

Taxonomic review of the terrestrial planarian genus *Issoca* Froehlich, 1955
(Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) and related species

Revisão taxonômica do gênero de planárias terrestres *Issoca* Froehlich, 1955
(Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) e espécies afins

RESUMO

A sistemática dos gêneros de planárias terrestres Neotropicais *Luteostriata*, *Winsoria*, *Issoca* e *Supramontana* (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) - abreviado LWIS- é fraca, uma vez que os gêneros são diagnosticados por características bastante semelhantes, apenas variando nos detalhes. A sistemática de LWIS é revisada por meio de uma abordagem morfológica e molecular. Quatro espécies de *Issoca* são redescritas pelo estudo dos espécimes-tipo e/ou material adicional preparado em lâminas histológicas ou por microtomografia computadorizada. A filogenética molecular recuperou (a) LWIS e todas as 13 espécies estudadas como monofiléticas, (b) *Issoca rezendei* como irmã do LWIS restante, (c) *Issoca* e *Luteostriata* polifiléticas e (d) *Winsoria* e *Supramonana* aninhadas cada uma dentro do respectivo clado heterogêneo com respeito à composição das espécies. Apesar do baixo suporte estatístico para alguns clados, a filogenia é congruente com a morfologia das espécies. Morfologicamente, *Issoca rezendei* se diferencia das outras espécies de LWIS e um rediagnóstico do gênero é proposto. Os membros restantes do LWIS são colocados em *Supramontana*, que também é rediagnosticado, e *Luteostriata* e *Winsoria* são considerados sinônimos juniores. Finalmente, quatro novas espécies de *Supramontana* são descritas.

Palavras-chave: Taxonomia, filogenia molecular, *Supramontana*, *Luteostriata*, *Winsoria*.

ABSTRACT

The systematics of the Neotropical land planarian genera *Luteostriata*, *Winsoria*, *Issoca* and *Supramontana* (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) - abbreviated LWIS- is weak since the genera are diagnosed by rather similar features, only varying in the details. The systematics of LWIS is revised through a morphological and molecular approach. Four species of *Issoca* are redescribed by studying the type specimens and/or additional material prepared on histological slides or through micro-computed tomography. The molecular phylogenetics retrieved (a) LWIS and all 13 species studied as monophyletic, (b) *Issoca rezendei* as sister to the remaining LWIS, (c) *Issoca* and *Luteostriata* polyphyletic and (d) *Winsoria* and *Supramontana* nested each within the respective heterogeneous clade with respect to the species composition. Despite the low statistical support for some clades, the phylogeny is congruent with the morphology of the species. Morphologically, *Issoca rezendei* stands apart from the other species of LWIS and a rediagnosis of the genus is proposed. The remaining LWIS members are placed into *Supramontana*, which is also rediagnosed, and *Luteostriata* and *Winsoria* are considered junior synonyms. Finally, four new species of *Supramontana* are described.

Keywords: Taxonomy, molecular phylogeny, *Supramontana*, *Luteostriata*, *Winsoria*.

Introdução geral

As planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida) são vermes achatados de vida livre (Schirch, 1929). Elas são sensíveis às condições de umidade e temperatura do ambiente (Froehlich, 1955b; Winsor, 1998) e vivem no solo em ambientes úmidos, abrigados sob rochas, troncos e folhas caídas (Baptista & Leal-Zanchet, 2010; Carbayo, 2010). Estes organismos fazem parte da fauna menos estudada mundialmente (Carbayo & Froehlich, 2008). Além da importância intrínseca de se conhecer a riqueza biológica, os estudos das planárias terrestres têm demonstrado grande potencial em estudos aplicados à biologia da conservação dos ecossistemas (Álvarez-Presas *et al.*, 2011). No mundo, existem mais de 900 espécies de planárias terrestres (Geoplanidae) conhecidas pela ciência, agrupadas em quatro subfamílias. As espécies pertencentes à subfamília Geoplaninae são exclusivamente neotropicais. Esta subfamília é a mais diversificada nesta região, com 331 espécies (<http://planarias.each.usp.br>; acesso em 20 abril 2020) pertencentes a 23 gêneros (Carbayo *et al.*, 2013), entre eles, *Issoca* Froehlich, 1955a, com distribuição atual conhecida apenas para o Brasil.

Histórica taxonômica e status filético do gênero *Issoca* Froehlich, 1955

O gênero *Issoca* foi proposto por Froehlich (1955a) e sua diagnose complementada por Carbayo & Leal-Zanchet (2003). A característica diagnóstica mais notável do gênero é a extremidade cefálica, provida de um órgão músculo-glandular cujo retrator se origina da musculatura longitudinal cutânea ventral. Atualmente, o gênero é constituído por cinco espécies: *I. spatulata* (Graff, 1899), *I. rezendei* (Schirch, 1929, espécie tipo do gênero), *I. jandaia* Froehlich, 1955a, *I. piranga* Froehlich, 1955a, e *I. potyra* Froehlich, 1958. Há evidências de que existam espécies ainda não descritas (Carbayo *et al.* 2013; Araujo & Carbayo, 2018). Carbayo *et al.* (2013) estudaram as relações filogenéticas entre membros da subfamília Geoplaninae. Neste trabalho, foi revelado o denominado clado LIS, que inclui todas as espécies estudadas de *Luteostriata* Carbayo, 2010, *Issoca*

Froehlich, 1955a e *Supramontana* Carbayo & Leal-Zanchet, 2003, gêneros também da subfamília Geoplaninae. *Issoca*, representado nas filogenias por três espécies, resultou polifilético: *Issoca rezendei* (Schirch, 1929), espécie tipo do gênero, é a espécie-irmã dos demais membros do clado. As demais espécies de *Issoca* formam um grupo monofilético, irmão de *Supramontana*; *Luteostriata* resultou ser um grupo parafilético. Todas as espécies do clado LIS compartilham um conjunto de características morfológicas. Entre essas características destaca o músculo retrator cefálico, cujas fibras derivam da musculatura subcutânea ventral longitudinal. Em *Supramontana* e *Luteostriata*, o retrator apresenta forma irregular e lenticular, respectivamente, em secção transversal, enquanto que em *Issoca* o mesmo é circular. Os três gêneros apresentam uma camada muscular subneural mesenquimática ao longo de todo o corpo, mas apenas em *Issoca* as fibras dessa camada muscular cruzam-se com as do retrator (Carbayo & Leal-Zanchet, 2003; Carbayo, 2010). No entanto, *Issoca assanga* não apresenta essa característica diagnóstica (Araujo & Carbayo, 2018). Esta condição poderia apenas representar uma polimorfia dentro do gênero. Entretanto, a polifilia de *Issoca* apontada em Carbayo *et al.* (2013) e as evidentes diferenças anatômicas do aparelho copulador de *I. rezendei* em relação às demais espécies sugere que, em vez de um caráter polimórfico interespecífico, a intersecção dos músculos retrator e subneural pode ser um reflexo do status polifilético do gênero.

No clado LIS, os elementos musculares cefálicos de *Luteostriata*, *Supramontana* e *Issoca rezendei* são bem conhecidos, enquanto que nas demais espécies de *Issoca* são mal conhecidos. A incongruência entre dados morfológicos e moleculares em *Issoca* reforçam a instabilidade do gênero e apontam a necessidade de se realizar a revisão taxonômica apresentada neste trabalho.

Taxonomia integrativa

O método de taxonomia integrativa tem sido eficientemente utilizado para grupos de vertebrados (Wiens & Penkrot, 2002) e invertebrados (Almeida *et al.*, 2019; Carbayo *et al.*, 2017). A taxonomia integrativa é uma ferramenta que se utiliza de marcadores moleculares (DNA nuclear e/ou

mtDNA), caracteres ecológicos e caracteres morfológicos, auxiliando na identificação e classificação da biodiversidade mundial (Seberg *et al.*, 2003; Dayrat, 2005; DeSalle *et al.*, 2005; Rubinnof *et al.*, 2006; Fonseca *et al.* 2008). Dayrat (2005) discute que a abordagem integrativa é o melhor futuro possível para a taxonomia. Pois, devido a sua complexidade, a diversidade da vida precisa ser estudada por meio de perspectivas múltiplas e complementares.

Até recentemente, os estudos taxonômicos e filogenéticos das planárias terrestres eram realizados exclusivamente com base em características morfológicas. No entanto, a escassez de características morfológicas e a dificuldade em reconhecer sinapomorfias dificultavam a compreensão sistemática do grupo (Álvarez-Presas & Riutort, 2014). Atualmente, os dados moleculares tornaram-se uma das principais fontes de novas informações para avançar a compreensão das relações evolutivas entre os diferentes táxons (Hajibabaei *et al.*, 2007; Jimbo *et al.*, 2011). A utilização dessas metodologias fornece dados mais extensos para identificar espécies e analisar a história evolutiva entre grandes grupos, fornecendo suporte para descrições morfológicas. Isto permite melhores classificações e resulta em mudanças taxonômicas (Álvarez-Presas & Riutort, 2014). Um estudo aplicado a *Dugesia sagitta* (Schmidt, 1861) demonstrou a eficiência da utilização de dados moleculares juntamente com morfológicos. Os dados moleculares sugeriram identidades distintas para cada uma das três populações da espécie da ilha de Corfu (Grécia), enquanto a morfologia aparentava ser uniforme para as três (Álvarez-Presas & Riutort, 2014). No entanto, com investigações morfológicas mais detalhadas, foram identificados caracteres morfológicos divergentes em apenas uma das populações de *D. sagitta*. Assim, ambos os conjuntos de dados reforçaram-se mutuamente para mostrar que uma das populações era uma nova espécie, enquanto que, as outras duas populações de Corfu, não apresentaram nenhuma diferença morfológica evidente entre elas, apontando a possibilidade da existência de espécies morfológicamente crípticas (Álvarez-Presas & Riutort, 2014). Trabalhos da mesma natureza, i.e., taxonomia integrativa, aplicados ao estudo de planárias terrestres

têm permitido o reconhecimento de espécies crípticas (Álvarez-Presas & Riutort, 2014; Álvarez-Presas *et al.*, 2015; Carbayo *et al.*, 2017). O uso de informações moleculares parece ser, portanto, uma estratégia robusta para detectar espécies potencialmente novas e testar o status taxonômico de espécies conhecidas (Álvarez-Presas & Riutort, 2014; Jimbo *et al.*, 2011).

Filogenia molecular

Uma filogenia é uma árvore que contém nós conectados por ramos. Cada ramo representa uma linhagem genética ao longo do tempo, e cada nó representa o surgimento de uma nova linhagem. As árvores filogenéticas são inferidas a partir de sequências de DNA, ou de outros dados. Os métodos de reconstrução filogenética podem ser baseados em distância ou em caráter. Nos métodos que utilizam matriz de distância, como *neighbour-joining*, a distância entre cada par de sequências é calculada e a matriz de distância resultante é usada para reconstrução de árvores. Enquanto que os baseados em caracteres incluem três métodos de inferência: Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) (Felsenstein, 1988; Holder & Lewis, 2003; Peña, 2011; Yang & Rannala, 2012).

Os métodos baseados em caracteres comparam simultaneamente todas as sequências de DNA contidas em um alinhamento, analisando cada caractere por vez para calcular um *score* para cada árvore obtida. Para MP o *score* é expresso pelo número mínimo de alterações, para a MV é o valor da probabilidade logarítmica (bootstrap) e para a IB a probabilidade posterior. Para analisar os dados, matriz de distância, máxima verossimilhança e inferência bayesiana usam modelos de substituição e, portanto, são baseados em modelos evolutivos, enquanto que a máxima parcimônia não possui um modelo explícito e suas suposições estão implícitas (Holder & Lewis, 2003; Yang & Rannala, 2012).

Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana

Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana são métodos estatísticos baseados em modelos evolutivos molecular (Holder & Lewis, 2003; Peña,

2011; Yang & Rannala, 2012). Em ambos os métodos o conhecimento a priori sobre os caracteres é levado em consideração. O método ML estima a probabilidade de quão bem a matriz de caracteres é explicada pelas árvores filogenéticas (Felsenstein 2004), enquanto a IB estima a probabilidade de quão bem as árvores filogenéticas são explicadas pelos dados (a matriz de caracteres) (Huelsenbeck *et al.*, 2001). A MV precisa calcular todas as árvores possíveis que possam ser derivadas dos dados de acordo com o modelo de evolução selecionado. Além disso, deve-se calcular o comprimento do ramo para cada árvore diferente (Huelsenbeck & Rannala, 1997).

Alguns autores preferem usar IB sobre ML porque o primeiro método usa "atalhos" para cálculos usando o algoritmo conhecido como Markov Chain Monte Carlo (MCMC), que permite pesquisas em um número menor de árvores com base em seus valores de probabilidades posteriores (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

Apesar de atualmente esses métodos serem amplamente utilizados, os métodos probabilísticos não são isentos de críticas. A principal desvantagem da MV é que a busca por árvores sob o critério de probabilidade exige potência computacional. Outra desvantagem é que o método possui propriedades estatísticas potencialmente ruins se o modelo evolutivo for especificado incorretamente. Isso também se aplica à IB (Yang & Rannala, 2012). Além disso, ML e IB não são confiáveis quando as taxas de evolução do DNA não são homogêneas ao longo do tempo ou entre linhagens (Kolaczowski & Thornton, 2004).

Máxima Parcimônia

Na MP, são utilizadas o mínimo de pressupostos possíveis a priori sobre os caracteres como fonte de informação. Dessa maneira, todos os caracteres são tratados da mesma maneira, com o "mesmo peso" ou a mesma influência, ao inferir árvores filogenéticas, pois as homoplasias não são identificados a priori. Na MP, a árvore filogenética escolhida é aquela que envolve a quantidade mínima de mudanças evolutivas ("etapas" evolutivas) necessárias para explicar uma determinada matriz de caracteres (Peña, 2003; Holder & Lewis, 2003; Yang & Rannala, 2012).

Um dos principais pontos negativos da parcimônia é a ausência de suposições explícitas, o que torna praticamente impossível incorporar qualquer conhecimento evolutivo da sequência na reconstrução de árvores. Além disso, a incapacidade da parcimônia em corrigir múltiplas substituições no mesmo local faz com que o método apresente um problema conhecido como “atração dos ramos longos”, *long branch attraction* (Felsenstein, 1978). Se uma árvore possui dois longos ramos externos separados por um pequeno ramo interno, a parcimônia tende agrupar os ramos longos. Assim, a parcimônia poderá apresentar como resultado uma árvore inconsistente (Holder & Lewis, 2003; Yang & Rannala, 2012).

Microtomografia computadorizada (mCT): técnica não destrutiva para estudos morfológicos

O estudo morfológico das planárias é feito a partir de preparações histológicas dos animais cortados em espessuras de 4-10 µm. Durante o processamento histológico, o material pode sofrer distorções e deformações, inviabilizando o estudo e até levar à perda de tecido (Sombke *et al.*, 2015). Além disso, esta técnica inviabiliza sua utilização para abordagens subsequentes, como a análise molecular. Por ser uma técnica não destrutiva, o mCT é ideal para o estudo de amostras de museus e de espécimes tipo, pois evita a destruição do animal e os riscos de perda de tecido (Carbayo & Lenihan, 2016).

O avanço das técnicas de imagem digital, combinado com o aumento da capacidade computacional, permitiu a implementação de reconstruções computadorizadas em 3D, permitindo novas abordagens nas ciências biológicas. O processo de reconstrução 3D começa na aquisição de dados através de técnicas de obtenção de imagens virtuais (mCT, síncrotron etc.). O conjunto dessas imagens são subsequentemente processado por *softwares* apropriados para modelar o objeto de interesse com alta precisão geométrica, resultando em um clone virtual interativo da estrutura biológica selecionada. Assim, as estruturas do indivíduo podem ser exploradas em qualquer plano de corte virtual através do conjunto de

dados brutos. O modelo 3D resultante permite a visualização do arranjo espacial de várias estruturas simultaneamente (Laforsch *et. al.*, 2012).

Uma das limitações técnicas da utilização de mCT é de que a alta resolução só pode ser obtida para amostras pequenas com tamanhos máximos de 5 a 30 mm. Além disso, em tecidos não mineralizados, o contraste radiológico é mais difícil de ser obtido. O uso de agentes de aumento de contraste (iodo inorgânico e ácido fosfotúngstico) podem ser utilizados para amenizar tal dificuldade (Metscher, 2009). Esses agentes não causam danos aos tecidos (Faulwetter *et al*, 2013).

Considerações finais

Estudos anteriores já indicaram o status não monofilético de *Issoca* e a necessidade de sua revisão. Os resultados desse trabalho também indicaram o status não monofilético de *Issoca* e a necessidade de reorganizar a classificação das demais espécies dos gêneros afins (LWIS abreviadamente, para os quatro gêneros). Apesar das limitações estatísticas das nossas árvores filogenéticas, estas são congruentes com os dados morfológicos e concordam com a topologia geral de trabalhos anteriores (Carbayo *et al.*, 2013; Negrete *et al.*, 2019).

Algumas características interespecíficas variam em detalhes: a região cefálica pode ser em forma de colher (*Issoca*), arredondada (*Supramontana*, *Issoca*, *Luteostriata*) ou truncada (*Winsoria*); às vezes é em forma de V invertido ao rastejar (*Winsoria*, *Issoca*, *Luteostriata*, *Supramontana*). O músculo retrator se dissipa em direção à extremidade anterior à medida que os feixes se desprendem dele correndo para as margens do corpo (*Issoca*, *Supramontana*) ou também para o dorso (*Luteostriata*). A papila peniana pode ser bem desenvolvida (*Supramontana*, *Winsoria*, *Issoca*), pequena (*Issoca*) ou ausente (*Luteostriata*, *Issoca*). A maioria dessas características exhibe diferenças contínuas entre os gêneros. Sendo assim, os dados morfológicos utilizados até então para definir os gêneros são pouco consistentes. Além disso, *Issoca rezendei* difere claramente dos membros restantes do clado LWIS

em três características exclusivas: a musculatura subneural e o músculo retrator estão intercalados (mas em algumas espécies a intercalação é apenas entre umas poucas fibras de cada músculo); a vesícula prostática é intrabulbar; um átrio feminino está ausente.

Apesar da grande variação morfológica entre as espécies de *Issoca*, as espécies podiam ser acomodadas em *Issoca*, porque a diagnose do gênero não incluía caracteres tradicionalmente importantes, como a papila do pênis, os átrios masculino e feminino ou o canal genital feminino. Além disso, a descrição da região cefálica do gênero era baseada apenas na espécie-tipo (Froehlich, 1955; Carbayo & Leal-Zanchet, 2003).

Com a presente revisão taxonômica, *Issoca rezendei* é a única espécie que permanece no gênero. A diagnose do gênero é complementada com os seguintes caracteres: a vesícula prostática é intrabulbar; a papila do pênis é cônica e atarracada; e não existe átrio feminino. As demais espécies do clado LWIS são sinonimizadas no gênero *Supramontana* e este gênero é rediagnosticado, contemplando, entre outras, estas características: músculo retrator, afundado no parênquima e dissipando-se para a extremidade anterior em feixes que correm para as margens do corpo, às vezes também para o lado dorsal; um músculo transversal subneural presente, que na região cefálica está localizado acima do músculo retrator cefálico; vesícula extrabulbar prostática; papila do pênis geralmente presente.

Este trabalho taxonômico, baseado em caracteres morfológicos e moleculares, revela a importância de testar independentemente hipóteses morfológicas no reconhecimento de grupos monofiléticos, com hipóteses moleculares. Esperamos que, no futuro, o aumento da representatividade de espécies e o uso de novos marcadores moleculares auxiliem no teste e descoberta de mais grupos naturais.

Referências

- Almeida, A. L., Marques, F. P., & Carbayo, F. (2019). 'Endless forms most beautiful': taxonomic revision of the planarian *Geoplana* *vaginuloides* (Darwin, 1844) and discovery of numerous congeners (Platyhelminthes: Tricladida). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185(1), 1-65.
- Álvarez-Presas, M., Carbayo, F., Rozas, J., & Riutort, M. (2011). Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(4), 887-896.
- Álvarez-Presas, M., & Riutort, M. (2014). Planarian (Platyhelminthes, Tricladida) diversity and molecular markers: a new view of an old group. *Diversity*, 6(2), 323-338.
- Álvarez-Presas, M., Amaral, S. V., Carbayo, F., Leal-Zanchet, A. M., & Riutort, M. (2015). Focus on the details: morphological evidence supports new cryptic land flatworm (Platyhelminthes) species revealed with molecules. *Organisms Diversity & Evolution*, 15(2), 379-403.
- Araujo, A.P.G. & Carbayo, F. (2018). A new species of the land planarian *Issoca* (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) sheds light on the polyphyletic status of the genus. *ZooKeys*, 752, 1-15.
- Baptista, V. A., Matos, L. B., Fick, I. A., & Leal-Zanchet, A. M. (2006). Composição das comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) do Parque Nacional dos Aparados da Serra, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 96(3), 293-297.
- Carbayo, F., & Leal-Zanchet, A. M. (2003). Two new genera of geoplaninid land planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) of Brazil in the light of cephalic specialisations. *Invertebrate Systematics*, 17(3), 449-468.

- Carbayo, F. & Froehlich, E. M. (2008). Estado do conhecimento dos macroturbelários (Platyhelminthes) do Brasil. *Biota Neotropical*, 8, 177-197.
- Carbayo, F. (2010). A new genus for seven Brazilian land planarian species, split off from *Notogynaphallia* (Platyhelminthes, Tricladida). *Belgian Journal of Zoology*, 140 (Suppl.), 91-101.
- Carbayo, F., Álvarez-Presas, M., Olivares, C. T., Marques, F. P., Froehlich, E. M., & Riutort, M. (2013). Molecular phylogeny of Geoplaninae (Platyhelminthes) challenges current classification: proposal of taxonomic actions. *Zoologica Scripta*, 42(5), 508-528.
- Carbayo, F., & Lenihan, J. W. (2016). Micro-computed tomography scan and virtual histological slide data for the land planarian *Obama otavioi* (Platyhelminthes). *GigaScience*, 5(1), s13742-016.
- Carbayo, F., Silva, M. S., Riutort, M., & Álvarez-Presas, M. (2017). Rolling into the deep of the land planarian genus *Choeradoplana* (Tricladida, Continenticola, Geoplanidae) taxonomy. *Organisms Diversity & Evolution*, 18(2), 187-210.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85(3), 407-417.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences*, 360(1462), 1905-1916.
- Faulwetter, S., Vasileiadou, A., Kouratoras, M., Dailianis, T., & Arvanitidis, C. (2013). Micro-computed tomography: Introducing new dimensions to taxonomy. *ZooKeys*, (263), 1-45.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual review of genetics*, 22(1), 521-565.
- Felsenstein, J., & Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sunderland, MA: Sinauer associates, Vol. 2, p. 664.
- Fonseca, G., Derycke, S., & Moens, T. (2008). Integrative taxonomy in two free-living nematode species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94(4), 737-753.

- Froehlich, C. G. (1955a). Sobre morfologia e taxonomia das Geoplanidae. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Série Zoologia*, 19, 195-279.
- Froehlich CG (1955b). On the biology of land planarians. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Série Zoologia*, 20, 263-271.
- Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews genetics*, 4(4), 275-284.
- Huelsenbeck, J. P., & Rannala, B. (1997). Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276(5310), 227-232.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550), 2310-2314.
- Jimbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107-124.
- Kolaczkowski, B., & Thornton, J. W. (2004). Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*, 431(7011), 980-984.
- Laforsch, C., Imhof, H., Sigl, R., Settles, M., Heß, M., & Wanninger, A. (2012). Applications of computational 3D-modeling in organismal biology. *Modeling and simulation in engineering*. InTech, Rijeka, 117-142.
- Metscher, B. D. (2009). MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC physiology*, 9(1), 11.
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267.
- Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of heredity*, 97(6), 581-594.

- Schirch, P. F. (1929). Sobre as planarias terrestres do Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 5, 27-38.
- Seberg, O., Humphries, C. J., Knapp, S., Stevenson, D. W., Petersen, G., Scharff, N., & Andersen, N. M. (2003). Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 63-65.
- Sombke, A., Lipke, E., Michalik, P., Uhl, G., & Harzsch, S. (2015). Potential and limitations of X-Ray micro-computed tomography in arthropod neuroanatomy: A methodological and comparative survey. *Journal of Comparative Neurology*, 523(8), 1281-1295.
- Wiens, J. J., & Penkrot, T. A. (2002). Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic biology*, 51(1), 69-91.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics*, 13(5), 303-314.