia é grupo com a maior riqueza de espécies dentre os Medusozoa, e onde a fase de medusa está reduzida em gonóforos fixos na grande maioria das espécies. Nossa hipótese destaca a proposta de novos táxons assim como reajustes na classificação de táxons já definidos. Entretanto, não consideramos necessário que o grupo Macrocolonia seja reinterpretado *per se*, mas destacamos aspectos interessantes de sua evolução relacionados a *Staurotheca*, Zygophylacinae, *Schizotricha* e *Nemalecium lighti*.

### **Macrocolonia: Staurothecida *taxon novum* – Staurothecidae *família nova* (Clado D) e Symplectoscyphidae *família nova* (Clado E)**

Logo na base de Macrocolonia fica evidente o conflito com a taxonomia tradicional dos Leptothecata: Plumulariida, Sertularioidea e Sertulariidae não são monofiléticos em seus contextos tradicionais. O ramo basal de Macrocolonia inclui um clado com baixo suporte, mas que nomeamos como

Staurothecida para preservar a lógica taxonômica de Leptothecata. Staurothecida *taxon novum* inclui duas novas famílias bem suportadas que, de certa forma, corroboram padrões e discussões anteriores (Moura et al. 2007; Peña Cantero et al. 2010). A primeira família, Staurothecidae *família nova* (Clado D) e gênero-tipo *Staurotheca*, inclui *Staurotheca* spp., já atribuído a Syntheciidae (Stechow 1923, Millard 1975; Bouillon 1995; Peña Cantero 1997b), Sertulariidae (Peña Cantero et al. 1997b). Morfologicamente, Staurothecidae, monotípica, é caracterizada pelos mesmos caracteres do gênero *Staurotheca* (cf. Peña Cantero et al. 1997b, p. 336;. 1999).

A segunda família é Symplectoscyphidae *família nova* (Clado E) e seu gênero-tipo é *Symplectoscyphus*. Symplectoscyphidae *família nova* engloba dois gêneros historicamente considerados como relacionados, *Symplectoscyphus* e *Antarctoscyphus* (cf. Peña Cantero et al. 1997a). A família é morfologicamente caracterizada pela presença de três cúspides na borda da hidoteca e pelos opérculos divididos em três valvas, mas os gêneros apresentam diferenças na morfologia das colônias, ramificação e formato da gonoteca (Peña Cantero et al. 1997a, p. 24). Destacamos que *Symplectoscyphus curvatus* pode ser um caso de revalidação taxonômica ou identificação incorreta que, eventualmente, pode também ser o caso de *Symplectoscyphus turgidus* (ver abaixo).

Há uma interessante particularidade geográfica entre os grupos que eram classicamente considerados como “Sertulariidae”. Os Staurothecida *Staurotheca*, *Symplectoscyphus* e *Antarctoscyphus* têm ampla representação polar, especialmente antártica e subantártica, corroborando uma história filogenética única. Outro grupo “sertulariídeo” com afinidade polar é *Sertularella* que, por sua vez, também aparece como uma família nova à parte (ver abaixo). Por outro lado, há o contraste com os outros gêneros com maior representatividade tropical e subtropical, como *Amphisbetia*, *Diphasia*, *Dynamena*, *Sertularia* e *Thyroscyphus*, por exemplo.

Outras referências relevantes: Peña Cantero et al. (1997a, 1997b); Peña Cantero & Vervoort (2003); Peña Cantero (2010).

#### **Macrocolonia: Haleciida, Halecioidea, Haleciidae *sensu novum* (Clado F)**

Haleciidae *sensu novum* (e os táxons redundantes Halecioidea e Haleciida), ao menos no que tange *Halecium*, é um táxon homogêneo e monofilético, grupo-irmão de Sertulariida *taxon novum* e Plumulariida *sensu*

*novum*. A complexa história taxonômica do grupo é revista por Calder (1991). Chama a atenção que alguns grupos atribuídos à Haleciidae foram correlacionados a Plumulariidae e Lafoeidae devido à presença de nematotecas (Fraser 1946), mas este caráter está ausente do gênero *Halecium*. Nossa topologia traz dúvidas com relação ao escopo de Haleciidae *sensu novum*, em que os gêneros *Hydrodendron* e *Nemalecium* aparecem como grupos-irmãos de Plumulariidae (Linhagem L5; Figuras 1-3, ver discussão abaixo).

*Halecium* apresenta colônias geralmente eretas e ramificadas, com apófises e comumente hidrantóforos, hidrantes apoiados sobre diafragmas mas que não se retraem nas hidrotecas caracteristicamente rasas por desmócitos bem conspícuos, gonóforos fixos em gonotecas que podem ser solitárias ou agregadas, geralmente com dimorfismo sexual (cf. Calder 1991).

Outras referências relevantes: Cornelius (1995a); Schuchert (2005); Peña Cantero (2014).

#### **Macrocolonia: Sertulariida *taxon novum* (Clado G)**

Em seu sentido tradicional, táxons “sertulariídeos” eram definidos com base na morfologia da colônia e hidroteca, e há tempos se conjectura sobre a plasticidade desses caracteres e sua intergradação (Nutting 1904). O escopo de Sertulariida *taxon novum* inclui uma série de linhagens de “sertulariídeos” que são aqui definidos em famílias e sensos novos, inclusive integrando Thyroscyphidae e Zygophylacidae. Staurothecidae e Symplectoscyphidae foram excluídos de Sertulariida (ver acima).

- Macrocolonia Sertulariida *taxon novum*: Sertularellidae *família nova* (Clado G 1).— Clado bem suportado, que inclui o especioso gênero *Sertularella*, com mais de uma centena de espécies distribuídas mundialmente. Caracteriza-se por colônias eretas, mono ou polissifônicas, ramificadas ou não, pólipos em duas fileiras alternadas, hidrotecas com quatro dentes marginais e opérculo piramidal com quatro válvulas triangulares (Calder 1991). Sertularellidae demanda a eventual reinterpretação taxonômica de *Symplectoscyphus turgidus* e corrobora *Sertularelloides cylindritheca* como Thyroscyphidae (Figura 1).

Outras referências relevantes: Vervoort (1993); Vervoort & Watson (2003).

- Macrocolonia Sertulariida *taxon novum*: Thyroscyphidae (Clado G 2).— “Sertulariidae” foi dividido em três subfamílias, Sertulariinae, Thyroscyphinae e Sertomminae, considerando hidroteca pedicelada ou sésil e ceco abcaulinar

ausente ou presente (Stechow 1920). Morfologicamente, Thyroscyphidae são as espécies de Sertulariida *taxon novum* com hidrotecas pediceladas com um diafragma anelar e hidrantes com dobra anular basal, em vez de um divertículo abcaulinar, incluindo os gêneros *Thyroscyphus*, *Sertularelloides*, *Thyroscyphoides*, *Uniscyphus* e *Symmetrosyphus* (Calder 1991).

Historicamente, a família Thyroscyphidae tem sido reconhecida como monofilética e à parte de Sertulariidae em alguns estudos (e.g., Calder 1991; Shimabukuro & Marques 2006), mas outros mantêm seus gêneros historicamente associados a Sertulariidae (cf. Millard 1975; Bouillon 1985). Decidimos pela manutenção da família dado seu alto suporte e por corroborar outros padrões semelhantes (Leclère et al. 2009; Moura et al. 2011a), mesmo com pequenas variações na posição de espécies de *Thyroscyphus*. Ressaltamos a consolidação da inclusão de *Sertularelloides cylindritheca* em Thyroscyphidae, uma espécie que já foi considerada como *Sertularella cylindritheca* e tem como sinônimo *Cnidoscyphus macrotheca* (cf. Peña Cantero et al. 2010; Moura et al. 2011a, 2011b). Os demais táxons já associados à Thyroscyphidae precisam ser incluídos em análises futuras, inclusive *Parascyphus* (duas espécies), com afinidades duvidosas com o grupo (cf. Calder 1991).

- Macrocolonia Sertulariida *taxon novum*: Sertulariidae *sensu novum* (Clado G 3).— Devido às modificações referidas acima, é necessária uma redefinição dos grupos incluídos em Sertulariidae em relação ao senso tradicional, o que diminui sua imensa riqueza derivada de assumir-se um grupo polifilético. Parece evidente que, mesmo em seu escopo atual, a família necessita ser amplamente revista, já que os gêneros amostrados com maior número de espécies (e.g., *Sertularia* e *Dynamena*) não resultaram como monofiléticos, persistindo indefinições anteriores (cf. Calder 1991, p. 86-87, incluindo histórico da classificação da família). Em seu escopo atual, e com muitos gêneros por ainda serem amostrados, Sertulariidae *sensu novum* inclui espécies com opérculos não-piramidais, seja com duas valvas (sendo a adcaulinar algumas vezes subdividida em dois) (e.g., *Amphisbetia*, *Dynamena*, *Hydrallmania*, *Sertularia*), seja com opérculo adcaulinar com uma valva (e.g., *Abietinaria*, *Diphasia*, *Idiellana*, *Salacia*, *Thuiaria*), mas a distribuição dos caracteres é homoplástica na topologia principal. Outros caracteres, como fasciculação,

arranjo das fileiras de hidrotecas, morfologia das bordas das hidrotecas são igualmente não informativos.

Também é interessante notar que subfamília Zygothylacinae agrupa apicalmente com os gêneros *Abietinaria*, *Hydrallmania*, *Thuiaria* e *Sertularia*. Zygothylacidae, muitas vezes é considerada uma subfamília de Lafoeidae (ver histórico em Calder 1991; Marques et al 2006a), e caracterizada pela presença de uma hidroteca não tubular, muitas vezes bilateral (Marques et al. 2006a), como em Sertulariidae *sensu novum*. Espécies do grupo Zygothylacidae já foram consideradas Sertulariidae, próximas de *Abietinaria*, devido a forma das colônias, presença de opérculo e morfologia da hidroteca (ver Peña Cantero & García Carrascosa 1993). Entretanto as espécies analisadas de Zygothylacidae têm caracteres diferentes de Sertulariidae *sensu novum*, como nematotecas e gonotecas agregadas em copínias ou escapos (Marques et al. 2006a).

Outras referências relevantes: Berrill (1949); Calder (1991); Cornelius (1995a, 1995b); Migotto (1998); Marques et al. (2005b).

#### ***Nemalecium lighti* e *Hydrodendron mirabile* (L5)**

Duas linhagens tradicionalmente consideradas como haleciídeos, *Nemalecium* e *Hydrodendron*, aparecem como grupos externos em relação à Plumulariida, mas não formam um grupo monofilético. *Nemalecium lighti* aparece como basal em relação aos Plumularioida + *Hydrodendron*. O ciclo de vida de *N. lighti* é particular, com gonóforos liberados com corpúsculos que podem auxiliar na compensação na coluna d'água (Gravier-Bonnet & Migotto 2000), sendo essa morfologia igualmente registrada em alguns Plumulariidae (e.g., *Macrorhynchia philippina* cf. Gravier 1970) e Aglaopheniidae (e.g., *Dentitheca bidentata* cf. Migotto & Marques 1999). Ainda, a presença de “nematodáctilos” na coroa de tentáculos (Hargitt 1924), embora considerada não-homóloga de nematóforos (Calder 1991), merece uma reanálise com relação à sua organização e genes reguladores de seu desenvolvimento. É bem provável que análises futuras definitivamente excluam *Nemalecium* de Haleciidae *sensu novum* e corroborem sua afinidade com os Plumulariida.

Já *Hydrodendron*, posicionado como grupo irmão da família Aglaopheniidae com suporte alto, de fato compartilha com os Plumulariida *sensu novum* a presença de nematóforos e, ocasionalmente, nematotecas, o que já foi considerado como evolução convergente (Leclère et al. 2007). A

posição taxonômica deverá ser revista e poderá ser testada com a inclusão de mais terminais de *Hydrodendron* (vinte e quatro espécies). Outras referências relevantes: Rees & Vervoort (1987); Vervoort (1987); Cornelius (1995b)

### **Macrocolonia: Plumupheniida *taxon novum* – Aglaopheniida *taxon novum* + Plumulariida *sensu novum* (Clado H + I)**

Aglaopheniida *taxon novum* + Plumulariida *sensu novum* é um grupo estável, definindo um clado de leptotecados com hidrotecas unisseriadas (Cornelius 1995b), referenciado em trabalhos tradicionais (Bouillon 1985, 1994) e análises mais recentes (Leclère et al. 2007, 2009; Peña Cantero et al. 2010) (Figuras 1-3).

#### **Aglaopheniida *taxon novum* (Clado H)**

Aglaopheniida tem alto suporte nodal e é congruente com resultados recentes (Leclère et al. 2007, 2009; Moura et al. 2012). Propostas prévias de sua taxonomia suprafamiliar não são congruentes com nossa topologia, uma vez que Gymnangiinae/Aglaopheniinae e Aglaopheniini/Cladocarpini (Calder 1997) não são monofiléticos por conta do posicionamento de *Gymnangium gracilicaule* e *Lytocarpia* spp., respectivamente. Igualmente, todos os demais gêneros amostrados de Aglaopheniidae também não são monofiléticos em nossa proposta, exceto por *Macrorhynchia*. O padrão geral (Figura 1), entretanto, é similar a inferências anteriores (Leclère et al. 2009). Aglaopheniida é caracterizada pela presença de nematóforos com nematotecas laterais parcialmente fusionadas á hidroteca, dispostas em câmaras únicas e imóveis (cormídio) (Peña Cantero et al. 2010), além de que parte do grupo tem as gonotecas protegidas por córbulas ou filatocarpos (Cornelius 1995b).

Outras referências relevantes: Svoboda & Cornelius (1992).

#### **Plumulariida *sensu novum* (Clado I)**

Plumulariida *sensu novum* inclui quatro famílias que possuem em comum hidrotecas livres com simetria radial, todas com alto suporte nodal). O ramo basal é Schizotrichidae (Figuras 1-3), que originalmente era considerado como grupo-irmão de Aglaopheniidae (Peña Cantero et al. 2010, com definição morfológica à p. 54).

O padrão de relações das três outras famílias de Plumulariida *sensu novum* é diferente de propostas anteriores (cf. Leclère et al. 2007), o que deve ser produto da alta heterogeneidade molecular no grupo. A topologia (Kirchenpaueriidae (Halopterididae, Plumulariidae)) (cf. Leclère et al. 2009;

Peña Cantero et al. 2010) refuta que a ausência de hidroteca no hidrocaule das colônias seja uma sinapomorfia para Plumulariidae, Kirchenpaueriidae e Aglaopheniidae (Schuchert 1997), sendo sua ocorrência homoplástica (relação filogenética presente em resultados parciais de Leclère et al. 2009).

Kirchenpaueriidae é caracterizada pela ausência de nematotecas pares laterais, 1-2 nematóforos mesial(is), nu(s) ou com nematoteca(s) reduzida(s), associado(s) a cada hidroteca, geralmente reduzidas (Peña Cantero et al. 2010). Kirchenpaueriidae foi considerado com posição basal nos Plumulariida devido à sua nematoteca morfologicamente simples (Stechow 1923), inclusive semelhante à dos Haleciidae (Calder 1997), uma hipótese que é refutada em nossos resultados. As relações entre os Kirchenpaueriidae são semelhantes a topologias anteriores (Peña Cantero et al. 2009), e corroboram que *Ventromma* (*Ventromma halecioides*, por alguns considerado como *Kirchenpaueria halecioides*, ver WoRMS; Tabela 1) é um clado à parte (cf. Calder 1991; Peña Cantero & Marques 1999), e não um sinônimo de *Kirchenpaueria* (cf. Millard 1975; Bouillon 1985), de quem se diferencia pela presença de nematóforos com nematotecas com duas câmaras (Calder 1991). Em nossa topologia, os gêneros *Kirchenpaueria*, *Pycnotheca* e *Oswaldella* são monofiléticos. Especificamente para *Oswaldella*, com distribuição restrita à Antártica e Patagônia (Marques & Peña Cantero 2010a; Miranda et al. 2013b), os suportes são baixos, o que deve estar relacionado à baixa variabilidade entre as espécies amostradas. Resta ainda incluir em análises futuras os gêneros monotípicos *Halicornopsis*, *Ophinella* e *Wimveria*.

Como já demonstrado, Halopterididae torna-se monofilético com a exclusão de Schizotrichidae, e considerando *Polyplumaria flabellata* como incluída na família (Cornelius 1995b; Calder 1997; em conflito com a posição de Schuchert 1997 e taxonomia proposta no WoRMS). Halopterididae pode ser caracterizado conforme Peña Cantero et al. (2010). Seus gêneros não resultaram como monofiléticos (cf. Leclère et al. 2007, 2009; Moura et al 2007; Peña Cantero et al. 2010), corroborando dúvidas sobre a interpretação da diversidade de formas das colônias, que poderiam ser identificadas como pertencendo a mais de um gênero (Schuchert 1997). *Halopteris* é dividido em diversos clados diferentes com suporte alto. A posição de *Antennella* spp. (Figuras 1-3) corrobora hipóteses sobre uma origem múltipla de colônias “simplificadas” a partir de ancestrais pinados (Schuchert 1997). Os gêneros não



amostrados *Anarthoclada* (uma espécie), *Astrolabia* (duas espécies), *Nuditheca* (três espécies) e *Pentatheca* (uma espécie) são de posição duvidosa, já considerados como Aglaopheniidae (Bouillon et al. 2006), Halopterididae (Calder 1997; Schuchert 1997) e Schizotrichidae (Peña Cantero et al. 2010).

O último clado é Plumulariidae, grupo irmão de Halopterididae, definido morfológicamente em (Peña Cantero et al. 2010) e bem suportado molecularmente. A taxonomia do grupo, entretanto, é claramente insuficientemente embasada, com gêneros mal definidos e caracteres plásticos (Calder 1997). Nossa topologia mostra dois cladogramas principais, bem suportados. O primeiro clado inclui *Dentitheca* e *Plumularia*, nenhum dos gêneros monofilético. Dessas espécies, *Dentitheca bidentata* é peculiar por seu hermafroditismo e produção de medusoides (Migotto & Marques 1999). O segundo clado inclui as demais *Plumularia* (9 espécies, incluindo a espécie tipo *Sertularia setacea* Linnaeus, 1758 e *Plumularia margaretta* -uma espécie previamente atribuída à *Monotheca*-), e duas espécies de *Nemertesia* em condição monofilética, mas que tornam *Plumularia* não-monofilético. *Nemertesia* foi também objeto de estudo recente (Moura et al. 2012), com resultados diferentes dos nossos. Porém, no geral, nossos resultados são geralmente congruentes com padrões da literatura (Leclère et al. 2007, 2009; Peña Cantero et al. 2010).

Outras referências relevantes: Millard (1962); Ansín Agís et al. (2001); Schuchert (2014).

### **Cenários evolutivos, ciclo de vida e biogeografia**

Leptothecata cumpre as premissas que corroboram uma irradiação adaptativa (Glor 2010): alta taxa de diversificação de linhagens em um período relativamente curto de tempo com a presença de alterações e inovações morfológicas (e.g., estrutura das colônias) e ecológicas (e.g., ciclo de vida bentônico) marcantes nas linhagens consideradas. Entretanto, taxas de extinção em especial nos Macrocolonia, são difíceis de serem caracterizadas devido ao registro fóssil limitado, o que limita também a compreensão da distribuição histórica de linhagens ancestrais. Por isso a composição de cenários evolutivos para leptotecados realizada por alguns autores podem ser considerados, na melhor das hipóteses, conjecturas fluidas.

Apesar dos dados incompletos, há diferentes propostas para explicar a diversificação de espécies de leptotecados, especialmente nos grupos com colônias eretas complexas e sem medusa como, por exemplo, a existência de um eventual ganho energético advindo da supressão da medusa (discutido em Cornelius 1992). Alguns postulam que os eventos múltiplos de perda da medusa, em conjunto com a diminuição do número de larvas e a dispersão resultante pode ter sido benéfica (Cornelius 1990, 1992, baseado em Naumov 1969; cf. Também Ryaland & Warner 1986), como ocorre na maioria de espécies bentônicas modulares. Características de espécies com predomínio de pólipos no ciclo de vida, a filopatria, a produção de prole assexuadas por períodos prolongados e a dispersão das colônias (cf. Thiel & Gutow 2005) seriam variáveis importantes na abundância deste tipo ciclos de vida em “antoatecados” e leptotecados (Cornelius 1990, 1992).

Porém, é curioso notar uma dubiedade da interpretação das “vantagens” de pólipos ou medusa. Cornelius (1990, p. 591; trecho sublinhado destacado por Leclère et al. 2010, p. 2) coloca que *“This poses again the question that if medusa loss is advantageous, and if it can evolve rapidly, then why have not all recent forms dispensed with the medusa long ago?”*, considerado o “paradoxo de Cornelius” (Leclère et al. 2009). Porém, o ‘paradoxo’ colocado pelo próprio Cornelius tem compreensão oposta: *“The widespread loss of the medusa stage is a paradox in view of its presumed advantage and undoubted complexity”* (Cornelius 1992, p. 249, nosso sublinhado).

A partir dessa compreensão, Leclère et al. (2009) propõe um cenário explicativo de evolução dos ciclos de vida dos leptotecados, que se aproximaria ao modelo de equilíbrio pontuado, e no qual o paradoxo de Cornelius (no senso da manutenção da medusa na maioria das linhagens em Statocysta) estaria relacionado à seleção de espécies (Jablonski 2008). Nesse cenário, linhagens com colônias simples (típicas de Statocysta) teriam maior investimento na fase pelágica reprodutiva e dispersiva, sendo sua fase bentônica caracterizada por assentamento rápido, geralmente “runners” por refúgios e que apresentem tendência a assentamentos em substratos bióticos, em que teriam menor concorrência e, também teriam maior tolerância a fatores de estresse. Em contraponto, espécies com colônias eretas e complexas, sem medusa (típicas de Macrocolonia), seriam mais competitivas por substrato, teriam capacidade limitada de dispersão, o que poderia resultar em baixos níveis de fluxo gênico e

consequente especiação local frequente (Tabela 2). O ressurgimento homoplástico de espécies com medusoides a partir de linhagens que já teriam perdido as medusas poderia, por sua vez, ser explicado devido a altas taxas de extinção de clados que não possuiriam benefícios reprodutivos ou dispersivos, limitando o fenômeno de *brooding* colonial (Leclère et al. 2009). Desta forma, é evidente que os autores presumem maior capacidade dispersiva das espécies com fase pelágica (cf. Gibbons et al. 2010a, 2010b; compreensão diferente em Cornelius 1990, 1991, 1992).

A partir de uma interpretação das estratégias reprodutivas nos Leptothecata com base nas topologias obtidas, nosso resultado é congruente ao cenário de acesso e dispersão a novos refúgios das espécies *runners* de Statocysta, em contraste com espécies competitivas de Macrocolonia. Uma estase macroevolutiva, no sentido de haver uma manutenção do tipo de estilo de vida e de nichos ancestrais planctônicos (cf. Eldredge et al. 2005), predominaria nas linhagens com medusa de cladogênese.

Porém, pode-se considerar que o processo que levou ao maior número de espécies em Macrocolonia não seja produto da dispersão limitada de suas espécies. Há vários fatores negligenciados a serem considerados que, somados, devam ter colaborado na exploração de novos nichos ecológicos (Tabela 2). O primeiro fator é o tipo de fertilização (Miller 1972; discutido nos Corynidae e Obeliinae por Panteleeva (2002), bastante debatido para outros organismos modulares como ascídias e briozoários (Bishop 1998; Bishop & Pemberton 2006). Hidrozoários com medusa liberam seus gametas sexuais no meio, ocorrendo fertilização externa, enquanto organismos sem medusa tendem a reter o óvulo, e possuem fertilização interna, por vezes também com incubação, inclusive com estruturas específicas como acrocistos, liberando uma plânula. O segundo fator é a estruturação morfológica do suporte da colônia, em que predomina um eixo principal com crescimento monopodial ereto e ramos de porte mais robusto, que são ainda enrobustecidos pela fusão das hidrotecas com os hidrocaule (e.g., Kosevich 2012). Um terceiro fator está relacionado ao incremento da complexidade modular e morfológica, com a maior frequência de ocorrência de nematóforos/nematotecas, resultando, em alguns grupos, estruturas complexas de defesa reprodutiva (Marfenin 1997; Nagy et al. 2012) como córbulas e filatocarpos. Todos estes fatores corroboram a visão de Cornelius (1992), em que a fase reprodutiva é mais duradoura ou

até perenizada, com os pólipos vivendo mais tempo que as medusas e diminuindo tempos geracionais, aumentando, portanto, a taxa anagenética.

Os fatores expostos têm consequências evidentes em interpretações biogeográficas e de endemismo dos Hydrozoa. Por um lado, espécies com pólipos/medusa podem apresentar maior endemicidade que espécies sem medusa (Cornelius 1990, 1992) e espécies holoplanctônicas (que incluem os sifonóforos). Por outro lado, espécies com pólipos/medusa são menos representadas em áreas remotas de mar profundo e fora das plataformas continentais (e.g., Calder 1996; Calder & Vervoort 1998), como algumas linhagens (e.g., Lafoeidae, Zygophylacidae), além de em regiões climáticas extremas (e.g., linhagens típicas ou preponderantemente “antárticas”, como *Antarctoscyphus*, *Oswaldella* e *Symplectoscyphus*, entre outras; Miranda et al. 2013). Provavelmente a somatória das restrições de nichos ecológicos dos pólipos e das medusas são fatores fortemente limitadores de seu potencial de distribuição geográfica (cf. Mendoza-Becerril & Marques 2013) e, portanto, possuir ambas as fases no ciclo de vida restringe sobremaneira as áreas que podem ser colonizadas.

Concluimos que reducionismos de cenários a vantagens e desvantagens da presença da fase de medusa são simplificações excessivas de processos evolutivos. Fica também evidente que a evolução dos ciclos de vida tem consequências na compreensão da distribuição do grupo. Em nosso estudo apontamos apenas padrões gerais e hipóteses que poderão ser testados no futuro, e uma melhor compreensão sobre a evolução dos Leptothecata ainda demandará análises formais e taxas de origem e extinção em um contexto paleoceanográfico mais definido.

### **Considerações finais**

Consideramos que a taxonomia de Leptothecata encontra-se em um ponto de inflexão, em que evidências acumuladas nas últimas décadas demandam novas interpretações. É evidente que ainda há muito a ser adicionado em análises de Leptothecata. A partir de nossos dados, entretanto, percebe-se que a taxonomia tradicional é incongruente com os padrões revelados por análises moleculares, e que novas interpretações são possíveis. O monofilismo de substancial parte dos táxons tradicionais, desde superordens/ordens até famílias/gêneros, não se sustenta. Mas padrões gerais

também são reforçados, como Statocysta e Macrocolonia, assim como diversos outros propostos nesse estudo.

A partir de nossos dados filogenéticos (Figura 1) propomos uma reorganização da taxonomia do grupo. Ressaltamos que restam serem incluídas famílias inteiras ainda não amostradas em análises moleculares e que os rankings são ilustrativos, obviamente sendo importante a relação de inclusão entre os clados:

Subclasse Leptothecata Cornelius, 1992

Ordem Lafoeida Bouillon, 1984, *sensu novum*

Família Lafoeidae Hincks, 1868

Ordem Laodiceida *taxon novum*

Ordem Statocysta Leclère, Schuchert & Manuel 2007

Subordem Campanulinida Bouillon, 1984, *sensu novum*

Subordem Eirenida *taxon novum*

Subordem Proboscoida Broch, 1910 *sensu novum*

Infraordem Campanulariida Bouillon, 1984, *sensu novum*

Infraordem Obeliida *taxon novum*

Ordem Macrocolonia Leclère, Schuchert & Manuel 2007

Subordem Staurothecida *taxon novum*

Subordem Haleciida Bouillon, 1984 *sensu novum*

Subordem Sertulariida *taxon novum*

Subordem Plumupheniida *taxon novum*

Infraordem Aglaopheniida *taxon novum*

Infraordem Plumulariida Bouillon, 1984 *sensu novum*

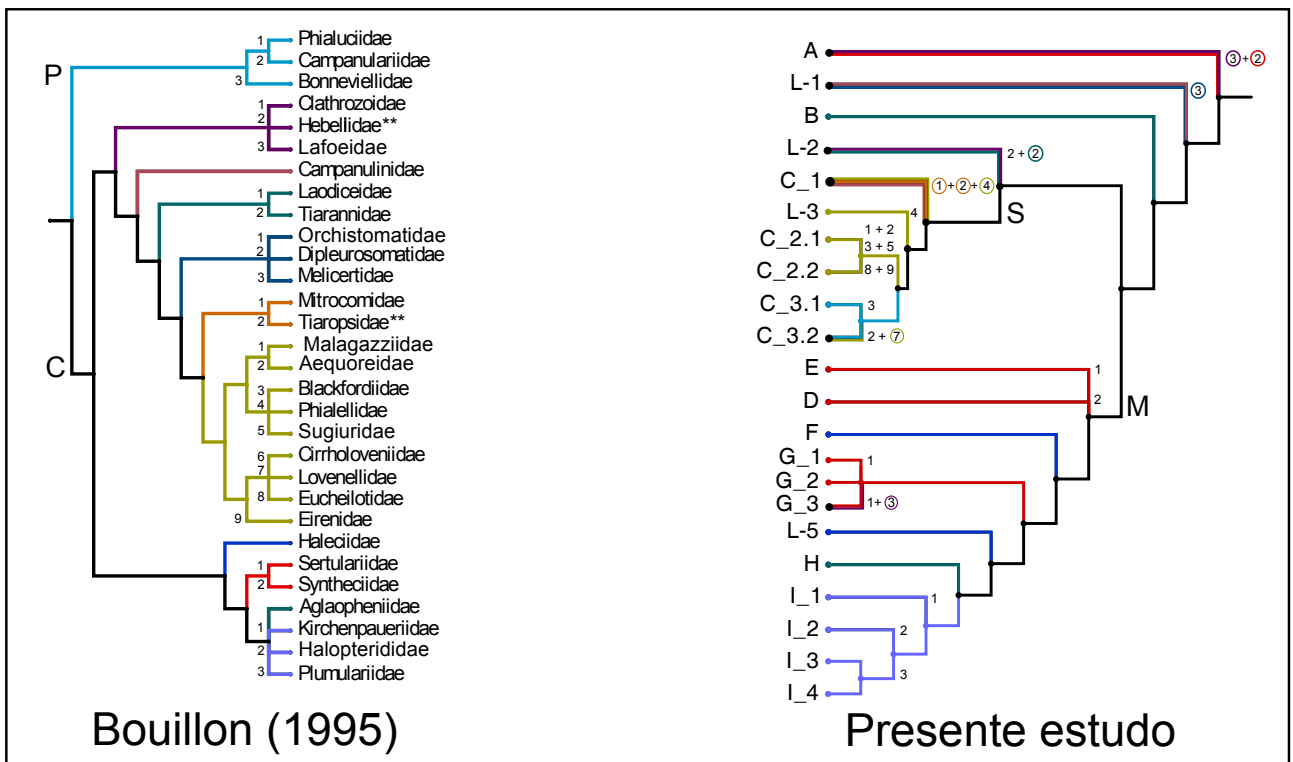
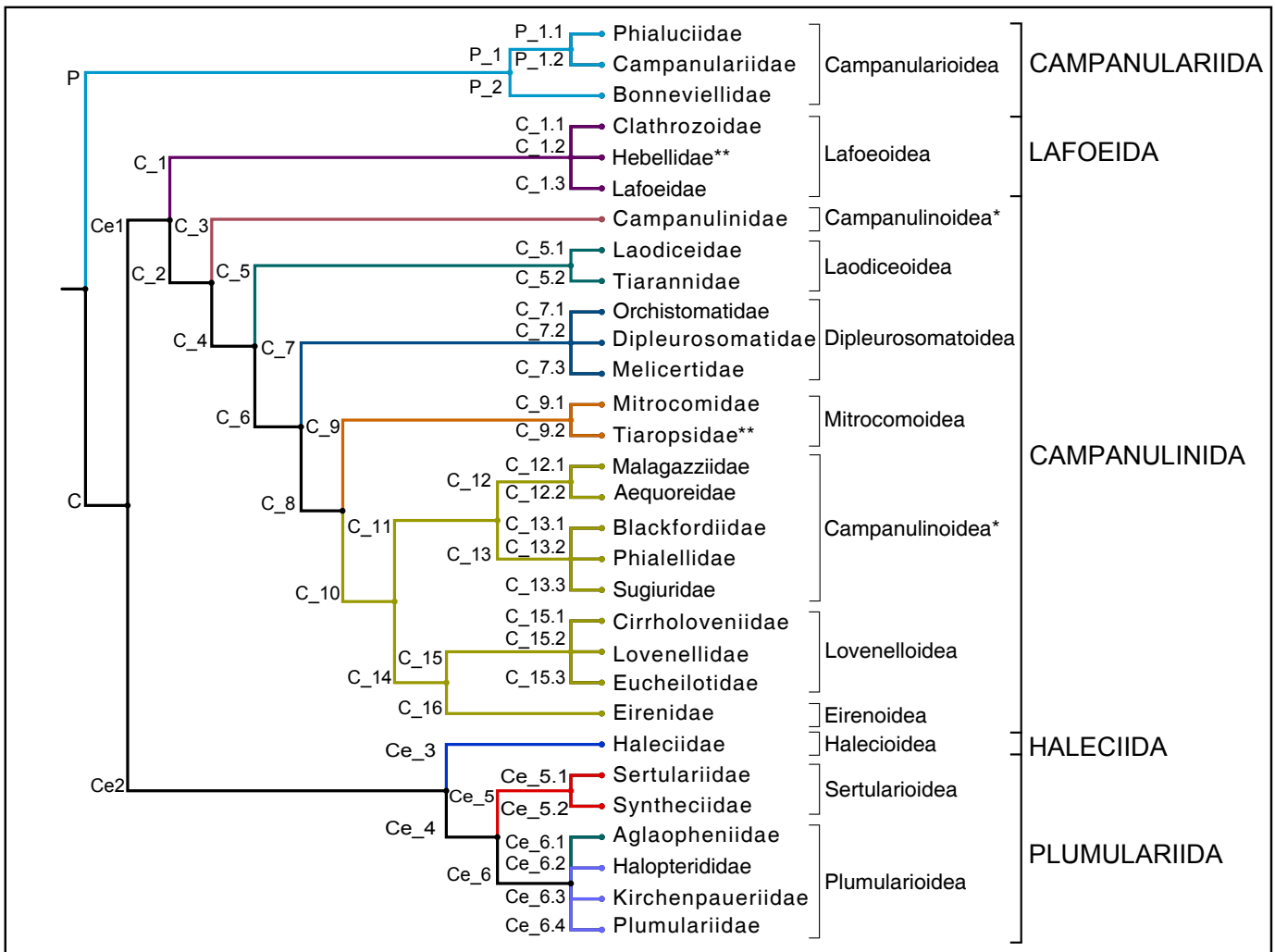


Figura 4 - Cladograma (Superior): Classificação de Leptohecata, segundo Bouillon (1995). As cores representam clados representativos na proposta; códigos presentes na base dos ramos são similares aos utilizados na Tabela 4; símbolo \* = proposta original não monofilética. Cladograma (Inferior): Comparação de clados propostos na classificação de Bouillon (1995) (esquerda, define-se as famílias) com os principais clados e linhagens presentes no nosso estudo (direita; veja Figura 1); as cores representam clados representativos na proposta, e os números nas bases dos ramos finais representam um resumo da posição relativa das famílias na proposta de Bouillon (1984, 1995) e daquelas analisadas no presente estudo; aqueles clados definidos por mais de uma família da proposta de Bouillon (1995) são destacados pelas cores e número da família em cada caso. Não se apresenta a posição da espécie *Billardia subrufa* (representada no texto com o código L-3) por apresentar uma posição instável nos resultados multilocus. Símbolo \*\* = família não presente no trabalho original de Bouillon (1995), M = clado Macrocolônia, S = clado Statocysta.

Tabela 4 - Proposta sistemática para o grupo Leptothecata, baseada no arcabouço de Bouillon (1995). A coluna "Monofilético? [16S18S28S\_N]" informa se o grupo proposto é monofilético ou não em nosso resultado principal. Autores originais e aqueles que fizeram propostas de modificação relevantes no grupo são listados, a partir de três recursos taxonômicos relevantes nos últimos vinte anos (Bouillon 1995; Cornelius 1995; WoRMS database). A coluna "P/M" informa se a proposta do grupo foi principalmente baseada em caracteres do pólipo (P) ou da medusa (M), ou ambas (P/M). Símbolos x= não se aplica por haver apenas uma espécie amostrada no contexto de nossa análise (a partir da taxonomia do WoRMS); \*\*= diferenças na definição do grupo em relação à proposta original de Bouillon 1995 (ver texto principal para detalhes); símbolo \*\*\*= segundo Calder 1997; não amostrado= grupo não amostrado no presente estudo filogenético ou na monografia de Cornelius 1995; SIM [x]= grupo não monofilético devido a uma espécie "fora do grupo esperado" (veja resultados e discussão). As referências da coluna CÓDIGO encontram-se representadas na Figura 4; nova proposta taxonômica e contrastes com a proposta tradicional de Bouillon (1995) apresenta-se na Figura 4 e Tabelas 1 e 5.

CÓDIGO	Taxa	Monofilético? [16S18S28S_N]	Bouillon 1995	WoRMS 2014	Cornelius 1995	P/M
	LEPTOTHECATA	<b>SIM</b>	Subclasse; Fleming, <b>1828</b> (=Thecatae)	Ordem; Cornelius 1992	Subclasse; Cornelius 1992	P/M
P	PROBOSCOIDA	não	Ordem; Broch, 1909	Broch, 1910 (não aceito: "polyphyletic assemblage")	Ordem; Broch, 1910	P
= P	Campanulariida	não	Subordem; Johnston, <b>1836</b>	ausente	= Bouillon 1995	
= P	Campanularioidea	não	Johnston, <b>1836</b>	ausente	= Bouillon 1995	
P_1	Phialuciidae + Campanulariidae	x				P
P_1.1	Phialuciidae	não amostrado	Kramp, 1955	=	= Bouillon 1995	M
P_1.2	Campanulariidae	não	Johnston, <b>1836</b>	=	Johnston, 1837	M
P_2	Bonneviellidae	não	Broch, 1909	=	= Bouillon 1995	P
C	CONICA	não	Ordem; Broch, 1909	Broch, 1910 (não aceito: "polyphyletic assemblage")	Ordem; Broch, 1910	P
Ce_1	Campanulinida + Lafoeida	não				P
C_1	Lafoeida	não	Subordem; Agassiz <b>1865</b>	ausente	Subordem; Bouillon 1984	P
= C_1	Lafoeioidea	não	Agassiz, 1865	=	=	
C_1.1	Clathrozoidae	não amostrado	Stechow, 1921	=	= Bouillon 1995	P
C_1.2**	Hebellidae	não	Ausente (parte de Lafoeidae)	Fraser, 1912	= Bouillon 1995	P/M
C_1.3	Lafoeidae	não	Agassiz <b>1865</b>	Hincks, <b>1868</b>	= Bouillon 1995	P
C_2	Campanulinida	não	Subordem; Hincks, <b>1868</b>	ausente	Subordem; Bouillon 1984	P
C_3 & C_11**	Campanulinoidea	não	Hincks, <b>1868</b>	ausente	= Bouillon 1995	**

CÓDIGO	Taxa	Monofilético? [16S18S28S_N]	Bouillon 1995	WoRMS 2014	Cornelius 1995	P/M
C_3	Campanulinidae	não	Hincks, <b>1868</b>	=	=	M
C_4	Campanulinida - Campanulinidae	não		ausente		M
C_5	Laodiceoidea	<b>SIM [x]</b>	Browne, 1907	ausente	Agassiz, <b>1862</b>	M
C_5.1	Laodiceidae	<b>SIM [x]</b>	Browne, 1907	Agassiz, <b>1862</b>	= WoRMS	P/M
C_5.2	Tiarannidae	não	Russell, 1940	Russell, 1950	= Bouillon 1995	P/M
C_6	Dipleurosomatoidea + Mitrocomoidea + Lovenelloidea + Eirenoidea + Campanulinoidea*	não				M
C_7	Dipleurosomatoidea	x	Boeck, <b>1866</b>	ausente	= Bouillon 1995	M
C_7.1	Orchistomatidae	não amostrado	Bouillon, 1984 ( = Orchistomidae)	= (Orchistomidae: "incorrect formation of family name")	Bouillon, 1984 (sendo reconhecido como "Orchistomidae")	M
C_7.2	Dipleurosomatidae	não amostrado	Boeck, <b>1866</b>	Russell, 1953	= Bouillon 1995	P/M
C_7.3	Melicertidae	x	Agassiz, <b>1862</b>	=	=	P/M
C_8	Mitrocomoidea + Lovenelloidea + Eirenoidea + Campanulinoidea*	não				M
C_9	Mitrocomoidea	não	Torrey, 1909	ausente	Haeckel, <b>1879</b>	M
= idem C_9	Mitrocomidae	não	Torrey, 1909	Haeckel, <b>1879</b>	= WoRMS	
C_10	Lovennelloidea + Eirenoidea + Campanulinoidea*	não				M
C_11	Campanulinoidea* (= Campanulinoidea - Campanulinidae)	não				M
C_12	Malagazziidae + Aequoreidae	não				M
C_12.1	Malagazziidae	x	Bouillon, 1984	=	=	M
C_12.2	Aequoreidae	não	Eschscholtz, <b>1829</b>	=	=	M
C_13	Blackfordiidae + Phialellidae + Sugiuridae	não				M
C_13.1	Blackfordiidae	x	Bouillon, 1984	=	não amostrado	P/M
C_13.2	Phialellidae	x	Russell, 1953	=	=	P/M
C_13.3	Sugiuridae	x	Bouillon, 1984	=	não amostrado	P/M
C_14	Lovenelloidea + Eirenoidea	não				M



CÓDIGO	Taxa	Monofilético? [16S18S28S_N]	Bouillon 1995	WoRMS 2014	Cornelius 1995	P/M
C_15	Lovenelloidea	não	Russell, 1953	ausente	= Bouillon 1995	M
C_15.1	Cirrholoveniidae	não amostrado	Bouillon, 1984	=	=	P
C_15.2	Lovenellidae	não	Russell, 1953	=	=	P
C_15.3	Eucheilotidae	não	Picard, 1958	não aceito (sinônimo de Lovenellidae)	Bouillon, 1984	P
C_16	Eirenoidea	não	Haeckel, 1879	ausente	= Bouillon 1995	M
= C_16	Eirenidae	não	Haeckel, 1879**	=	= Bouillon 1995	
Ce 2	Haleciida + Plumulariida	não				P
Ce_3	Haleciida	não	Subordem; Hincks, 1868	ausente	Subordem; Bouillon, 1984	P
= Ce_3	Halecioidea	não	Hincks, 1868	ausente	= Bouillon 1995	P
= Ce_3	Haleciidae	não	Hincks, 1868	=	=	
Ce_4**	Plumulariida	não	Hincks, 1868	ausente	Subordem; Bouillon, 1984	
Ce_5**	Sertularioidea	não	Lamouroux, 1812	ausente	= Bouillon 1995	P
Ce_5.1	Sertulariidae	não	Lamouroux, 1812	=	=	P
Ce_5.2	Syntheciidae	x	Marktanner-Turneretscher, 1890	=		P
Ce_6	Plumularioidea	<b>SIM</b>	Hincks, 1868	McCrary, 1859***	Agassiz, 1862	P
Ce_6.1	Aglaopheniidae	<b>SIM</b>	Broch, 1918	Marktanner-Turneretscher, 1890	Agassiz, 1862	P
Ce_6.2	Kirchenpaueriidae	<b>SIM</b>	Millard 1962	Stechow, 1921; Marktanner-Turneretscher, 1890***	Stechow, 1921	P
Ce_6.3	Halopterididae	não	Millard, 1962	=	**Considerado Subfamília Halopteriinae (Millard, 1962) nos Plumulariidae	P
Ce_6.4	Plumulariidae	<b>SIM [x]</b>	Hincks, 1868	Agassiz, 1862; McCrary, 1859***	Agassiz, 1862**	P

Tabela 5 - Clados da hipótese de trabalho (Figura 1) comparados à proposta de Bouillon (1995). Destaca-se a equivalência dos grupos resultantes em nossa análise e aqueles propostos por Bouillon (1995), com a composição de grupos e/ou gêneros e/ou espécies em nossa hipótese (alguns já presentes na literatura recente, e.g.: Statocysta). Espécies que não ocorreram de maneira estável em nossas análises multilocus foram consideradas *incertae sedis* (símbolo \*\*). Para uma descrição filogenética das diferenças entre os nossos resultados e a proposta de Bouillon (1995), veja Figura 4; citações presentes da literatura recente na tabela: [1] Leclère et al. (2009); [2] Peña Cantero et al. (2010). Símbolo \*= grupo não monofilético a partir da taxonomia tradicional em WoRMS, no resultado apresentado na Figura 1 (topologia 16S18S28S\_N).

CLADOS principais	Bouillon (1995)	Grupos representados, ou // Gêneros, e/ou // Espécies
CLADO A Lafoeida + <i>Hincksella</i>	C1.3	<i>Acryptolaria conferta</i> ; <i>Lafoea dumosa</i> ; <i>Hincksella</i> sp.**
CLADO B Laodiceida <i>taxon novum</i>	C5*	<i>Laodicea undulata</i> ; <i>Modeeria rotunda</i> ; <i>Melicertissa</i> sp.; <i>Stegopoma plicatile</i>
CLADO C = Statocysta [1]	C3* C5.2* C8* P1* P2*	(C_1((C_2.1,C_2.2)(C_3.1,C_3.2))) // <i>Opercularella lacerata</i> **
CLADO C_1 Campanulinida <i>sensu novum</i>	C3* C9* C13.2* C5.2*	<i>Mitrocomella</i> // <i>Campanulina panicula</i> ; <i>Calycella syringa</i> ; <i>Phialella quadrata</i> ; <i>Opercularella pumila</i> ; <i>Tiaropsidium kelseyi</i> ; <i>Tiaropsis multicirrata</i>
CLADO C_2 Eirenida <i>taxon novum</i>	C10*	(C_2.1,C_2.2)
CLADO C_2.1 Eirenoidea <i>sensu novum</i>	C12.1* C16* C12.2 C13.3 C13.1	<i>Aequorea</i> *; <i>Eirene</i> * // <i>Blackfordia virginica</i> ; <i>Eutonina indicans</i> ; <i>Octophialucium indicum</i> ; <i>Rhacostoma atlantica</i> ; <i>Sugiura chengshanense</i>
CLADO C_2.2 "Eirenidae" + Lovenellidae	C16* C15.3*	<i>Eirene</i> *; <i>Eucheilota</i> *; <i>Eutima</i> *; <i>Helgicirrho</i> // <i>Hydranthea margarica</i> ; <i>Eugymnanthea japonica</i>
CLADO C_3 Proboscoida <i>sensu novum</i>	P* C15.2* C15.3*	(C_3.1,C_3.2)
CLADO C_3.1 Campanulariida <i>taxon novum</i>	P1.1* P2*	<i>Bonneviella</i> *; <i>Campanularia</i> *; <i>Orthopyxis</i> * // <i>Rhizocaulus verticillatus</i> ; <i>Silicularia rosea</i>
CLADO C_3.2 Obeliida <i>taxon novum</i>	C15.2* C15.3* P1.1*	<i>Laomedea</i> *; <i>Obelia</i> *; <i>Clytia</i> // <i>Lovenella gracilis</i> ; <i>Eirene brevistylis</i> ** ; <i>Eucheilota bakeri</i> ** ; <i>Gonothyrea loveni</i>
CLADO (D,E(F(G(H,I)))) Macrocolonia	Ce2*	(D,E(F(G_1(G_2,G_3))(H(I_1(I_2,_3,I_4))))))
CLADO (D,E) Staurothecida <i>taxon novum</i>	Ce5*	<i>Staurotheca</i> ; <i>Antarctoscyphus</i> ; <i>Symplectoscyphus</i>
CLADO D Staurothecidae <i>família nova</i>	Ce5*	<i>Staurotheca</i>
CLADO E Symplectoscyphidae <i>família nova</i>	Ce5*	<i>Antarctoscyphus</i> ; <i>Symplectoscyphus</i>

CLADOS principais	Bouillon (1995)	Grupos representados, ou // Gêneros, e/ou // Espécies
CLADO (F(G(H,I))) = Macrocolonia [1]	Ce2*	(F(G_1,G_2)(H(I_1(I_2,_3,I_4))))
CLADO F Haleciida <i>sensu novum</i>	Ce3*	<i>Halecium</i>
CLADO G Sertulariida <i>taxon novum</i>	Ce5*	(G_1(G_2, G_3))
CLADO G_1 Sertularellidae <i>familia nova</i>	Ce5*	<i>Sertularella</i> // <i>Symplectoscyphus turgidus</i> **
CLADO G_2 Thyroscyphidae	Ce5*	<i>Thyroscyphus</i> // <i>Sertularelloides cylindritheca</i>
CLADO G_3 Sertulariidae <i>sensu novum</i>	Ce5*	<i>Abietinaria</i> ; <i>Amphisbetia</i> *; <i>Diphasia</i> ; <i>Dynamena</i> *; <i>Hydrallmania</i> ; <i>Sertularia</i> *; <i>Thuiaria</i> // <i>Cryptolaria pectinata</i> ; <i>Idiellana pristis</i> ; <i>Salacia desmoides</i> ; <i>Zygophylax biarmata</i>
CLADO (H,I) Plumupheniida <i>taxon novum</i>	Ce6*	(H(I_1(I_2,_3,I_4))) // <i>Nemalecium lighti</i> **; <i>Hydrodendron mirabile</i> **
CLADO H Aglaopheniida <i>taxon novum</i>	Ce6.1	<i>Aglaophenia</i> *; <i>Gymnangium</i> *; <i>Lytocarpia</i> *; <i>Macrorhynchia</i> // <i>Cladocarpus integer</i>
CLADO I Plumulariida <i>sensu novum</i>	Ce6.2, Ce6.3*,Ce6.4	(I_1(I_2,_3,I_4))
CLADO I_1 Schizotrichidae [2]	Ce6.3*	<i>Schizotricha</i>
CLADO I_2 Kirchenpaueriidae	Ce6.2	<i>Oswaldella</i> // <i>Kirchenpaueria pinnata</i> ; <i>Pycnotheca mirabilis</i> ; <i>Ventromma halecioides</i>
CLADO I_3 Halopterididae	Ce6.3*	<i>Antennella</i> *; <i>Halopteris</i> * // <i>Monostaechas quadridens</i> ; <i>Polyplumaria flabellata</i>
CLADO I_4 Plumulariidae	Ce6.4*	<i>Nemertesia</i> ; <i>Plumularia</i> * // <i>Dentitheca bidentata</i>

## Referências bibliográficas

- Allman GJ. 1864. On the construction and limitation of genera among the Hydroida. In: *Annals and Magazine of Natural History*, 3rd series. 13:345–380.
- Allman GJ. 1871. A monograph of the gymnoblastic or tubularian hydroids. 1. The Hydroida in general. London: Published for the Ray Society. Pp. xxii, 154, pls 12.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.
- Anisimova M, Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55:539–552.
- Anisimova M, Gil M, Dufayard J-F, Dessimoz C, Gascuel O. 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* 60:685–699.
- Ansín Agís J, Ramil F, Vervoort W. 2001. Atlantic Leptolida (Hydrozoa, Cnidaria) of the families Aglaopheniidae, Halopteriidae, Kirchenpaueriidae and Plumulariidae collected during the CANCAP and Mauritania-II expeditions of the National Museum of Natural History, Leiden, the Netherlands. *Zoologische Verhandlungen* 333:1–268.
- Bardi J, Marques AC. 2009. The invasive hydromedusa *Blackfordia virginica* (Cnidaria: Blackfordiidae) in southern Brazil, with comments on taxonomy and distribution of the genus *Blackfordia*. *Zootaxa* 2198:41–50.
- Bergsten J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21:163–193.
- Berrill NJ. 1949. Growth and form in calyptoblastic hydroids. I. Comparison of a campanulid, campanularian, sertularian and plumularian. *Journal of Morphology* 85:297–335.
- Berrill NJ. 1950. Growth and form in calyptoblastic hydroids. II. Polymorphism within the Campanulariidae. *Journal of Morphology* 87:1–26.
- Bishop JDD. 1998. Fertilization in the sea: are the hazards of broadcast spawning avoided when free-spawned sperm fertilize retained eggs? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:725–731.
- Bishop JDD, Pemberton AJ. 2006. The third way: spermcast mating in sessile marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 46:398–406.
- Blanco OM. 1967. Nueva *Billardia* (Hydrozoa, Campanulariidae) con modificación de la diagnosis del género. *Neotrópica* 13:117–120.
- Blanco OM, Zamponi MO, Genzano G. 2000. Campanulinidae de la Argentina (Coelenterata, Hydrozoa, Hydroida). *Revista del Museo de La Plata* 14:267–278.
- Boero F, Bouillon J, Kubota S. 1997. The medusae of some species of *Hebella* Allman, 1888, and *Anthohebella* gen. nov. (Cnidaria, Hydrozoa, Lafoeidae), with a world synopsis of species. *Zoologische Verhandlungen* 310:1–53.
- Bouillon J. 1984. Révision de la famille des Phialuciidae (Kramp, 1955) (Leptomedusae, Hydrozoa, Cnidaria), avec un essai de classification des Thecatae-Leptomedusae. *Indo-Malayan Zoology* 1:1–24.
- Bouillon J. 1985. Essai de classification des Hydropolypes-Hydroméduses (Hydrozoa-Cnidaria). *Indo-Malayan Zoology* 2:29–243.
- Bouillon J. 1995. Classe des Hydrozoaires. In: Grassé PP, Doumenc D (editors). *Traité de Zoologie*. Tome III, Fascicule 2: Cnidaires, Cténaires. Masson, Paris. Pp. 29–416.
- Bouillon J, Boero F. 2000. The Hydrozoa: a new classification in the light of old knowledge. *Thalassia Salentina* 24:3–45.
- Bouillon J, Gravili C, Pagès F, Gili JM, Boero F. 2006. An introduction to Hydrozoa. *Mémoires du Muséum national d'Histoire Naturelle* Tome 194:1–591.
- Broch H 1910. Die Hydroiden der Arktischen Meere. In: Römer F, Schaudinn F (editors). *Fauna Arctica* 5. Jena, Fischer G. Pp. 128–248.
- Calder DR. 1991. Shallow-water hydroids of Bermuda: The Thecatae, exclusive of Plumularioidea. *Life Sciences Contributions* 154:1–140.
- Calder DR. 1996. Hydroids (Cnidaria: Hydrozoa) recorded from depths exceeding 3000 m in the abyssal western North Atlantic. *Canadian Journal of Zoology* 74:1721–1726.
- Calder DR. 1997. Shallow-water hydroids of Bermuda: superfamily Plumularioidea. *Life Sciences Contributions* 161:1–85.

- Calder DR. 2009. The Reverend Thomas Hincks FRS (1818–1899): taxonomist of Bryozoa and Hydrozoa. *Archives of Natural History* 36:189–217.
- Calder DR, Vervoort W. 1998. Some hydroids (Cnidaria: Hydrozoa) from the Mid-Atlantic Ridge, in the North Atlantic Ocean. *Zoologische Verhandlungen* 319:1–65.
- Cartwright P, Evans NM, Dunn CW, Marques AC, Miglietta MP, Schuchert P, Collins AG. 2008. Phylogenetics of Hydroidolina (Hydrozoa: Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88:1663–1672.
- Cartwright P, Nawrocki AM. 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology* 50:456–472.
- Collins AG. 2000. Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: Hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Scientia Marina* 64:5–22.
- Cornelius PFS. 1977. The linking of polyp and medusa stages in *Obelia* and other coelenterates. *Biological Journal of the Linnean Society* 9:45–57.
- Cornelius PFS. 1982. Hydroids and medusae of the family Campanulariidae recorded from the eastern North Atlantic, with a world synopsis of genera. *Bulletin of the British Museum (Natural History)* 42:37–148.
- Cornelius PFS. 1987. Donat Vladimirovitch Naumov (1921–1984). In: Bouillon J, Boero F, Cicogna F, Cornelius PFS (editors). *Modern Trends in the Systematics, Ecology and Evolution of Hydroids and Hydromedusae*. New York: Oxford University Press. Pp. 5–7.
- Cornelius PFS. 1990a. European *Obelia* (Cnidaria, Hydroida): systematics and identification. *Journal of Natural History* 24:535–578.
- Cornelius PFS. 1990b. Evolution in leptolid life-cycles (Cnidaria: Hydroida). *Journal of Natural History* 24:579–594.
- Cornelius PFS. 1991. Relationships between the cnidarian classes and the loss of the medusa stage. *Porcupine Newsletter* 5:3–6.
- Cornelius PFS. 1992. Medusa loss in leptolid Hydrozoa (Cnidaria), hydroid rafting, and abbreviated life-cycles among their remote-island faunae: an interim review. *Scientia Marina* 56:245–261.
- Cornelius PFS. 1995a. North-West European Thecate Hydroids and their Medusae. Part I. Introduction, Laodiceidae to Haleciidae. *Synopses of the British Fauna (n.s.)* 50. Pp. 347.
- Cornelius PFS. 1995b. North-West European Thecate Hydroids and their Medusae. Part 2. Sertulariidae to Campanulariidae. *Synopses of the British Fauna (n.s.)* 50. Pp. 386.
- Crawley SS, Hilu KW. 2011. Impact of missing data, gene choice, and taxon sampling on phylogenetic reconstruction: the Caryophyllales (angiosperms). *Plant Systematics and Evolution* 298:297–312.
- Daly M, Brugler MR, Cartwright P, et al. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668:127–182.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. 2011. Geneious v5.4. Available at [www.geneious.com](http://www.geneious.com)
- Eschscholtz JF. 1829. *System der Acalephen. Eine ausführliche Beschreibung aller Medusenartigen Strahlthiere*. Berlin: Dümmler F. Pp. 190.
- Felsenstein J. 2003. *Inferring Phylogenies*. 2nd edition. New York: Sinauer Associates. Pp. 580.
- Fleming J. 1828. *A history of British animals*. Edinburgh: Bell & Bradfute, and London. Pp. 565.
- Fraser CM. 1946. *Distribution and relationship in American hydroids*. Toronto, University of Toronto Press. Pp. 464.
- Gatesy J, DeSalle R, Wahlberg N. 2007. How many genes should a systematist sample? Conflicting insights from a phylogenomic matrix characterized by replicated incongruence. *Systematic Biology* 56:355–363.
- Govindarajan AF, Boero F, Halanych KM. 2006. Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:820–834.
- Govindarajan AF, Halanych KM, Cunningham CW. 2004. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology* 146:213–222.
- Govindarajan AF, Piraino S, Gravili C, Kubota S. 2005. Species identification of bivalve-inhabiting marine hydrozoans of the genus

- Eugymnanthea*. Invertebrate Biology 124:1–10.
- Grant PR. 2014. Adaptive radiation. In: Losos JB (editor in chief). The Princeton Guide to Evolution. Princeton: Princeton University Press. Pp. 559–566.
- Gravier N. 1970. Libération de médusoides par *Macrorhynchia philippina* Kirchenpauer, 1872 (Hydroida, Plumulariidae). Recueil des travaux de la Station Marine d'Endoume, Marseille (Fascicule hors Série) (Supplement 10) 10:253–257.
- Gravier-Bonnet N, Migotto AE. 2000. Gonangium development and medusoid of *Nemalecium lighti* (Hargitt, 1924) (Cnidaria: Hydrozoa, Haleciidae). Scientia Marina 64:207–213.
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology 59:307–321.
- Haeckel E. 1879. Das System der Medusen. Erster Theil einer Monographie der Medusen. Erste Hälfte des ersten Theils: System der Craspedoten. Denkschriften der Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Gesellschaft zu Jena 1:1–360.
- Hey J, Pinho C. 2011. Population genetics and objectivity in species diagnosis. Evolution 66:1413–1429.
- Hincks T. 1866a. On new British Hydroida. Annals and Magazine of Natural History (Series 3) 18:296–299.
- Hincks T. 1866b. On *Ophiodes*, a new genus of Hydroida. Annals and Magazine of Natural History (Series 3) 18:421–423.
- Hincks T. 1868. A history of the British hydroid zoophytes. London: Van Voorst J. Vol. 1, pp. 1–338, frontis, text-figs 1-45; Vol. 2, pls 1-67.
- Hincks T. 1874. Notes on Norwegian Hydroida from deep water. Annals and Magazine of Natural History (Series 4) 13:125–137.
- Jeffroy O, Brinkmann H, Delsuc F, Philippe H. 2006. Phylogenomics: the beginning of incongruence? Trends in Genetics 22:225–231.
- Johnston G. 1838. A history of the British zoophytes. Edinburgh: Lizars WH. Pp. 341.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research 30:3059–3066.
- Katoh K, Toh H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. BMC Bioinformatics 9:212.
- Kolaczowski B, Thornton JW. 2009. Long-branch attraction bias and inconsistency in Bayesian phylogenetics. PLoS One 4:e7891.
- Kosevich IA. 2012. Morphogenetic foundations for increased evolutionary complexity in the organization of thecate hydroids shoots (Cnidaria, Hydroidomedusa, Leptomedusae). Biology Bulletin 39:172–185.
- Kramp PL. 1959. Some new and little known Indo-Pacific medusae. Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening Kjøbenhavn 121:223–259.
- Kubota S. 2000. Parallel, paedomorphic evolutionary processes of the bivalve-inhabiting hydrozoans (Leptomedusae, Eirenidae) deduced from the morphology, life cycle and biogeography, with special reference to taxonomic treatment of *Eugymnanthea*. Scientia Marina 64:241–247.
- Kubota S. 2008. Constant timing of medusa release in bivalve-inhabiting hydrozoans of the genus *Eugymnanthea* (Hydrozoa: Leptomedusae: Eirenidae). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 88:1607–1609.
- Kück P, Meusemann K, Dambach J, Thormann B, von Reumont BM, Wägele JW, Misof B. 2010. Parametric and non-parametric masking of randomness in sequence alignments can be improved and leads to better resolved trees. Frontiers in zoology 7:10.
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, Couloux A, Manuel M. 2009. Molecular Phylogenetics of Thecata (Hydrozoa, Cnidaria) Reveals Long-Term Maintenance of Life History Traits despite High Frequency of Recent Character Changes. Systematic Biology 58:509–526.
- Leclère L, Schuchert P, Manuel M. 2007. Phylogeny of the Plumularioidea (Hydrozoa, Leptothecata): evolution of colonial organisation and life cycle. Zoologica Scripta 36:371–394.
- Lindner A, Govindarajan AF, Migotto AE. 2011. Cryptic species, life cycles, and the phylogeny of *Clytia* (Cnidaria:

- Hydrozoa: Campanulariidae). *Zootaxa* 2980:23–36.
- Marfenin N. 1997. Adaptation capabilities of marine modular organisms. *Hydrobiologia* 355:153–158.
- Marques AC. 2001. Simplifying hydrozoan classification: inappropriateness of the group Hydroidomedusae in a phylogenetic context. *Contributions to Zoology* 70:175–179.
- Marques AC, Collins AG. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123:23–42.
- Marques AC, Migotto AE, Peña Cantero AL. 2006a. An overview of the phylogeny of the families Lafoeidae and Hebellidae (Hydrozoa: Leptothecata): their composition and classification. *Invertebrate Systematics* 20:43–58.
- Marques AC, Peña Cantero AL, Migotto AE. 2005a. Redescription and systematic status of the Antarctic genus *Abietinella* Levinsen, 1913 (Lafoeidae, Hydrozoa, Cnidaria). *Journal of Natural History* 39:1443–1455.
- Marques AC, Peña Cantero AL, Migotto AE. 2005b. Revision of the genus *Cryptolarella* Stechow, 1913 (Lafoeidae, Leptothecata, Hydrozoa). *Journal of Natural History* 39:709–722.
- Marques AC, Peña Cantero AL, Migotto AE. 2006b. Revision of *Halisiphonia* Allman, 1888 (Cnidaria, Hydrozoa, Hebellidae), with comments on its taxonomic position. *Journal of Natural History* 40:1047–1062.
- Marques AC, Peña Cantero AL, Miranda TP, Migotto AE. 2011. Revision of the genus *Filellum* Hincks, 1868 (Lafoeidae, Leptothecata, Hydrozoa). *Zootaxa* 3129:1–28.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55:715–728.
- Mendoza-Becerril M.A., Marques AC. 2013. Synopsis on the knowledge and distribution of the family Bougainvilliidae (Hydrozoa, Hydroidolina). *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:908–924.
- Migotto AE. 1998. The life cycle of *Sertularia marginata* Kirchenpauer, 1864 (Cnidaria: Hydrozoa): a medusoid-producing sertulariid. *Journal of Natural History* 32:1–12.
- Migotto AE, Marques AC. 1999. Redescription of *Dentitheca bidentata* (Cnidaria: Hydrozoa, Plumulariidae), with notes on its life cycle. *Journal of Natural History* 33:949–960.
- Migotto AE, De Andrade LP. 2000. The life cycle of *Hebella furax* (Cnidaria: Hydrozoa): a link between a lafoeid hydroid and a laodiceid medusa. *Journal of Natural History* 34:1871–1888.
- Migotto AE, Cabral AS. 2005. *Lafoeina amirantensis* (Cnidaria: Hydrozoa, Campanulinoidea), the hydroid stage of the medusa *Cirrholovenia tetranema* (Cnidaria: Hydrozoa, Lovenelloidea). *Zootaxa* 919:1–16.
- Millard NAH. 1962. The Hydrozoa of the south and west coasts of South Africa Part I. The Plumulariidae. *Annals of the South African Museum* 46:261–319.
- Millard NAH. 1975. Monograph on the Hydroida of southern Africa. *Annals of the South African Museum* 68:1–513.
- Miranda TP, Cunha AF, Marques AC. 2013a. Taxonomic position of *Lovenella gracilis* Clarke, 1882 (Lovenellidae, Hydrozoa): new evidences of microanatomy justify its maintenance in the genus *Lovenella* Hincks, 1868. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:286–295.
- Miranda TP, Peña Cantero AL, Marques AC. 2013b. Areas of endemism in the Southern Ocean: a reanalysis using benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa). *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:1003–1009.
- Misof B, Misof K. 2009. A Monte Carlo approach successfully identifies randomness in multiple sequence alignments: a more objective means of data exclusion. *Systematic Biology* 58:21–34.
- Morrison DA. 2008. A framework for phylogenetic sequence alignment. *Plant Systematics and Evolution* 282:127–149.
- Morton JE. 1957. Mosaic Evolution in Hydroids. *Nature* 180:130–131.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2011a. Polyphyly and cryptic diversity in the hydrozoan families Lafoeidae and Hebellidae (Cnidaria:Hydrozoa). *Invertebrate Systematics* 25:454–470.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2011b. The use of the DNA barcode gene 16S mRNA for the clarification of taxonomic problems within the family Sertulariidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zoologica Scripta* 40:520–537.

- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD. 2012a. A molecular phylogenetic appraisal of the systematics of the Aglaopheniidae (Cnidaria: Hydrozoa, Leptothecata) from the north-east Atlantic and west Mediterranean. *Zoological Journal of the Linnean Society* 164:717–727.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Yesson C, Rogers AD. 2012b. Evolution of *Nemertesia* hydroids (Cnidaria: Hydrozoa, Plumulariidae) from the shallow and deep waters of the NE Atlantic and western Mediterranean. *Zoologica Scripta* 41:79–96.
- Moura CJ, Cunha MR, Schuchert P. 2007. *Tubiclavoides striatum* gen. nov. et sp. nov. (Cnidaria: Hydrozoa) a new bathyal hydroid from the Gulf of Cadiz, north-east Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:421–428.
- Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD. 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta* 37:93–108.
- Nabhan AR, Sarkar IN. 2011. The impact of taxon sampling on phylogenetic inference: a review of two decades of controversy. *Briefings in Bioinformatics* 13:122–134.
- Nagy LG, Házi J, Szappanos B, Kocsubé S, Bálint B, Rákhely G, Vágvölgyi C, Papp T. 2012. The evolution of defense mechanisms correlate with the explosive diversification of autodigesting coprinellus mushrooms (Agaricales, Fungi). *Systematic Biology* 61:595–607.
- Naumov DV. 1960. Gidroidi i gidromedusy morskikh, solonovatovodnykh i presnovodnykh basseinov S.S.S.R. *Fauna S.S.S.R.* 70:1–626.
- Naumov DV. 1969. Hydroids and hydromedusae of the U.S.S.R. *Fauna S.S.S.R.* 70:1–660. Translated from Russian by the Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Niemiller ML, Near TJ, Fitzpatrick BM. 2011. Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys Subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution* 66:846–866.
- Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, et al. 2002. DNA Isolation Procedures. In: Desalle R, Giribet G, Wheeler W (editors). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Basel: Birkhäuser Verlag. Pp. 249–287.
- Nutting CC. 1904. American hydroids. Part II. The Sertulariidae. Smithsonian Institution, United States National Museum, Special Bulletin 4(2):1–325.
- O’Grady PM, Remsen JV, Gatesy J. 2002. Partitioning of multiple data sets in Phylogenetic Analysis. In: Desalle R, Giribet G, Wheeler W (editors). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Basel: Birkhäuser Verlag. Pp. 102–120.
- Olson ME, Arroyo-Santos A. 2009. Thinking in continua: beyond the “adaptive radiation” metaphor. *BioEssays* 31:1337–1346.
- Osborn H. 1902. The law of adaptive radiation. *American Naturalist* 36:353–363.
- Pagès F, Gili JM, Bouillon J. 1992. Medusae (Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa) of the Benguela Current (southeastern Atlantic). *Scientia Marina* 56:1–144.
- Panteleeva NN. 2002. Life-Cycle Adaptation of Hydroids of the Family Corynidae and the Subfamily Obeliinae to Habitat Conditions. *Doklady Biological Sciences* 386:457–459.
- Pepato AR, da Rocha CEF, Dunlop JA. 2010. Phylogenetic position of the acariform mites: sensitivity to homology assessment under total evidence. *BMC Evolutionary Biology* 10:235.
- Petersen KW. 1990. Evolution and taxonomy in capitate hydroids and medusae (Cnidaria: Hydrozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society* 100:101–231.
- Peña Cantero AL. 2010b. On a new Antarctic species of *Symplectoscyphus* Marktanner-Turneretscher 1890 (Cnidaria, Hydrozoa, Sertulariidae), with an annotated checklist of the Antarctic species of the genus. *Zootaxa* 2494:29–44.
- Peña Cantero AL. 2014. Revision of the Antarctic species of *Halecium* Oken, 1815 (Cnidaria, Hydrozoa, Haleciidae). *Zootaxa* 3790:243–280.
- Peña Cantero AL, García Carrascosa AM. 1993. The coppinia of *Abietinella operculata* (Lafoeidae: Hydrozoa Leptomedusae) and its systematic position. *Journal of Natural History* 27:1003–1011.
- Peña Cantero AL, García Carrascosa AM, Vervoort W. 1997a. On *Antarctoscyphus* (Cnidaria,



- Hydrozoa), a new genus of antarctic hydroids and the description of two new species. *Polar Biology* 18:23–32.
- Peña Cantero AL, García Carrascosa AM, Vervoort W. 1999. Two new species of *Staurotheca* Allman, 1888 (Cnidaria, Hydrozoa, Sertulariidae) from the Scotia Sea (Antarctica). *Polar Biology* 21:155–165.
- Peña Cantero AL, Migotto AE, Marques AC. 2007. Revision of the genus *Acryptolaria* Norman, 1875 (Cnidaria, Hydrozoa, Lafoeidae). *Journal of Natural History* 41:229–291.
- Peña Cantero AL, Sentandreu V, Latorre A. 2010a. Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biology* 33:41–57.
- Peña Cantero AL, Svoboda A, Vervoort W. 1997b. Species of *Staurotheca* Allman, 1888 (Cnidaria: Hydrozoa) from recent antarctic expeditions with R.V. Polarstern, with the description of six new species. *Journal of Natural History* 31:329–381.
- Peña Cantero AL, Vervoort W. 2003. *Sertularia echinocarpa* Allman, 1888, an unexpected new species of *Staurotheca* Allman, 1888 (Cnidaria: Hydrozoa: Sertulariidae). *Zoologische Mededelingen* 77:537–543.
- Philippe H, Roure B. 2011. Difficult phylogenetic questions: more data, maybe; better methods, certainly. *BMC Biology* 9:91.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution* 25:1253–1256.
- de Queiroz A, Gatesy J. 2007. The supermatrix approach to systematics. *Trends in Ecology & Evolution* 22:34–41.
- Ralph PM. 1957. New Zealand thecate hydroids. Part I. Campanulariidae and Campanulinidae. *Transactions of the Royal Society of New Zealand* 84:811–854.
- Rees WJ. 1957. Evolutionary trends in the classification of capitate hydroids and medusae. *Bulletin of The British Museum (Natural History) (Zoology Series)* 4:455–534.
- Rees WJ, Vervoort W. 1987. Hydroids from the John Murray Expedition to the Indian Ocean, with revisory notes on *Hydrodendron*, *Abietinella*, *Cryptolaria* and *Zygophylax* (Coelenterata: Hydrozoa). *Zoologische Mededelingen, Leiden*:1–209.
- Rokas A. 2011. Phylogenetic analysis of protein sequence data using the Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAXML) program. In: Ausubel FM (editor). *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 19: Unit 19.11.
- Rundell RJ, Price TD. 2009. Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Genetics* 24:394–399.
- Russell FS. 1953. The medusae of the British Isles. Anthomedusae, Leptomedusae, Limnomedusae, Trachymedusae and Narcomedusae. Cambridge: Cambridge University Press. Pp. 530.
- Ryaland JS, Warner GF. 1986. Growth and form in modular animals: ideas on the size and arrangement of zooids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 313:53–76.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Press. Pp. 2100.
- Schuchert P. 1997. Review of the family Halopterididae (Hydrozoa, Cnidaria). *Zoologische Verhandelingen* 309:1–162.
- Schuchert P. 2001. Hydroids of Greenland and Iceland (Cnidaria, Hydrozoa). *Bioscience* 53:1–184.
- Schuchert P. 2005. Taxonomic revision and systematic notes on some *Halecium* species (Cnidaria, Hydrozoa). *Journal of Natural History* 39:607–639.
- Schuchert P. 2014. High genetic diversity in the hydroid *Plumularia setacea*: A multitude of cryptic species or extensive population subdivision? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76:1–9.
- Schuchert P. 2014. World Hydrozoa database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hydrozoa> on 2014-05-18.
- Shimabukuro V, Marques AC. 2006. Morphometrical analysis, histology and taxonomy of *Thyroscyphus ramosus* (Cnidaria, Hydrozoa) from the coast of Brazil. *Zootaxa* 1184:29–42.
- Stamatakis A. 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690.
- Stechow E. 1919. *Neue Ergebnisse auf dem Gebiete der Hydroidenforschung*. Muenchener medizinische Wochenschrift 66:852–853.

- Stechow E. 1923. Zur Kenntnis der Hydroidenfauna des Mittelmeeres, Amerikas und anderer Gebiete. II Teil. Zoologische Jahrbücher (Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere) 47:29–270.
- Svoboda A, Cornelius PFS. 1991. The European and Mediterranean species of *Aglaophenia* (Cnidaria Hydrozoa). Zoologische Verhandlungen 274:1–72.
- Thiel M, Gutow L. 2005. The ecology of rafting in the marine environment. II. The rafting organisms and community. Oceanography and Marine Biology An Annual Review 43:279–418.
- Totton AK. 1930. Hydroida. British Antarctic ("Terra Nova") Expedition, 1910. Natural History Reports (Zoology Series) 5:131–252.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 26:1–10.
- Vervoort W. 1972. Hydroids from the Theta, Vema and Yelcho cruises of the Lamont-Doherty Geological Observatory. Zoologische Verhandlungen 120:1–247.
- Vervoort W. 1987. Evaluation of taxonomic characters in the Hydroida, particularly in the Thecata (= Leptomedusae). In: Bouillon J, Boero F, Cicogna F, Cornelius PFS (editors). Modern Trends in the Systematics, Ecology and Evolution of Hydroids and Hydromedusae. New York: Oxford University Press. Pp. 83–103.
- Vervoort W, Watson JE. 2003. The Marine Fauna of New Zealand: Leptothecata (Cnidaria: Hydrozoa) (Thecate Hydroids). NIWA Biodiversity Memoir, New Zealand 119:1–538.
- Vito D, Piraino S, Schmich J, Bouillon J, Boero F. 2006. Evidence of reverse development in Leptomedusae (Cnidaria, Hydrozoa): the case of *Laodicea undulata* (Forbes and Goodsir 1851). Marine Biology 149:339–346.
- Zheng L, He J, Lin J, Cao W, Zhang W. 2014. 16S rRNA is a better choice than COI for DNA barcoding hydrozoans in the coastal waters of China. Acta Oceanologica Sinica 33:55–76

Tabela Suplementar 1 - Informação de primers utilizados na geração de sequências nucleotídicas (marcadores moleculares) pela técnica de PCR, considerando genoma de origem (nuclear: genes 18S e 28S, mitocondrial: 16S). Destacam-se os primers desenvolvidos pelos membros do Laboratório de Evolução Marinha (LEM lab, informações em negrito); primers desenvolvidos pelo Projeto Tree of Life Cnidaria apresentam o código CNIDToL lab. GB= código GenBank das sequências de referência, utilizadas para o mapeamento da posição relativa de aparelhamento dos primers com as regiões de DNA dos genes de interesse, nas reações de PCR.

<i>primers</i> MARCADORES MOLECULARES NUCLEARES					
Gene: 28S Nome <i>primer</i>	Seqüência <i>primer</i> 5´-3´	f/r	tm - p bases	Referência	Mapeamento de <i>primers</i> (GB: GU722663) <i>Hydra circumcincta</i> (Hydrozoa; Medusozoa)
F63 mod	ACCCGCTGAAAYTTAAGCATATHANTMAG	f	55°C - 28pb	Medina et al., 2001	ITS-2 --- 28S start
<b>F15</b>	<b>CTAACAAGGATCCCTAGTAACGGCGAGT</b>	<b>f</b>	<b>62°C - 30pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>15-44</b>
F97	CCYYAGTAACGGCGAGT	f	50°C - 17pb	CNIDToL lab	28-44
F798	CCGTCTTGAAACACGGACC	f	56°C - 19pb	Medina et al., 2001	785-803
R798	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	r	56°C - 19pb	Medina et al., 2001	785-803
28SRD4.8A-F	ACCTATTCTCAAACCTTTAAATGG	f	46°C - 26pb	Schwendinger & Giribet, 2005	1207-1229
F1414	GACAGCAGGACGGTGGYCATGG	f	59°C - 22pb	Medina et al., 2001	1391-1412
R1446	GTTGTTACACACTCCTTAGCGG	r	22pb - 55°C	Medina et al., 2001	1444-1423
F1586	GTGCAGATCTTGGTDGNAGTAGCAAATATTC	f	31pb - 60°C	Medina et al., 2001	1598-1628
F1689	CTAAGMSRYAGGGAAAYTC	f	52°C - 19pb	CNIDToL lab	1701-1719
<b>F2103</b>	<b>GATCCGTAACCTCGGGAAAAGGATTGGCTC</b>	<b>f</b>	<b>62°C - 30pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>2103-2132</b>
F2076sq	TAACYTCGGGAWAAGGATTGGCTC	f	55°C - 24pb	Medina et al., 2001	2109-2132
<b>R2144</b>	<b>GAGCCAATCCTTTTCCCGAAGTT</b>	<b>r</b>	<b>57°C - 23pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>2110-2132</b>
R2084	AGAGCCAATCCTTTTCC	r	45°C - 17pb	CNIDToL lab	2130-2146
R2813	CAGRTGTRCCGCCCCAGCCAAACT	r	66°C - 24pb	Medina et al., 2001	2813-2836
F2813	AGTTTGCTGGGGCGGYACA	f	65°C - 20pb	Medina et al., 2001	2813-2836
F2800	GCAGGTGTCCTAAGGYRAGCTC	f	59°C - 22pb	Voigt et al., 2004	2849-2870
<b>R3214</b>	<b>GTGAATTCTGCTTCACAAATGATAGGAAGAGCC</b>	<b>r</b>	<b>60°C - 32pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>3081-3112</b>
R3264	TTCYGACTTAGAGGCGTTACAG	r	51°C - 21pb	Medina et al., 2001	3260-3281
Gene: 18S Nome <i>primer</i>	Seqüência <i>primer</i> 5´-3´	f/r	tm - p bases	Referência	Mapeamento de <i>primers</i> (GB: Z86108) <i>Obelia</i> sp. (Hydrozoa; Medusozoa)
A	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	f	54°C - 21pb	Medlin et al., 1988	1-21
18Sini	ATCCTGCCAGTAGTCATA	f	45°C - 18pb	Turbeville et al., 1991	11-28

<b>Gene: 18S</b>	<b>Seqüencia <i>primer</i> 5´-3´</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de <i>primers</i> (GB: Z86108)</b>
<b>Nome <i>primer</i></b>					<b><i>Obelia</i> sp. (Hydrozoa; Medusozoa)</b>
554f (GBF)	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	f	62°C - 21pb	Turbeville et al., 1991	568-588
18S-C	CGGTAATTCCAGCTCCAATAG	f	50°C - 21pb	Apakupakul et al., 1999	588-608
18S-L	CCAACTACGAGCTTTTAACTG	r	50°C - 22pb	Apakupakul et al., 1999	627-648
<b>18S inter (Rv)</b>	<b>GCGAAGAAGAACAGACCGATCAG</b>	<b>r</b>	<b>52°C - 23pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>689-711</b>
18S-O	AAGGGCACCACCAGGAGTGGAG	f	60°C - 22pb	Apakupakul et al., 1999	1166-1187
18J-5	GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG	f	63°C - 29pb	Hillis & Dixon, 1991	1187-1215
1282r (GBR)	TCACTCCACCAACTAAGAACGGC	r	56°C - 23pb	Turbeville et al., 1991	1293-1315
18S-Y	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	r	54°C - 21pb	Apakupakul et al., 1999	1303-1323
Rh-18S9R	GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	r	56°C - 23pb	Turbeville et al., 1991	1811-1833
B	TGATCCTTCCGCAGGTTACCT	r	57°C - 22pb	Medlin et al., 1988	1814-1835
<b><i>primers</i> MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS</b>					
<b>Gene: 16S</b>	<b>Seqüencia <i>primer</i> 5´-3´</b>	<b>f/r</b>	<b>tm - p bases</b>	<b>Referência</b>	<b>Mapeamento de <i>primers</i>(GB: DQ787873)</b>
<b>Nome <i>primer</i></b>					<b><i>Aurelia aurita</i> (Scyphomedusae; Medusozoa)</b>
CB1	TCGACTGTTTACCAAAAACATA	f	60°C - 32pb	Cunningham & Buss, 1993	1028-1049
16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	f	49°C - 20pb	Simon et al., 1991	1029-1048
SHB	GACTGTTTACCAAAAACATA	f	44°C - 20pb	Schroth et al 2002	1030-1049
<b>1 Hyd-Scyph</b>	<b>TGACCGTGDTAADGTAGC</b>	<b>f</b>	<b>50°C -18pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1134-1151</b>
<b>2 Scyhom</b>	<b>CTGTTATCCCTACGGTAAC</b>	<b>r</b>	<b>49°C - 19pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1519-1537</b>
<b>2 Hydrom</b>	<b>CTGTTATCCCTAAGGTAGC</b>	<b>r</b>	<b>49°C - 19pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1519-1537</b>
<b>16S-R-BR</b>	<b>CATAATTCAACATCGAGG</b>	<b>r</b>	<b>45°C - 18pb</b>	<b>LEM lab</b>	<b>1581-1598</b>
CB2	ACGGAATGAACTCAAATCATGTAAG	r	52°C - 25pb	Cunningham & Buss, 1993	1652-1676

Tabela Suplementar 2 - Protocolos gerais requeridos para a geração das sequências nucleotídicas do presente trabalho, destacando-se as principais etapas, reagentes e concentrações utilizadas. Apresenta-se também os volumes otimizados para as reações de PCR e BigDye®.

<b>A - Extração DNA</b> Resina quelante Chelex INSTAGENE® (BIO-RAD #732-6030)	<b>Protocolo resumido</b> 1. Incubar a amostra de tecido [ $T_m = 56^\circ\text{C} / T = 30'$ ] + [ $T_m = 99^\circ\text{C} / T = 8'$ ] 2. Controle de qualidade da extração no NANODROP® 3. Conservar a $-4^\circ\text{C}$																			
<b>B - Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> Programa básico do termociclador para a PCR (fragmento esperado de aproximadamente 600pb)	<b>Protocolo</b> 1. Ciclo inicial: $T_m = 94^\circ\text{C} / T = 5'$ 2. Ciclo de repetição (35 ou 40 ciclos): [ $T_m = 94^\circ\text{C} / T = 50''$ ]+[ $T_m = \text{primer} / T = 50''$ ]+[ $T_m = 72^\circ\text{C} / T = 50''$ ] 3. Ciclo final: $T_m = 72^\circ\text{C} / T = 7'$ 4. Controle de qualidade da PCR: leitura no NANODROP® 5. Conservar a $-4^\circ\text{C}$ <table border="1" data-bbox="674 671 1957 967"> <thead> <tr> <th data-bbox="674 671 1854 703">Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR</th> <th data-bbox="1854 671 1957 703">Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="674 703 1854 735">H2O ultra pura</td> <td data-bbox="1854 703 1957 735">14,5ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 735 1854 767">Tampão <i>Taq</i>: 10X</td> <td data-bbox="1854 735 1957 767">2,5ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 767 1854 799">dNTPs (combinados): 100 mM</td> <td data-bbox="1854 767 1957 799">1,33ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 799 1854 831"><math>\text{MgCl}_2</math>: 3,5 mM</td> <td data-bbox="1854 799 1957 831">3,5ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 831 1854 863"><i>Primers</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>; 0,6 mM de cada)</td> <td data-bbox="1854 831 1957 863">1,5ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 863 1854 895"><i>Taq</i> polimerase 0,8 units (5U/ml)</td> <td data-bbox="1854 863 1957 895">0,17ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 895 1854 927">DNA (~30 ng)</td> <td data-bbox="1854 895 1957 927">1,5ul</td> </tr> <tr> <td data-bbox="674 927 1854 967"><b>TOTAL volume reação PCR</b></td> <td data-bbox="1854 927 1957 967"><b>25ul</b></td> </tr> </tbody> </table>		Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR	Volume	H2O ultra pura	14,5ul	Tampão <i>Taq</i> : 10X	2,5ul	dNTPs (combinados): 100 mM	1,33ul	$\text{MgCl}_2$ : 3,5 mM	3,5ul	<i>Primers</i> ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ; 0,6 mM de cada)	1,5ul	<i>Taq</i> polimerase 0,8 units (5U/ml)	0,17ul	DNA (~30 ng)	1,5ul	<b>TOTAL volume reação PCR</b>	<b>25ul</b>
Reagentes e concentrações da mistura de reação da PCR	Volume																			
H2O ultra pura	14,5ul																			
Tampão <i>Taq</i> : 10X	2,5ul																			
dNTPs (combinados): 100 mM	1,33ul																			
$\text{MgCl}_2$ : 3,5 mM	3,5ul																			
<i>Primers</i> ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ; 0,6 mM de cada)	1,5ul																			
<i>Taq</i> polimerase 0,8 units (5U/ml)	0,17ul																			
DNA (~30 ng)	1,5ul																			
<b>TOTAL volume reação PCR</b>	<b>25ul</b>																			
<b>C - Purificação de DNA dupla fita (produto de de PCR)</b> Partículas magnéticas AMPure XP® (Agencourt #A63880)	<b>Protocolo resumido</b> 1. Adicionar 1,8x do volume da PCR de solução AMPure XP; eliminar sobrenadante na cama magnética 2. Realizar duas lavagens etanol 70% 3. Diluição final em 15ul H <sub>2</sub> O ultra pura 4. Controle de resultado de PCR: gel agarose 1,25%, marcação com Gel-Red® 5. Conservar a $-4^\circ\text{C}$																			
<b>D - Reação de BigDye®</b> Programa termociclador para reação ABI BigDye® (Life Technologies #4336935)	<b>Protocolo resumido</b> 1. Ciclo inicial: $T_m = 96^\circ\text{C} / T = 1'$ 2. Ciclo de repetição (40 ciclos): [ $T_m = 96^\circ\text{C} / T = 10''$ ]+[ $T_m = \text{primer} / T = 5''$ ]+[ $T_m = 60^\circ\text{C} / T = 4'$ ] 3. Conservar a $-4^\circ\text{C}$ <table border="1" data-bbox="674 1369 1957 1431"> <thead> <tr> <th data-bbox="674 1369 1854 1401">Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®</th> <th data-bbox="1854 1369 1957 1401">Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="674 1401 1854 1431">Tampão BigDye® Terminator v3.1</td> <td data-bbox="1854 1401 1957 1431">2ul</td> </tr> </tbody> </table>		Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®	Volume	Tampão BigDye® Terminator v3.1	2ul														
Reagentes e concentrações para a reação de BigDye®	Volume																			
Tampão BigDye® Terminator v3.1	2ul																			

	BigDye® Terminator v3.1	1ul
	Primer (F ou R)	0,5ul
	Purificação da PCR (concentração final DNA: 50-70ng por reação; e.g: 50ng/ul)	1ul
	H <sub>2</sub> O ultra pura	5,5ul
	<b>TOTAL volume reação BigDye®</b>	<b>10ul</b>
<b>E - Precipitação do produto da reação de Big Dye®</b>	<b>Protocolo resumido</b>	
	1. Adicionar 80ul do mix de precipitação para cada produto de reação de BigDye®. Ultracentrifugação	
	2. Eliminar sobrenadante; realizar duas lavagens etanol 70%. Secar a 95°C por 3´	
	3. Conservar a -4°C	
<b>F - Análise das sequências obtidas no Sequenciador ABI® 3730 DNA Analyser</b>	<b>Software</b>	
Análise de arquivos .abi, e geração de contigs (formato final: genbank .gb)	Geneious® 5.1.6	

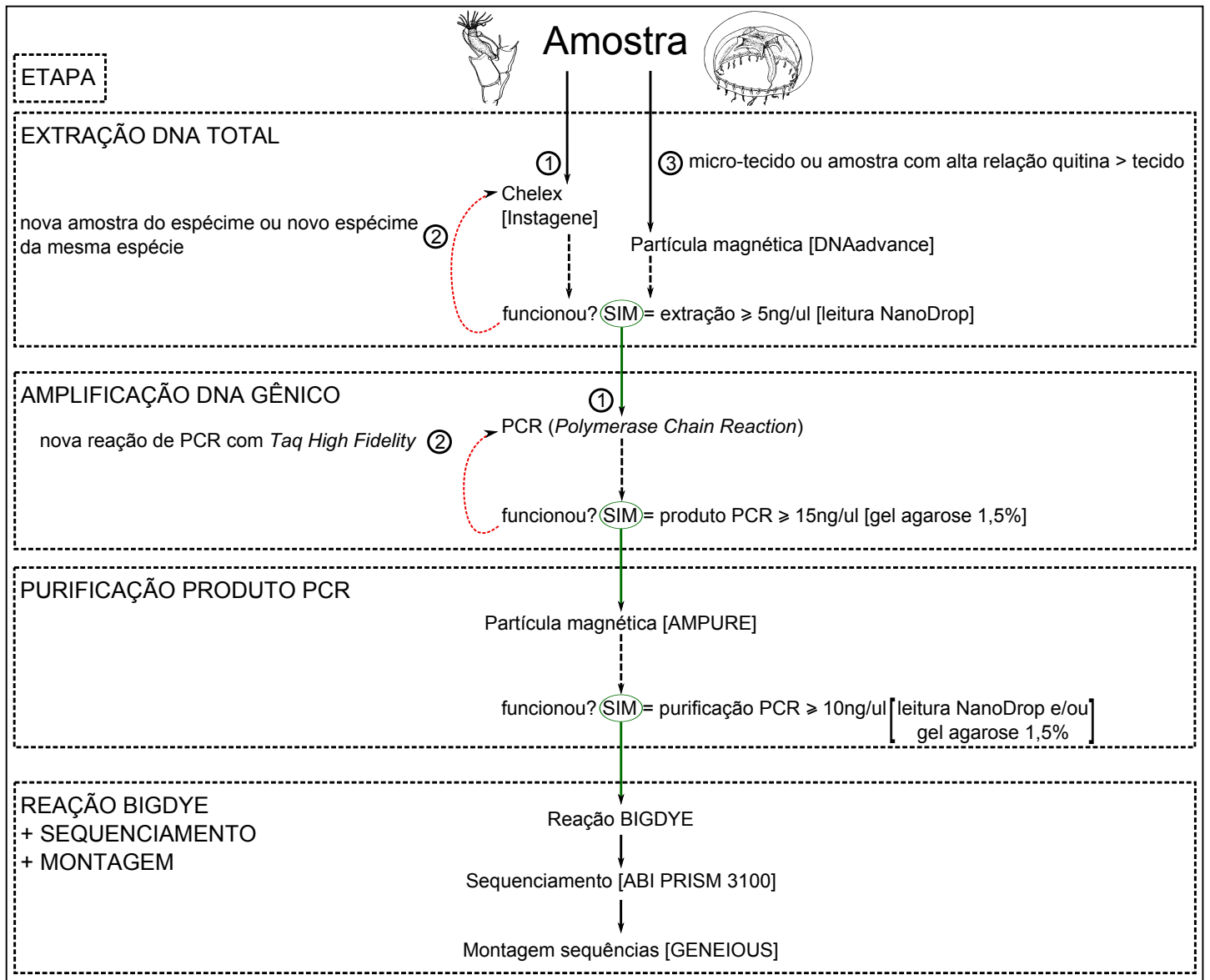


Figura Suplementar 1 - Diagrama de fluxo representando o esquema de trabalho (etapas) para a obtenção da informação genética, destacando aqueles passos em que foi necessário repetir/modificar passos (linhas de pontos vermelhas), e o movimento à etapa seguinte após resultados positivos (linhas sólidas verdes). Para mais detalhes, veja Tabelas Suplementares 1 e 2.

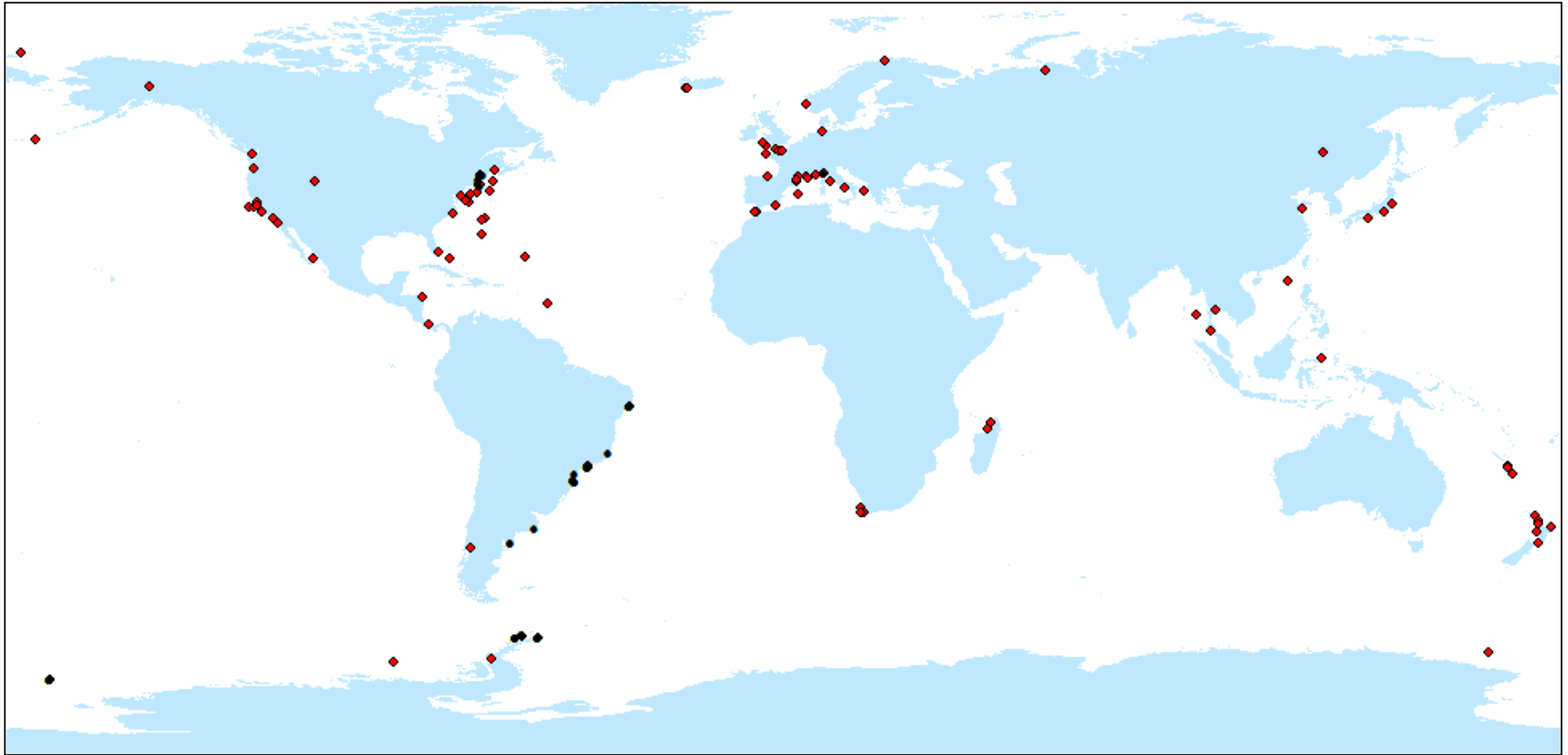
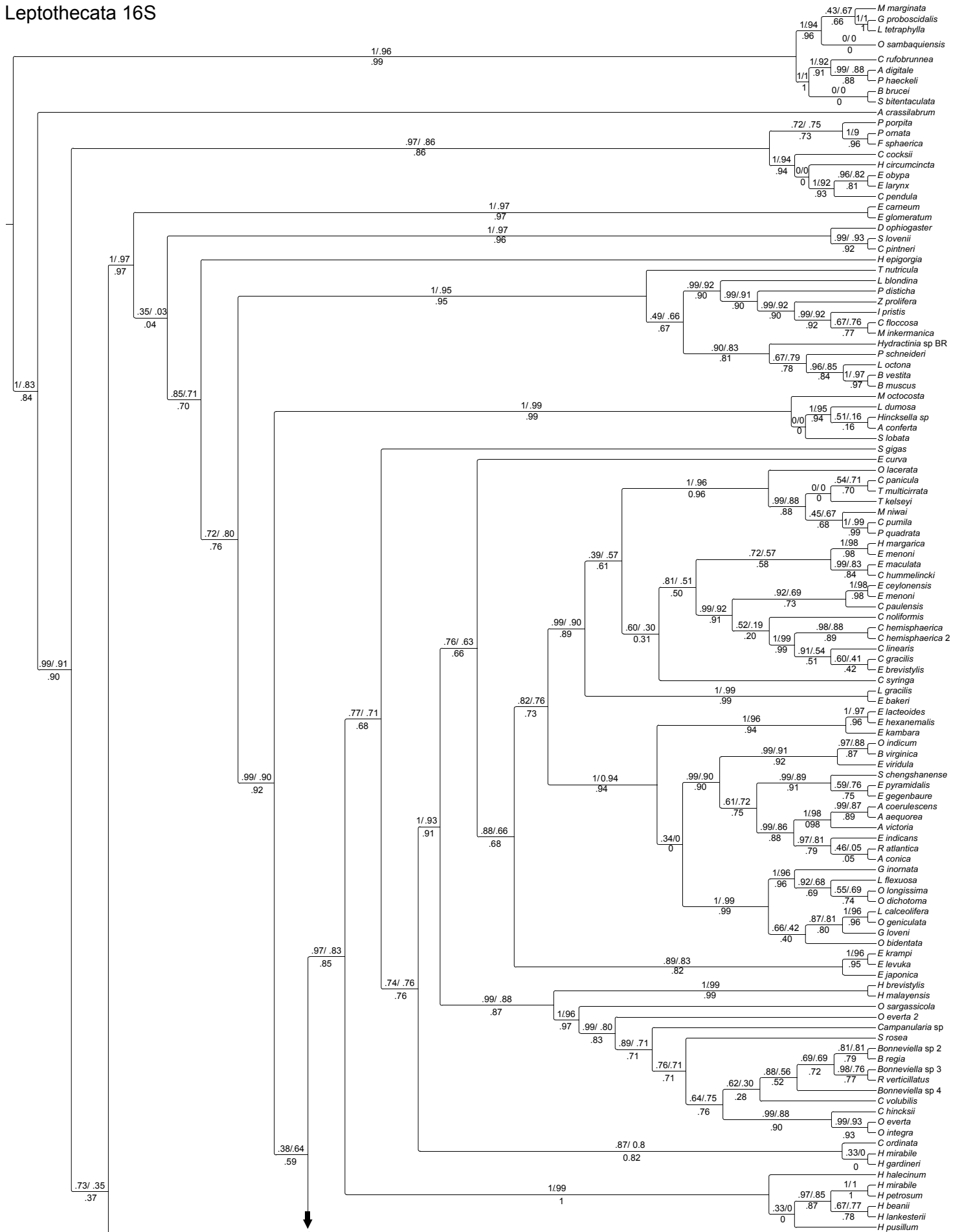


Figura Suplementar 2 - Mapa da distribuição global das amostras analisadas no presente estudo filogenético do grupo Leptothecata. Destacam-se os pontos geográficos de amostras coletadas por diversos projetos prévios com pontos vermelhos (sequências obtidas na base de dados GenBank), e com pontos negros os pontos geográficos das amostras analisadas e incorporadas ao presente estudo (para mais detalhes de espécies e marcadores moleculares gerados no nosso estudo, veja Tabela 1 do presente capítulo).





Continuação [B]  
 Continuação: SIPHONOPHORAE + Plumupheniida [A]

Figura Suplementar 3 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata sem filtragem de dados do marcador 16S (matriz 16S). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 16S [A] [B]

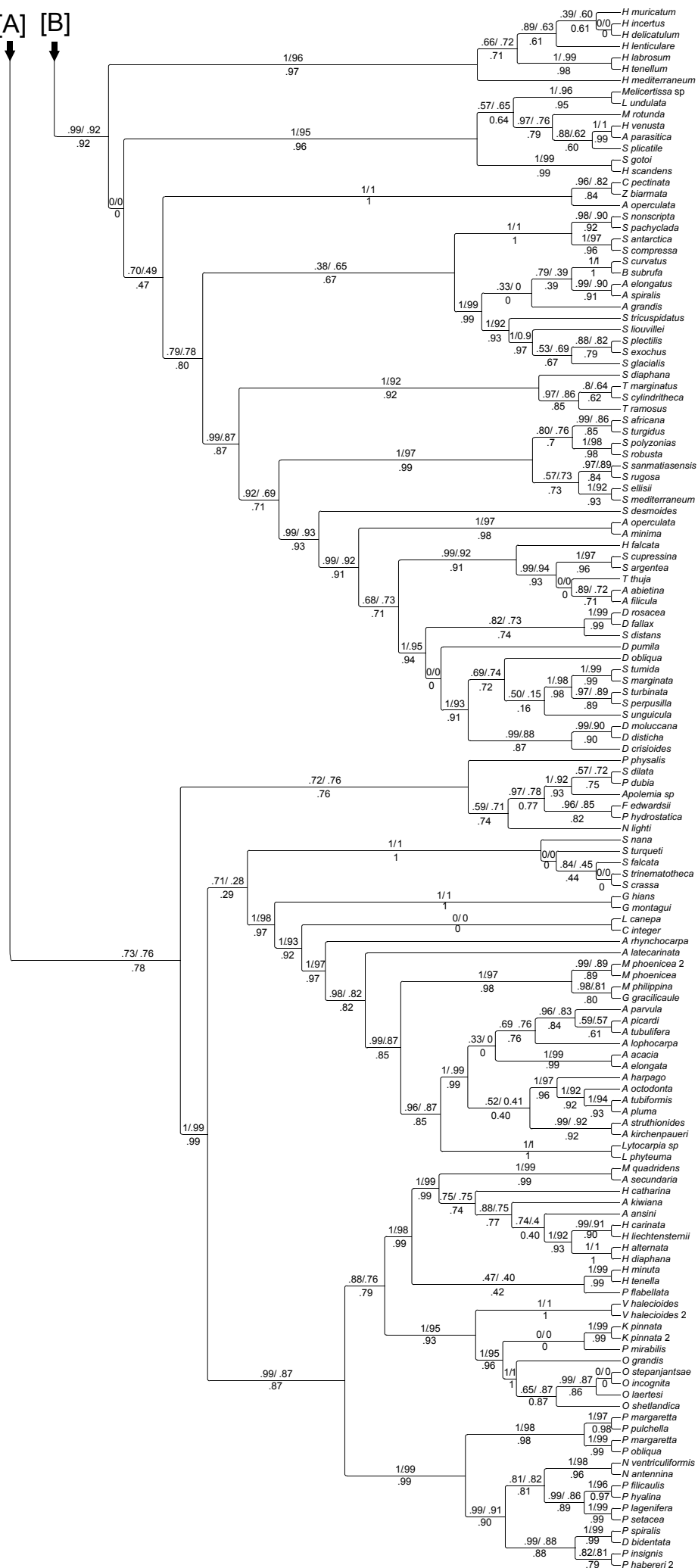


Figura Suplementar 3 - continuação

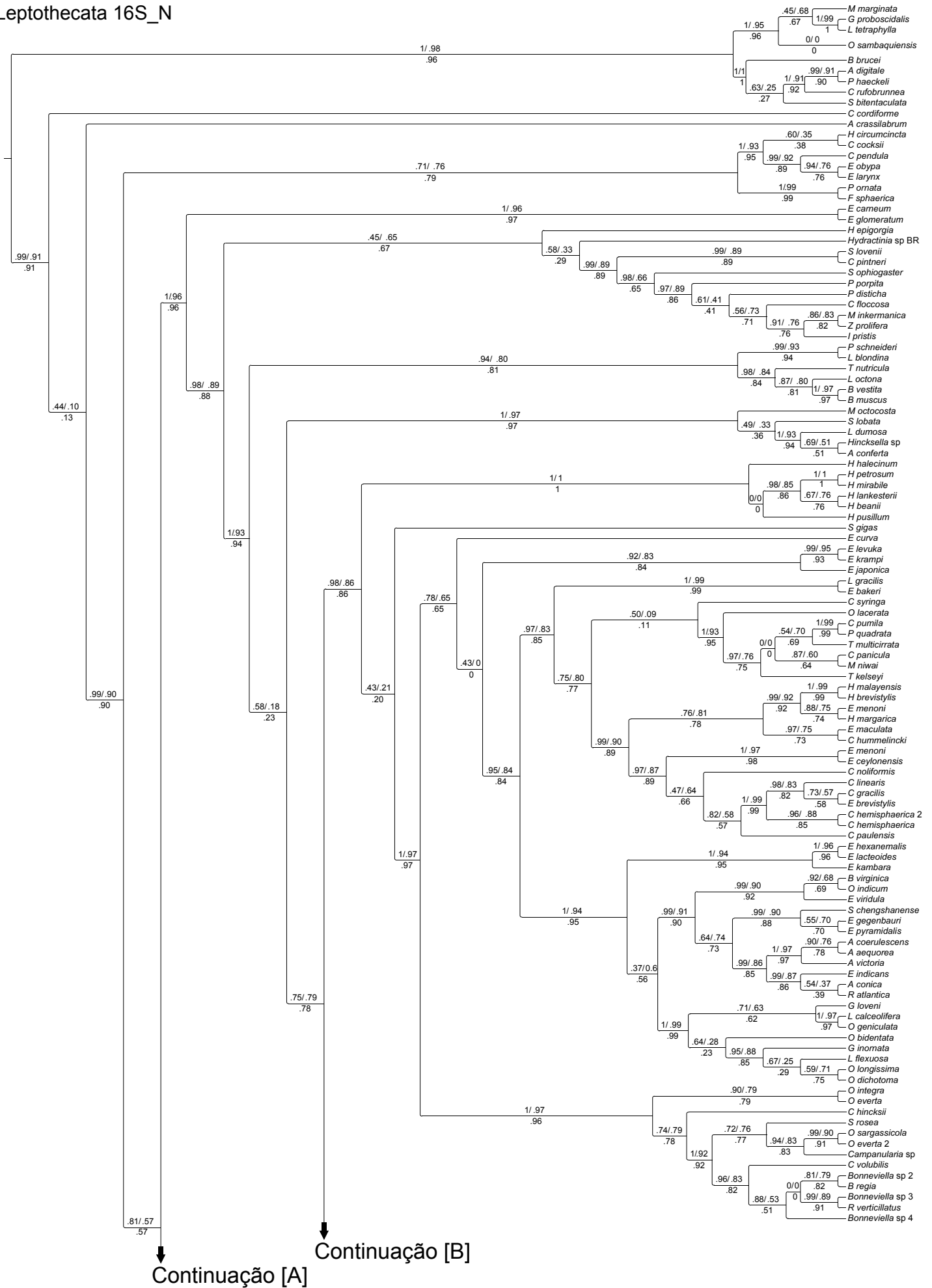


Figura Suplementar 4 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem mínima de dados do marcador 16S (matriz 16S\_N). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são número inteiro 1 ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.



Leptothecata 16S\_Nrw4

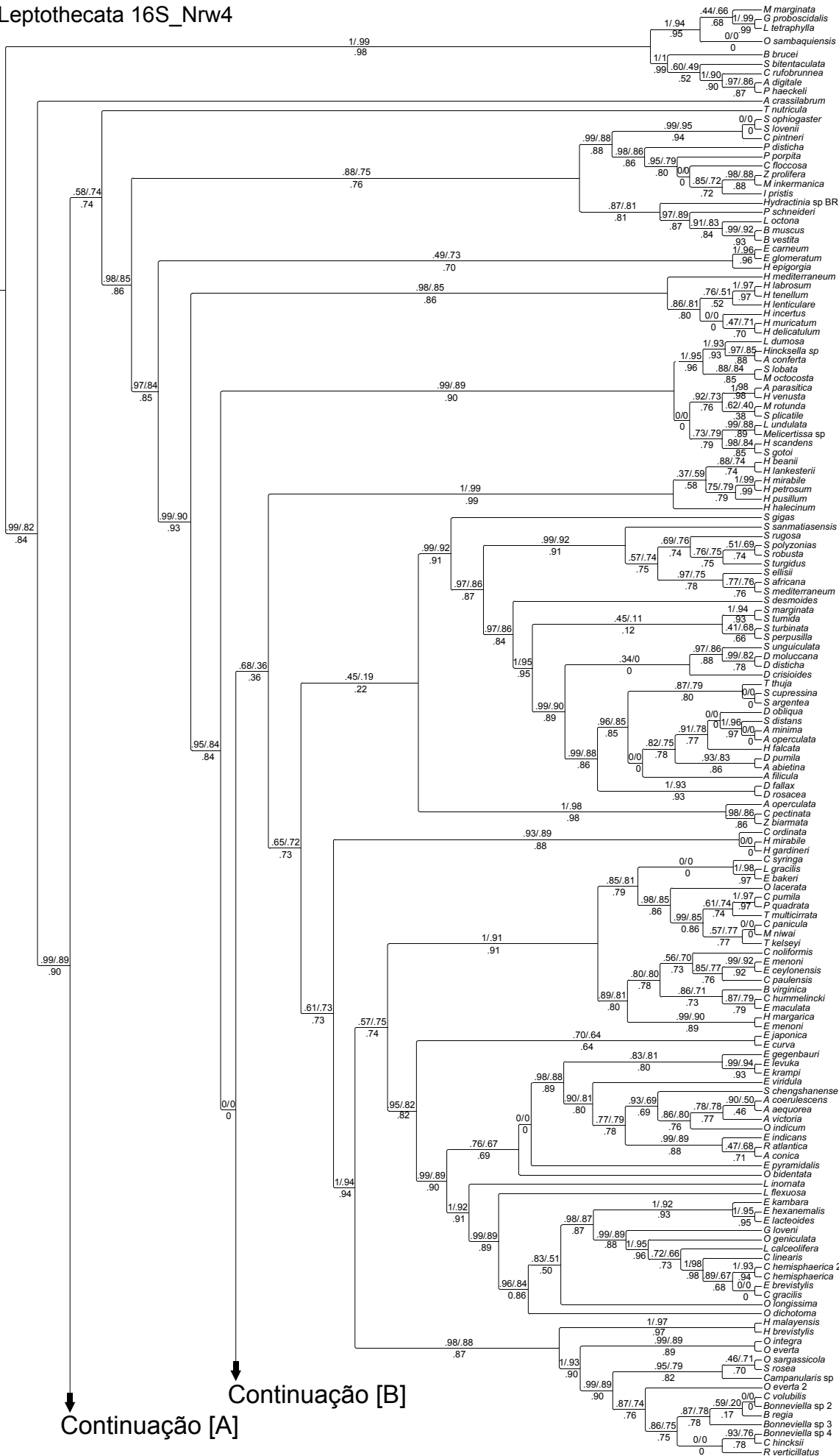


Figura Suplementar 5 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem intensiva de dados do marcador 16S (matriz 16S\_Nrw4). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 16S\_Nrw4

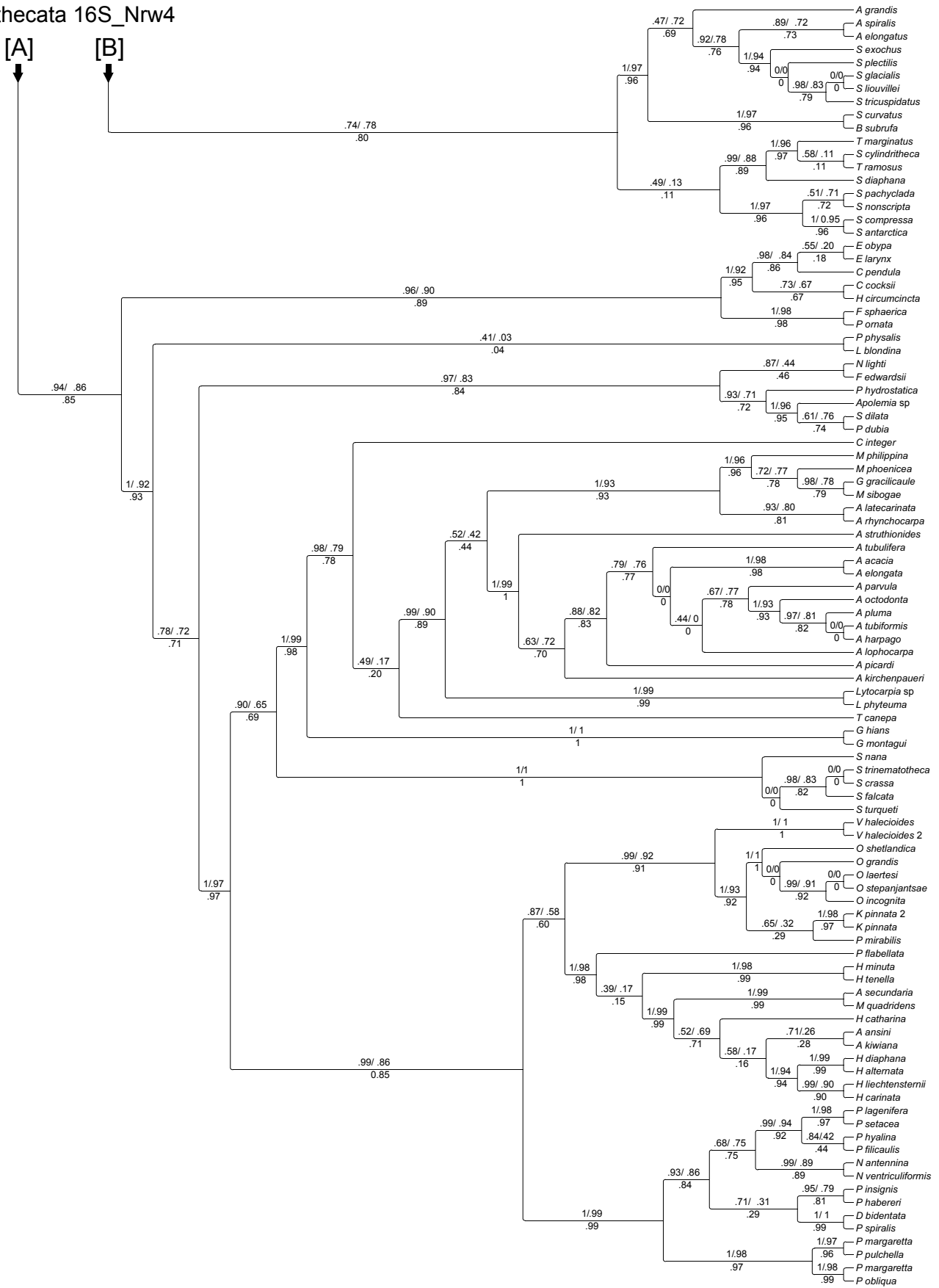
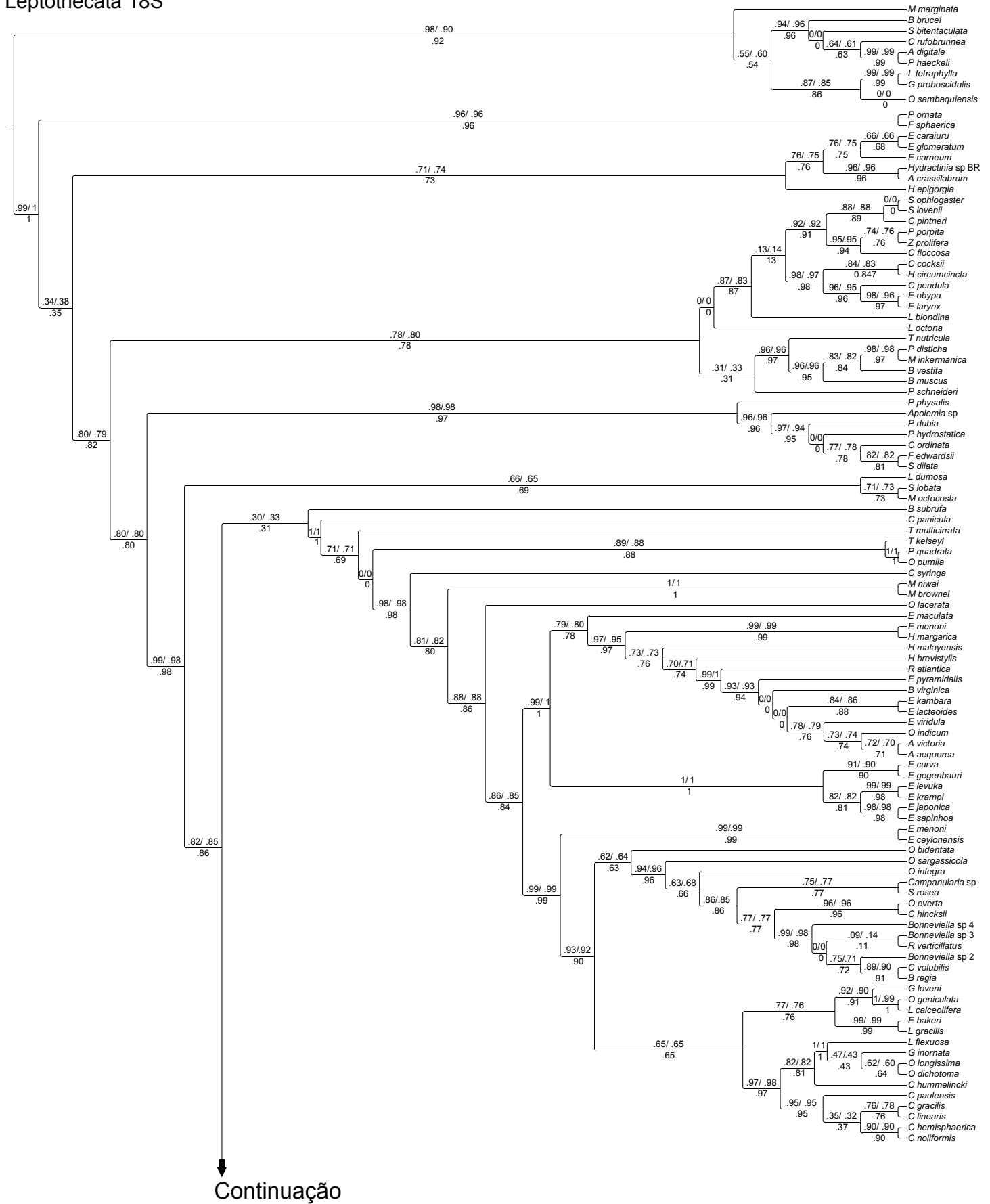


Figura Suplementar 5 - continuação

Leptothecata 18S



Continuação

Figura Suplementar 6 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata sem filtragem de dados do marcador 18S (matriz 18S). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 18S

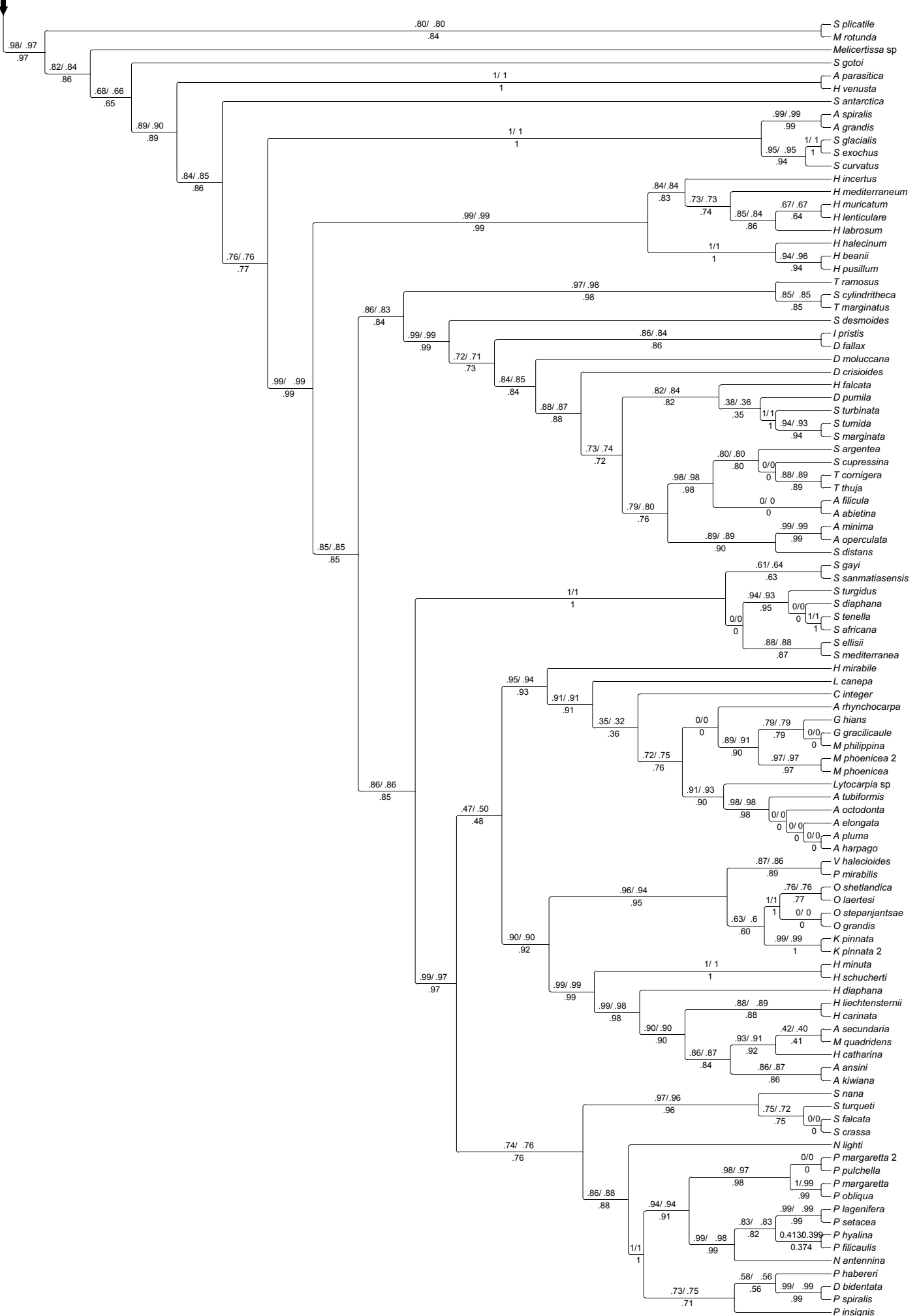


Figura Suplementar 6 - continuação



# Leptothecata 18S\_N

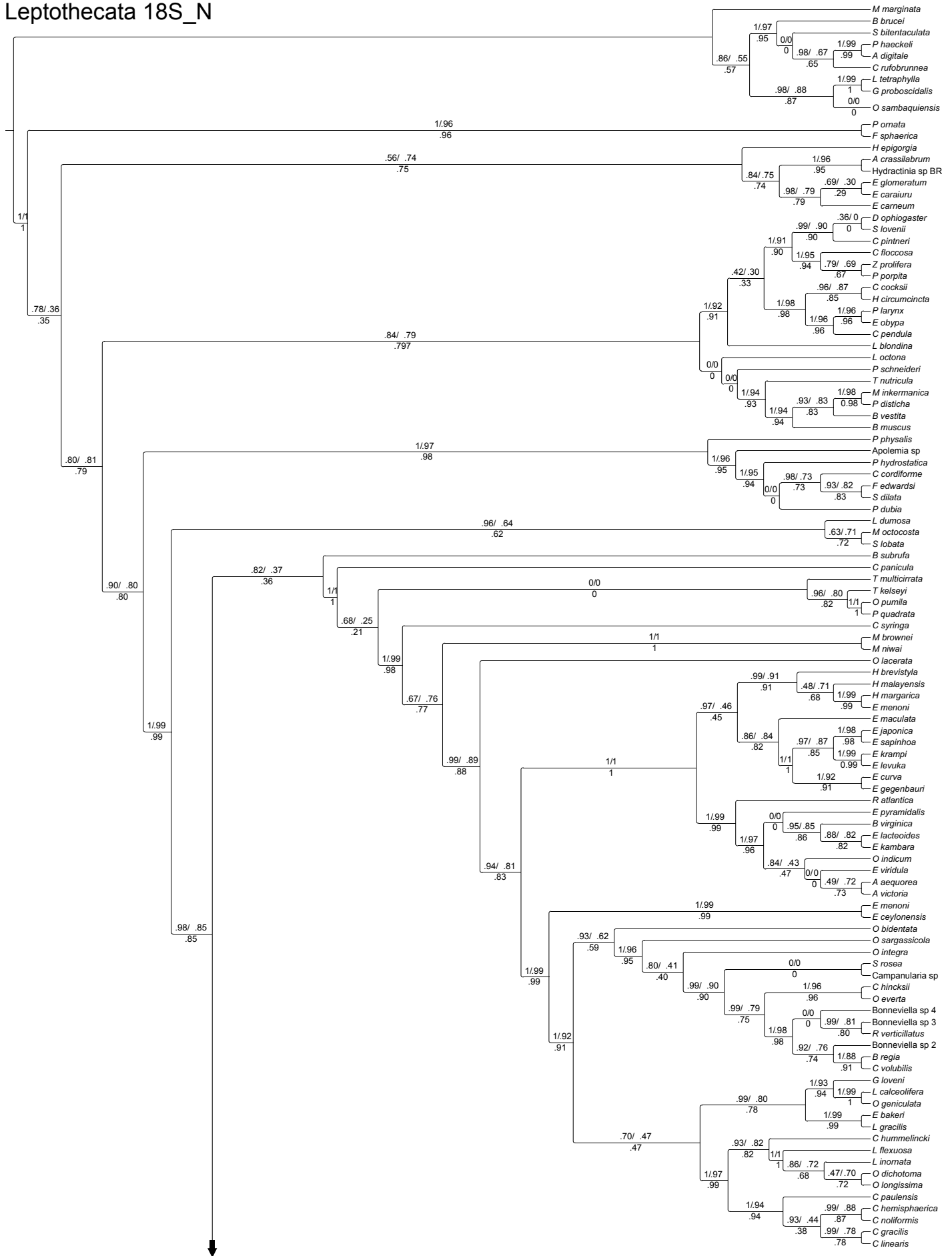


Figura Suplementar 7 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem mínima de dados do marcador 18S (matriz 18S). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 18S\_N

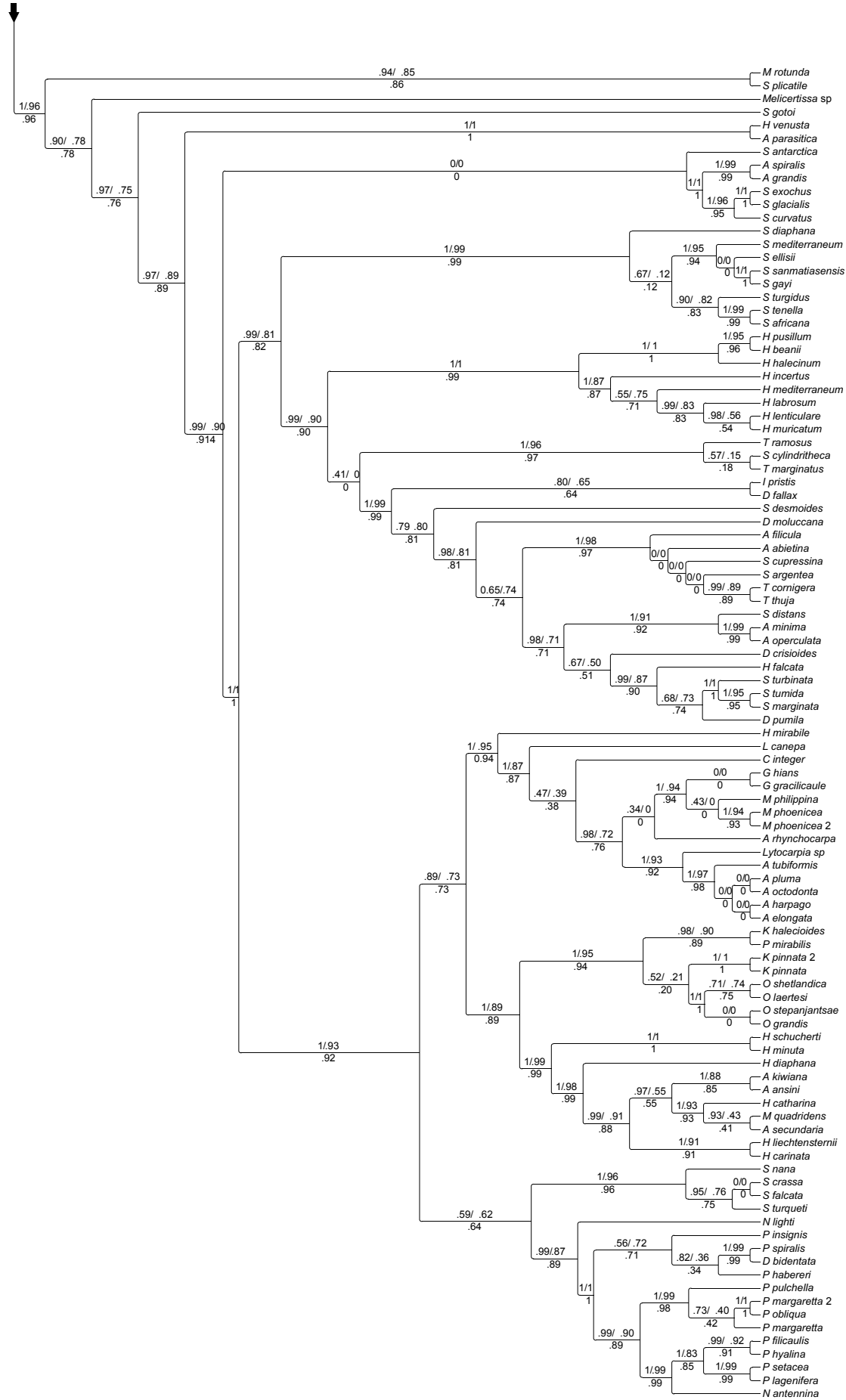


Figura Suplementar 7 - continuação

Leptothecata 18S\_Nrw4

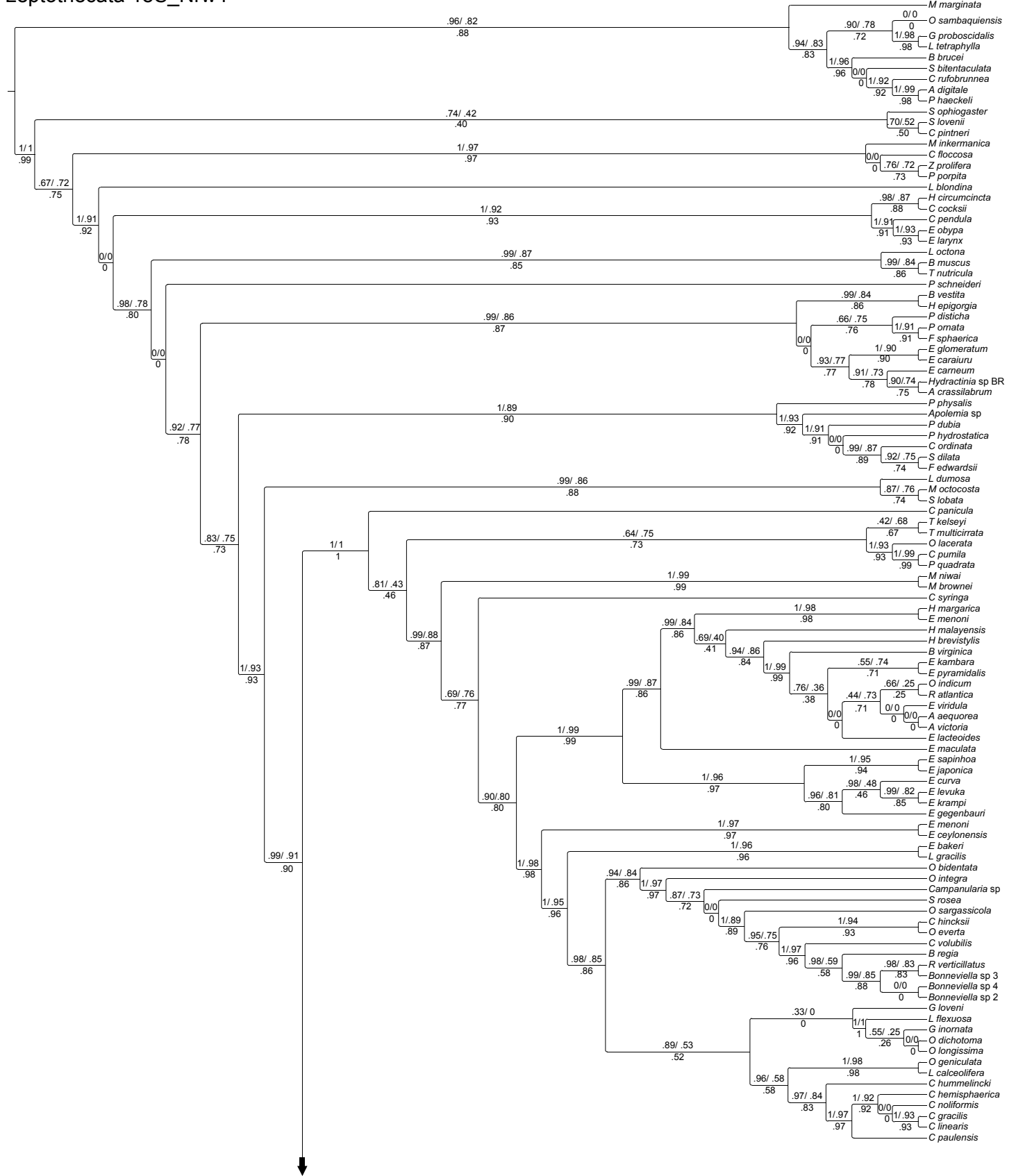


Figura Suplementar 8 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem intensiva de dados do marcador 18S (matriz 18S\_Nrw4). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 18S\_Nrw4

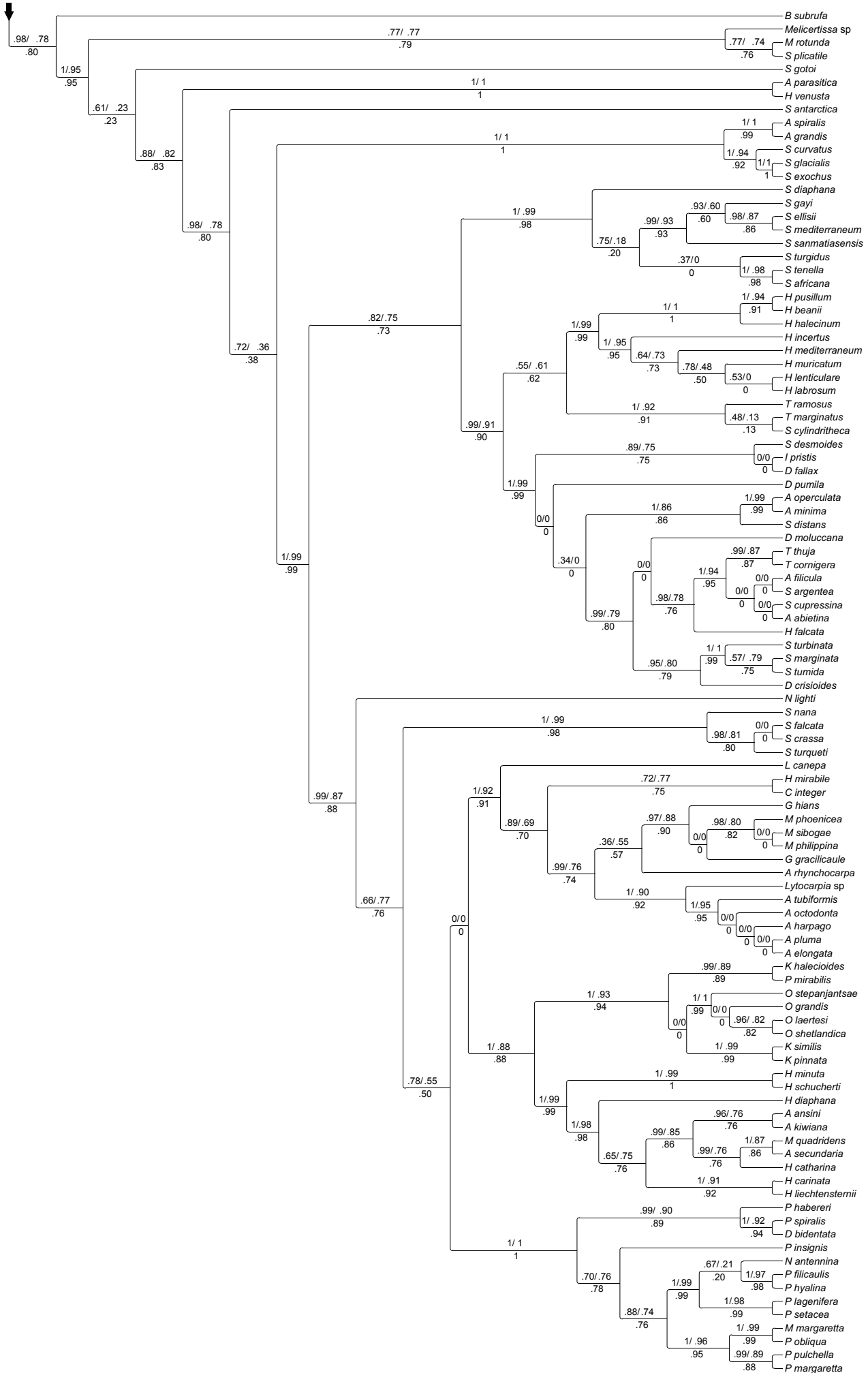


Figura Suplementar 8 - continuação

Leptothecata 28S

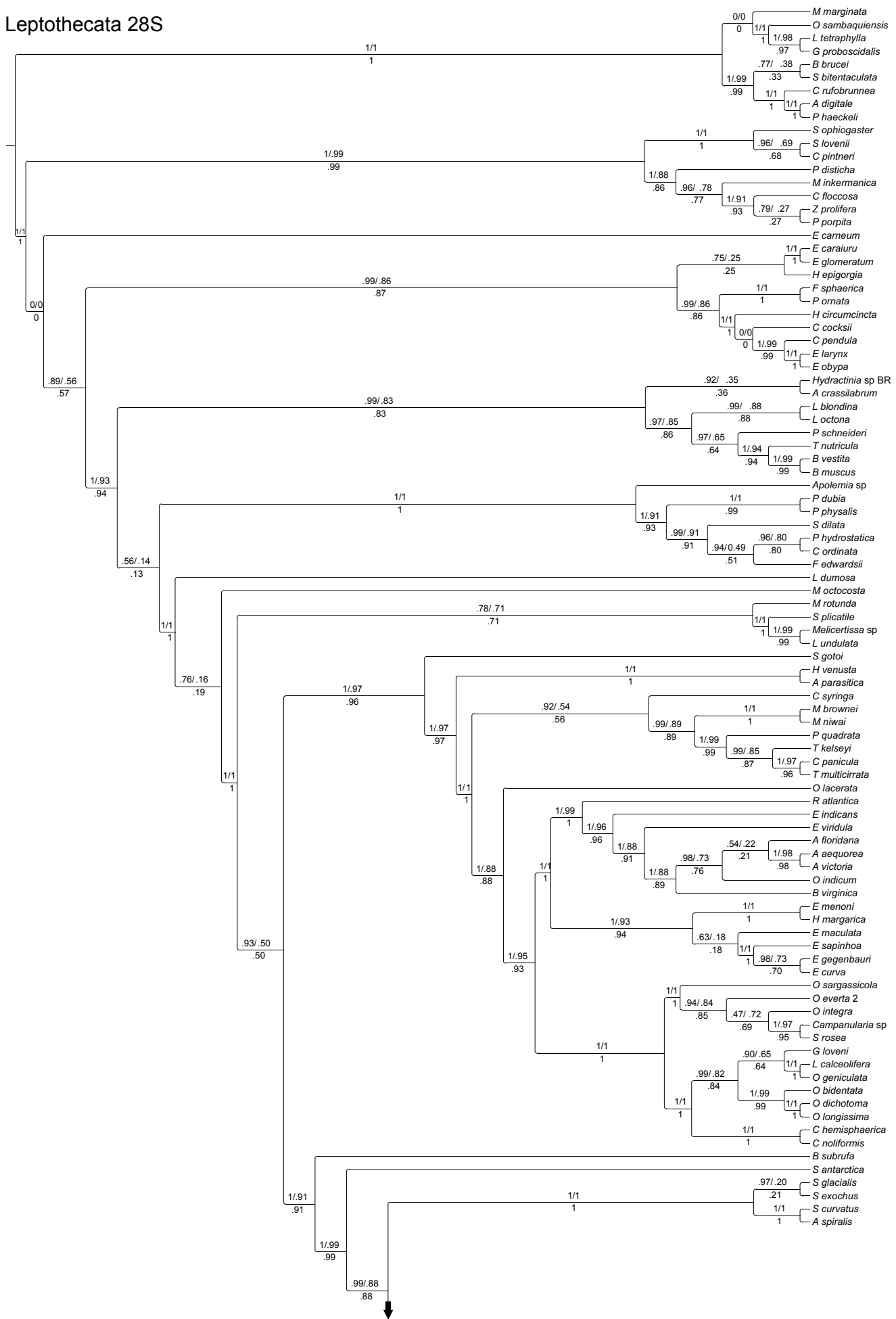


Figura Suplementar 9 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata sem filtragem de dados do marcador 28S (matriz 28S). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 28S

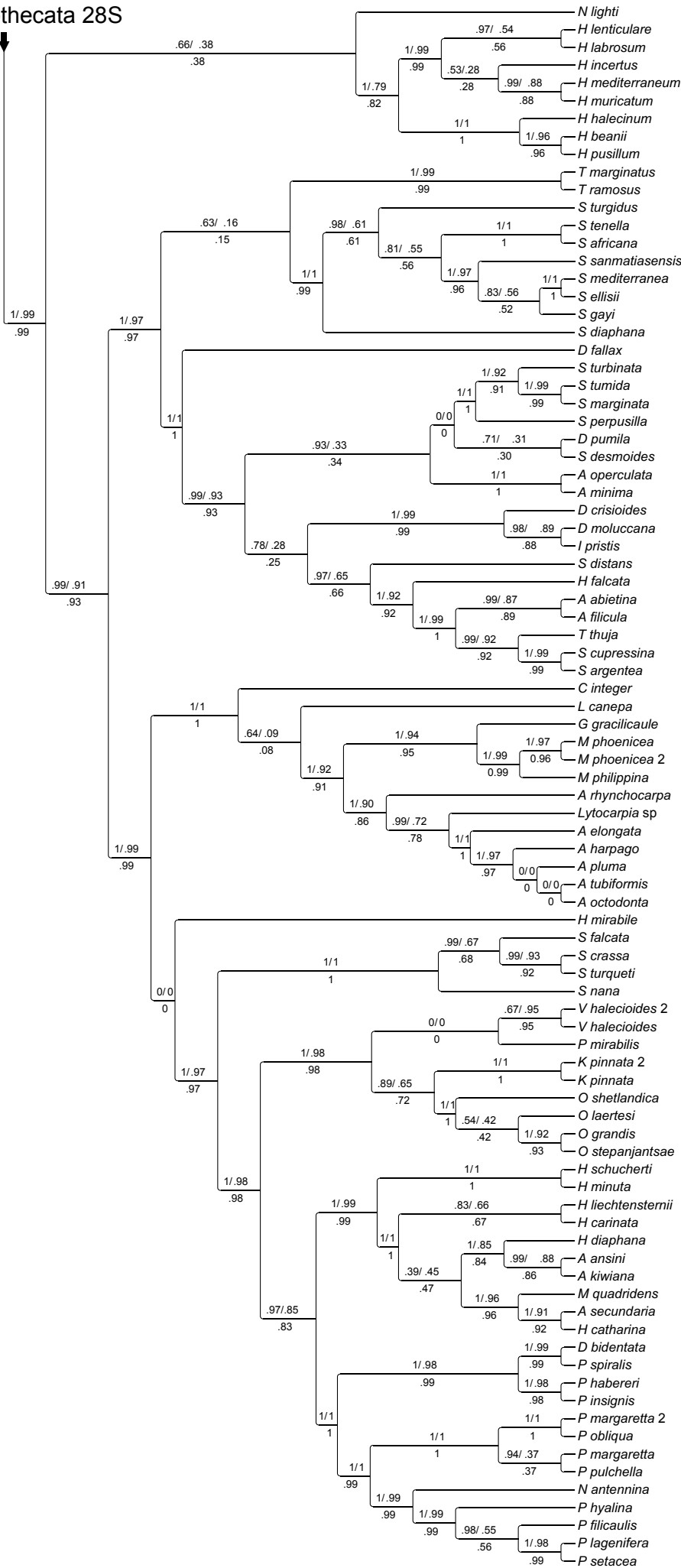


Figura Suplementar 9 - continuação

Leptothecata 28S\_N

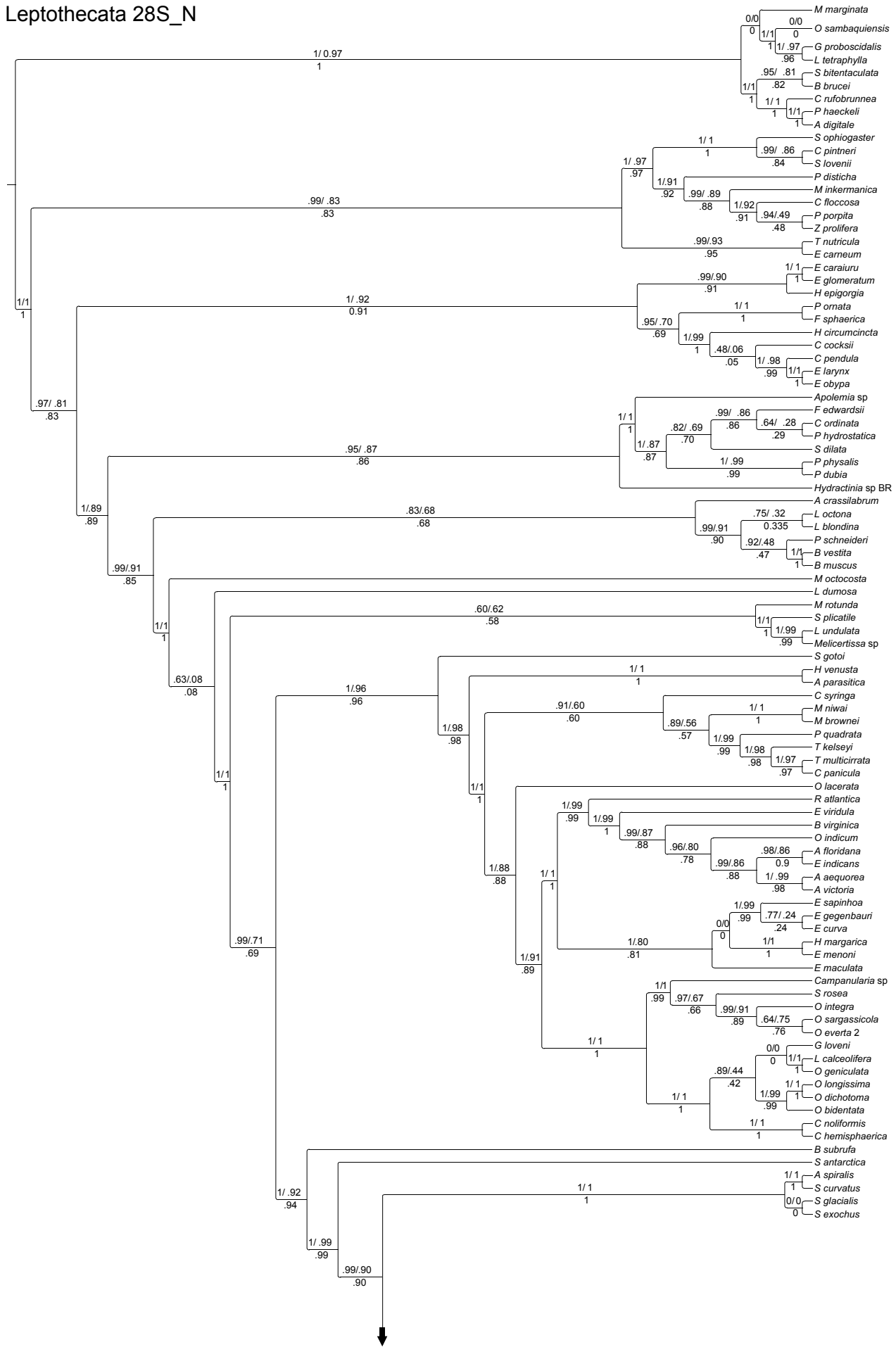


Figura Suplementar 10 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem mínima de dados do marcador 28S (matriz 28S\_N). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia básica (espécies e gêneros) a partir da base de dados WoRMS.

Leptothecata 28S\_N

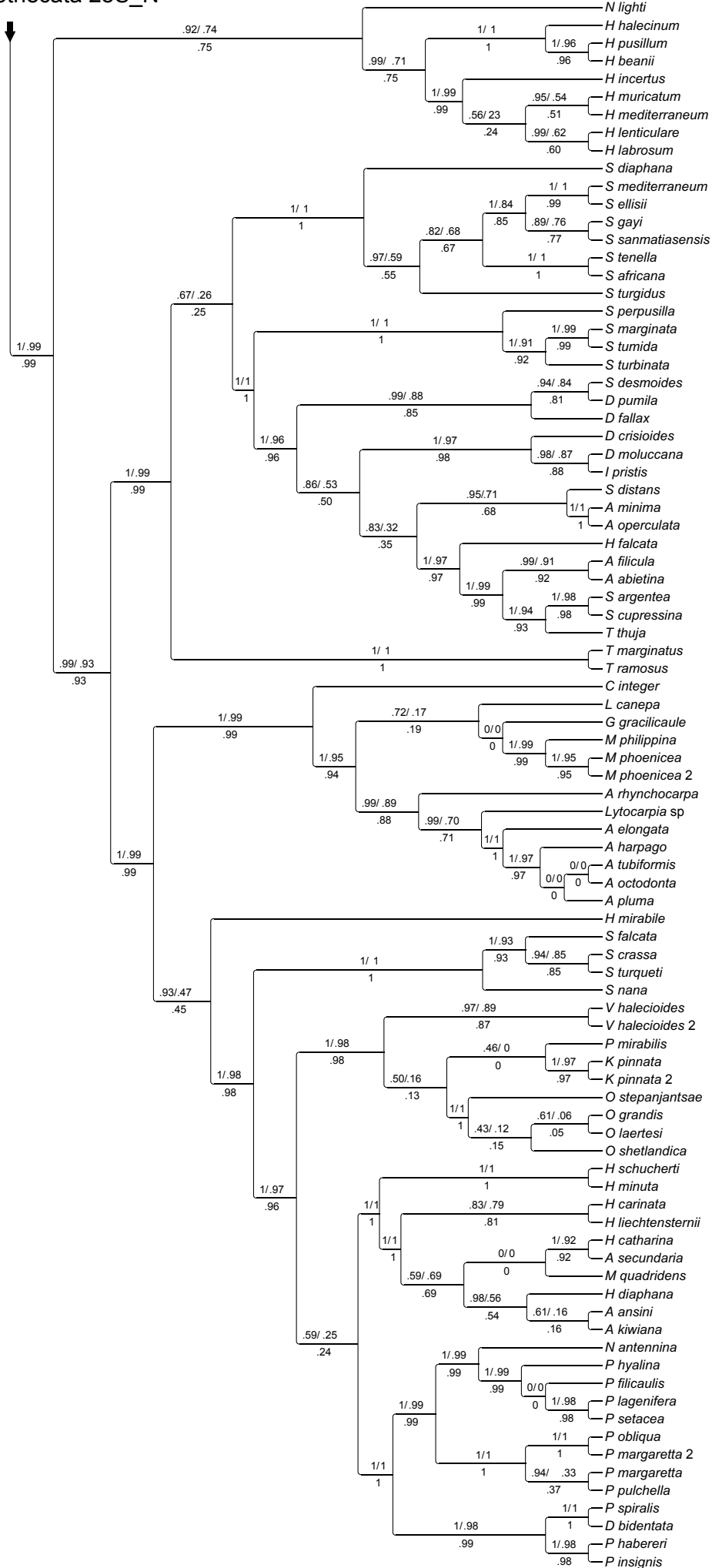


Figura Suplementar 10 - continuação



Leptothecata 28S\_Nrw4

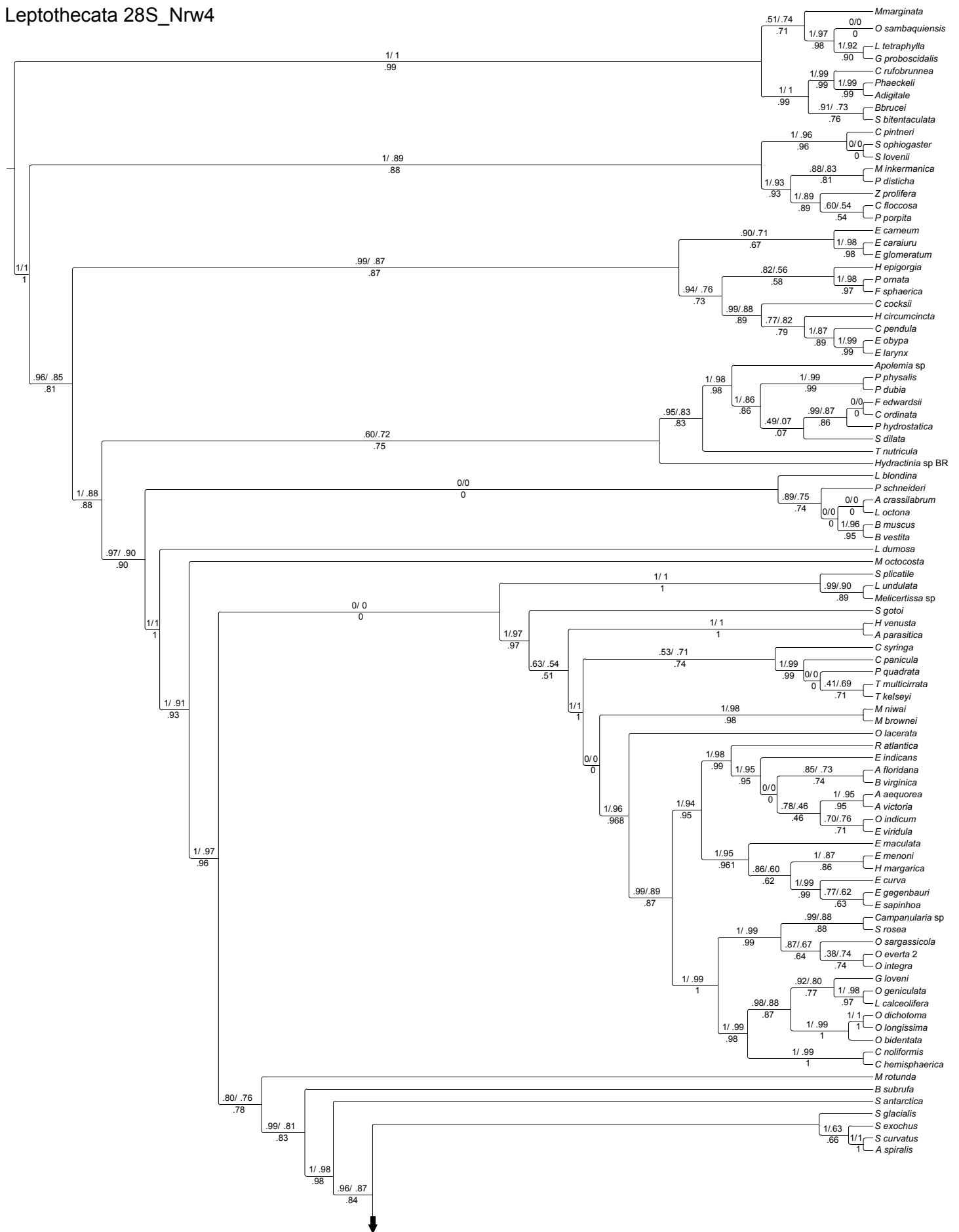


Figura Suplementar 11 - Cladograma da análise filogenética de Leptothecata com filtragem intensiva de dados do marcador 28S (matriz 28S\_Nrw4). Para cada ramo apresentam-se três valores de suporte (dois paramétricos, posição superior no ramo -aBAYES, aLRT-; um não paramétrico, posição inferior no ramo -SH-aLRT-). Os valores de suporte são números inteiros (1 ou 0), ou números decimais (nesses casos não se apresenta o número inteiro 0). Taxonomia a partir da base de dados WoRMS.

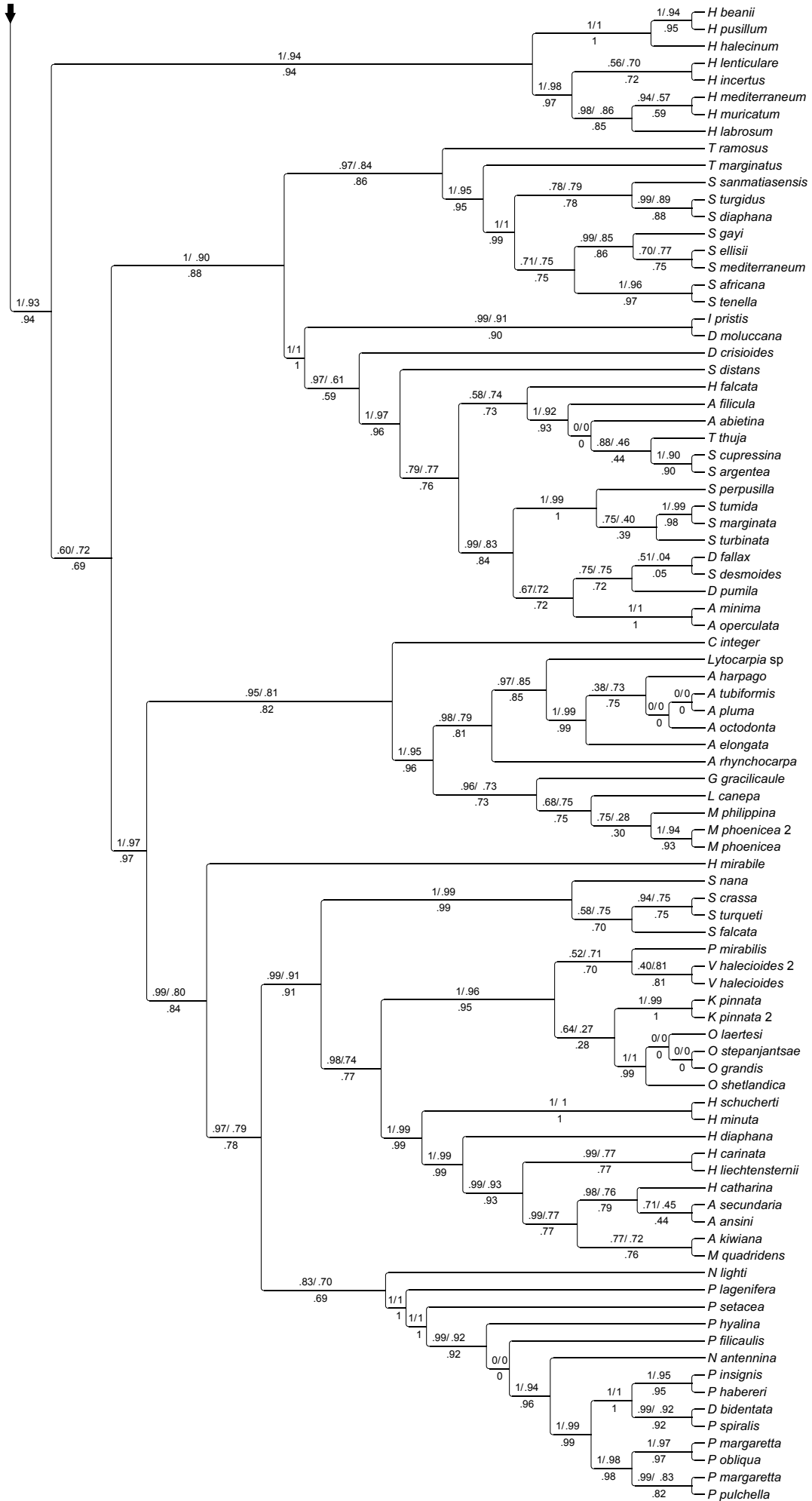


Figura Suplementar 11 - continuação

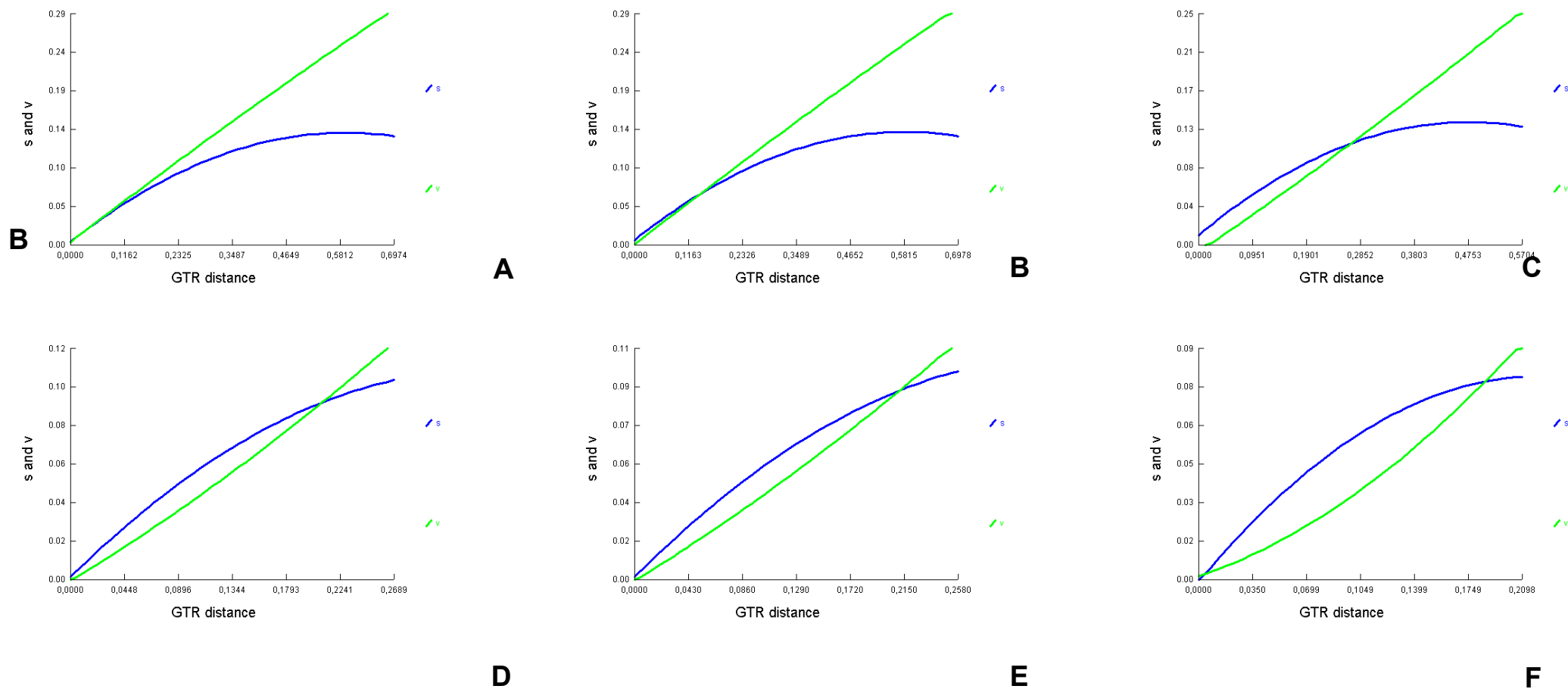


Figura Suplementar 12 – Padrões de substituição dos marcadores 16S e 18S (sem filtragem, filtragem mínimo  $_N$  e filtragem intensivo  $_{Nrw4}$ ). Os números de transições (s) e transversões (v) (eixo vertical) são apresentados contra a distância dos parâmetros calculados com o modelo evolutivo GTR (eixo horizontal), considerando todos os sítios do alinhamento; cada ponto nas linhas representa uma comparação “par a par” entre dois terminais. (A) 16S; (B) 16S\_N; (C) 16S\_Nrw4; (D) 18S; (E) 18S\_N; (F) 18S\_Nrw4. Não foi possível computar os padrões de substituição do marcador 28S no programa DAMBE.

## CAPÍTULO 4

### Considerações finais e perspectivas futuras

---

É lícito considerar que todo estudo em termos de sistemática moderna não resulta em uma conclusão “total” e “final”. Em geral os trabalhos provêm considerações (resultados) que promovem estudos futuros, com maior quantidade de dados (táxons, caracteres). Estes que, se desenvolvidos no contexto científico adequado, fortalecem o conhecimento genealógico entre organismos biológicos atuais ou até extintos. Desta maneira será possível descartar propostas não suportadas, manter propostas históricas formais ou ainda obter e discutir novas hipóteses.

Como parte dos estudos de sistemática filogenética para o grupo Hydrozoa, baseados em dados moleculares, têm surgido uma série de propostas históricas que não tenham sido consideradas previamente (Collins 2000). Isto leva uma situação de conflito na classificação do grupo, assim como nos resultados e interpretações de padrões evolutivos dos hidrozoários (Marques 2001; Cartwright & Nawrocki 2010).

O presente trabalho apresenta considerações relacionadas com a evolução dos Hydrozoa, procurando determinar a posição relativa do grupo Leptothecata (**Capítulo 2**). Este estudo em Hydrozoa nos permitiu desenvolver e aplicar um esquema de “avaliação cruzada” na tomada de decisões analíticas, referente a dados e suporte nodal, como forma de “crítica e validação” da inferência filogenética e a apresentação de resultados filogenéticos baseados em dados moleculares.

Nosso resultado define uma relação filogenética próxima entre Leptothecata e o grupo Filifera, especificamente a linhagem denominada Filifera IV (Cartwright et al. 2008). A relação entre estes grupos de Filifera e Leptothecata não havia sido considerada previamente na literatura recente, mas um relacionamento parcial de linhagens tinha sido apresentado por Broch (1910), e assim chamam a nossa atenção sobre possíveis relações históricas de homologia entre a hidroteca e a estrutura de pseudohidroteca. Também consideramos que serão de valor para futuros estudos de cenários históricos,

relacionados com a evolução da forma colonial nos Hydroidolina, e especialmente nos leptotecados.

No caso de nosso estudo filogenético focado nos Leptothecata (**Capítulo 3**), temos gerado e estudado a maior matriz de dados e espécies até o momento para o grupo. Vários dos nossos resultados encontram-se na literatura recente (Leclère et al. 2009; Peña Cantero et al. 2010), e outros são novidades para a sistemática do grupo. Em geral, a sistemática e a classificação “tradicional” do grupo ficam seriamente comprometidas nos nossos resultados, chamando à renovação classificatória em termos filogenéticos. Novos clados principais são reconhecidos a partir das espécies amostradas, e definimos clados e uma nomenclatura adequada para aqueles casos em que consideramos possível, a partir de uma tendência ou propriedade morfológica marcante no grupo. Em geral consideramos os padrões para aqueles caracteres que são de relevância na taxonomia e classificação tradicional do grupo, como forma da colônia e estruturas relacionadas com o pólipo e a medusa.

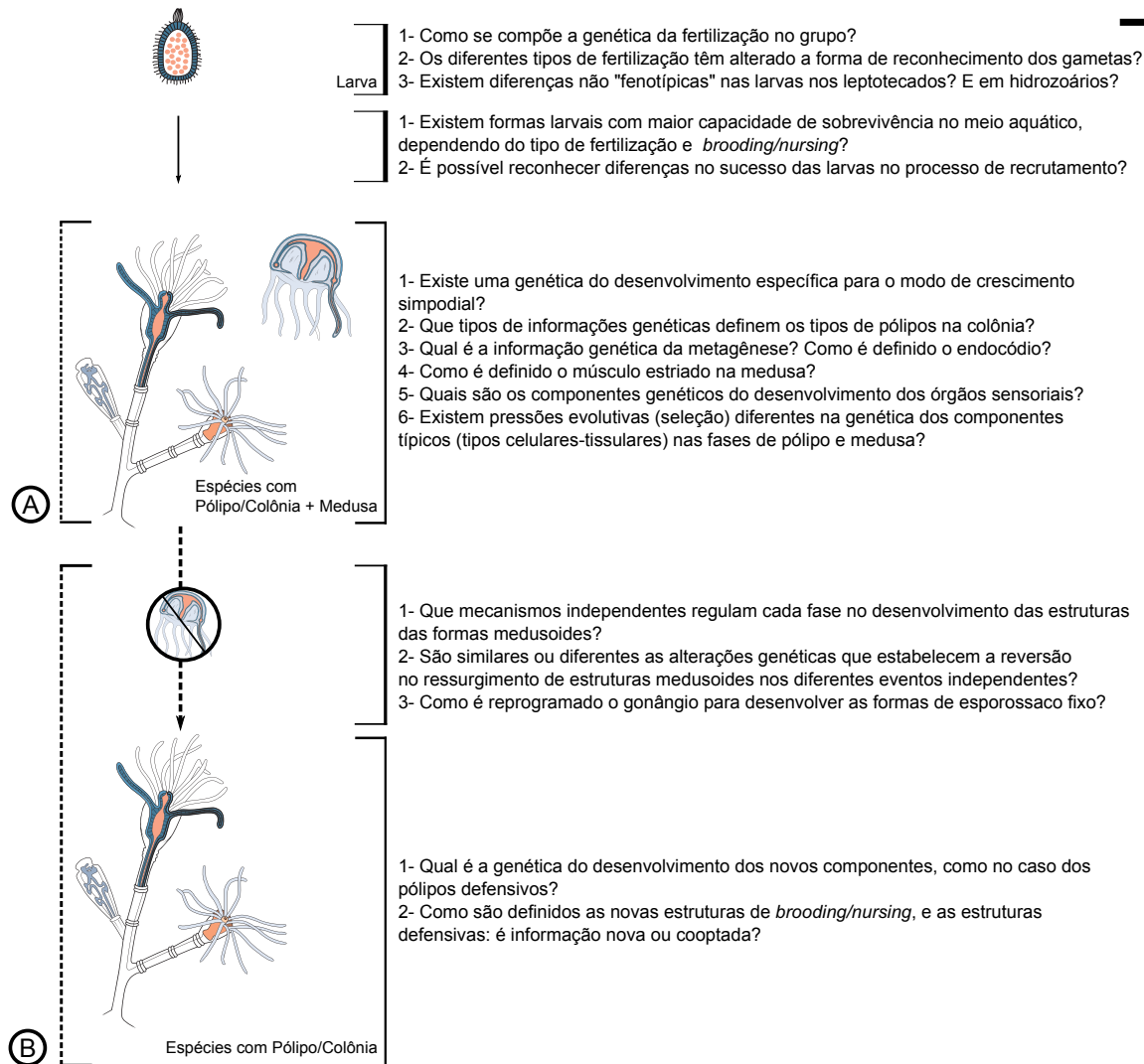
Sobre as propostas tradicionais de transições nas formas de medusa, de pólipo e possíveis eventos de reversão, em geral observamos no grupo *Statocysta* uma tendência à perda de estruturas sensoriais, com ganho e manutenção dos estatocistos; alta plasticidade da forma da colônia e das formas de pólipo, com uma tendência de modificação da forma cuspidela para a forma campanulinida. Considerando alterações nos ciclos de vida, reconhecemos a presença de eventos de perda da fase de medusa não relacionados historicamente de forma direta, reversões vestigiais e potencial condição de transição gradual da fase pelágica livre como uma estrutura especializada fixa na fase bentônica.

No caso do grupo *Macrocolonia*, destacam-se o estabelecimento de colônias eretas complexas, transição no pólipo de perda de opérculo e diafragma, em conjunto com estabelecimento de novos tipos de pólipos e estruturas coloniais defensivas, relacionadas à gônada fixa. O ciclo de vida de forma marcante é sem fase de medusa, e com poucos casos sem relação histórica direta de formas de gonóforos natatórios. Não consideramos como provável o padrão gradual para a morfogênese da colônia proposta na literatura recente (forma estolonar → forma simpodial → forma ereta complexa;

Questões de genética e evolução nos Leptothecata

Sobre Módulos e semaforontes

Sobre espécies e ciclos de vida



- 1- Os eventos cladogênicos (grupos Statocysta e Macrocolonia) poderiam ter acontecido em diferentes tempos geológicos?
- 2- Que fatores abióticos poderiam ter reforçado as adaptações biológicas nos diferentes grupos?
- 3- Que tipo de forma colonial e de medusa representava o ancestral de Leptothecata e do grupo Macrocolonia?
- 4- As espécies com fase pelágica encontram-se no modelo evolutivo de estase? Isto acontece em outros grupos com fase pelágica?
- 5- Que componentes do ciclo de vida não considerados até o momento, podem ter sido parte do sucesso especiogênico no grupo Macrocolonia?
- 6- Existem diferenças genéticas relevantes nas populações de espécies com fase de medusa vs espécies sem fase de medusa?

Figura 1 - Perguntas do âmbito da genética evolutiva e macroevolução relacionadas com a morfologia e formas alternativas do ciclo de vida nos Leptotheca. Destacam-se as três fases do ciclo de vida (larva plânula, fase pólipo e fase medusa) e os dois tipos de ciclos de vida (com presença de medusa, "A", e a forma derivada sem fase de medusa, "B").

Kosevich (2012), nem o padrão gradual para a perda ou reversão da fase de medusa (Boero & Sarà 1987; Boero et al. 1992), concordando com recentes resultados na literatura (Leclère et al. 2009).

Os Hydroidolina, com destaque os Leptothecata, apresentam capacidade em gerar novas formas de ciclos de vida (Marques & Collins 2004; Dunn & Wagner 2006; Cartwright & Nawrocki 2010). Estas variações no ciclo de vida têm gerado consequentes padrões de biodiversidade (riqueza de espécies contemporâneas), que foram definidos na literatura como resultado de diferenças nos tipos de dispersão da fase adulta reprodutiva, tempo de vida dos indivíduos e outras propriedades adaptativas (Cornelius 1990, 1992; Leclère et al. 2009). Nós concordamos que o efeito da especiação intensa observada nos Macrocolonia tem relação a propriedades da forma da colônia, mas consideramos que outro aspecto relevante na biologia do grupo precisa ser avaliado como potencial “motor” de diversificação do grupo: a fertilização interna nos Macrocolonia. Correlacionado com novas propriedades defensivas e uma possível maior dispersão do considerado tradicionalmente, poderiam ser o eixo das diversificações observadas no grupo. A importância do tipo de reprodução e do ciclo de vida tem sido explorada de forma intensa em diversos grupos de invertebrados marinhos, e consideramos que deve ser um tópico importante a ser avaliado nos Leptothecata (Figura 1; e.g., Levitan & Petersen 1995; Yund 2000; Williams & Bentley 2002; Bishop & Pemberton 2006; Collin 2012).

Novas técnicas de análise de filogramas e integração com informação fóssil estão permitindo avaliações de hipóteses macroevolutivas (Morlon 2014). Desta maneira é possível discutir de forma mais objetiva a forma nos tempos evolutivos das diversificações de grandes grupos (Chan & Moore 2005; Barbeitos et al. 2010; McInnes et al. 2011; Moore 2012; Pennell et al. 2012). A pesquisa evolutiva dos hidrozoários (e leptotecados) tem grande potencial neste contexto, especialmente se consideramos os “jovens” padrões filogenéticos apresentados na última década de estudos sistemáticos nos grupos discutidos (Marques 2001; Cartwright & Collins 2007; Collins 2009; Van Iken et al. 2014).

A pesquisa e conhecimento da biologia dos Leptothecata não têm parado de crescer e amadurecer ao longo das décadas. Contudo, muitas das

importantes perguntas históricas que Cornelius e tantos outros pesquisadores instigaram no século XX (Cornelius 1990, 1992; Vervoort 1995; Schuchert 1998; Gravili et al. 2008) continuam ativas e tão desafiantes como na época das suas propostas originais.

## Referências bibliográficas

- Barbeitos MS, Romano SL, Lasker HR. 2010. Repeated loss of coloniality and symbiosis in scleractinian corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:11877–11882.
- Bishop JDD, Pemberton AJ. 2006. The third way: spermcast mating in sessile marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 46:398–406.
- Boero F, Bouillon J, Piraino S. 1992. On the origins and evolution of hydromedusan life cycles (Cnidaria, Hydrozoa). In: Dallai R (editor). *Sex Origin and Evolution*. Mucchi, Modena. Pp. 59–68.
- Boero F, Sarà M. 1987. Motile sexual stages and evolution of Leptomedusae (Cnidaria). *Italian Journal of Zoology* 54:131–139.
- Broch H 1910. Die Hydroiden der Arktischen Meere. In: Römer F, Schaudinn F (editors). *Fauna Arctica* 5. Jena, Fischer G. Pp. 128–248.
- Cartwright P, Collins AG. 2007. Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages. *Integrative and Comparative Biology* 47:744–751.
- Cartwright P, Evans NM, Dunn CW, Marques AC, Miglietta MP, Schuchert P, Collins AG. 2008. Phylogenetics of Hydroidolina (Hydrozoa: Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 1663–1672.
- Cartwright P, Nawrocki AM. 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and Comparative Biology* 50:456–472.
- Chan KMA, Moore BR. 2005. SYMMETREE: whole-tree analysis of differential diversification rates. *Bioinformatics* 21:1709–1710.
- Collin R. 2012. Nontraditional life-history choices: what can “intermediates” tell us about evolutionary transitions between modes of invertebrate development? *Integrative and Comparative Biology* 52:128–137.
- Collins AG. 2000. Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Scientia Marina* 64:5–22.
- Collins AG. 2009. Recent insights into Cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences* 38:139–149.
- Cornelius PFS. 1990. Evolution in leptolid life-cycles (Cnidaria: Hydrozoa). *Journal of Natural History* 24:579–594.
- Cornelius PFS. 1992. Medusa loss in leptolid Hydrozoa (Cnidaria), hydroid rafting, and abbreviated life-cycles among their remote-island faunas: an interim review. *Scientia Marina* 56:245–261.
- Dunn CW, Wagner GP. 2006. The evolution of colony-level development in the Siphonophora (Cnidaria:Hydrozoa). *Development genes and evolution* 216:743–754.
- Gravili C, Pagliara R, Vervoort W, Bouillon J, Boero F. 2008. Trends in hydroidomedusan research from 1911 to 1997. *Scientia Marina* 64:23–29.
- Kosevich IA. 2012. Morphogenetic foundations for increased evolutionary complexity in the organization of thecate hydroids shoots (Cnidaria, Hydroidomedusa, Leptomedusae). *Biology Bulletin* 39:172–185.
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, Couloux A, Manuel M. 2009. Molecular phylogenetics of Thecata (Hydrozoa, Cnidaria) reveals long-term maintenance of life history traits despite high frequency of recent character changes. *Systematic Biology* 58:509–526.
- Levitan DR, Petersen C. 1995. Sperm limitation in the sea. *Trends in Genetics* 10:228–231.
- Marques AC. 2001. Simplifying hydrozoan classification: inappropriateness of the group Hydroidomedusae in a



- phylogenetic context. *Contributions to Zoology* 70:175–179.
- Marques AC, Collins AG. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and Cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123:23–42.
- McInnes L, Orme CDL, Purvis A. 2011. Detecting shifts in diversity limits from molecular phylogenies: what can we know? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278:3294–3302.
- Moore A. 2012. Towards the new evolutionary synthesis: Gene regulatory networks as information integrators. *BioEssays* 34:87.
- Morlon H. 2014. Phylogenetic approaches for studying diversification. *Ecology Letters* 17: 508–525.
- Peña Cantero AL, Sentandreu V, Latorre A. 2010. Phylogenetic relationships of the endemic Antarctic benthic hydroids (Cnidaria, Hydrozoa): what does the mitochondrial 16S rRNA tell us about it? *Polar Biology* 33:41–57.
- Pennell MW, Sarver BAJ, Harmon LJ. 2012. Trees of unusual size: biased inference of early bursts from large molecular phylogenies. *PLoS ONE* 7: e43348.
- Van Iten H, Marques AC, Leme JM, Pacheco MLAF, Simões MG. 2014. Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic–Cambrian history. *Palaeontology. Early view*, Pp. 1-14. doi: 10.1111/pala.12116.
- Vervoort W. 1995. Bibliography of Leptolida (non-Siphonophoran Hydrozoa, Cnidaria). Works published after 1910. *Zoologische Verhandelingen* 301:1–432.
- Williams ME, Bentley MG. 2002. Fertilization success in marine invertebrates: the influence of gamete age. *Biological Bulletin* 202:34–42.
- Yund PO. 2000. How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? *Trends in Genetics* 15:10–13.

## Resumo

---

Na pesquisa evolutiva do grupo Hydrozoa, um dos maiores desafios continua sendo a proposta de relações históricas entre grandes grupos. A partir de um ciclo de vida “tradicional” nos Medusozoa, determinado pela metagênese (a geração da fase adulta pelágica de medusa a partir de um pólipó bentônico), as linhagens apresentam espécies com formas alternativas de ciclo de vida e uma riqueza de espécies diversa, sendo destacado o grupo mais rico em espécies, os Leptothecata. Novos dados moleculares para diversas espécies de Hydrozoa, e principalmente de Leptothecata, foram gerados para combinar com informação genética já disponível. A partir de matrizes multilocus e individuais gênicas de marcadores ribossomais, foram realizadas diferentes análises para inferir e avaliar filogenias, assim como também para definir e estabelecer o impacto dos métodos utilizados na qualidade dos estudos filogenéticos desenvolvidos para Hydrozoa em geral, e Leptothecata de forma específica. Os resultados permitem propor novas relações sistemáticas básicas nos Hydroidolina, assim como uma nova classificação taxonômica para uma das suas linhagens principais, os Leptothecata. A partir do cenário filogenético obtido, são discutidos fenômenos que podem ter promovido o padrão macroevolutivo do grupo dos leptotecados. Desafios e questões de genética evolutiva, que podem ser de grande relevância na evolução do grupo, são apresentados como vínculo temático para futuros estudos no capítulo final.

## Abstract

---

*In modern evolutionary research considering lineages such as the Hydrozoa, one of the major challenges is the proposal of historical relationships between their main groups. From a “traditional” life cycle in Medusozoa, defined by a metagenesis process (the generation of a pelagic adult phase from a benthic polyp), the lineages exhibit a diverse array of life cycles and species richness, with Leptothecata being considered the richest group in number of species. New molecular data for diverse Hydrozoa species, particularly from Leptothecata, were generated to combine with available genetic information. From new multilocus and single gene matrices of ribosomal markers, different analyses were created to infer and evaluate phylogenies, as well as to define and establish the impact of used methods on data treatment and nodal support to Hydrozoa, and more specifically, Leptothecata. The results allow proposing new basic systematics relationships in Hydroidolina, as well as a new taxonomic classification for Leptothecata. From this phylogenetic scenario, potential phenomena that may have promoted the macroevolutionary pattern of the group are presented and discussed. Questions and challenges from evolutionary genetics, which may be relevant in the evolution of the group, are presented as nexus for future studies in the final chapter.*