

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
Diversidade e Manejo de Vida Silvestre
MESTRADO

Silvana Vargas do Amaral

**DIFERENCIAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE
PLANÁRIAS TERRESTRES DO GÊNERO *Geoplana*
(PLATYHELMINTHES: TRICLADIDA: CONTINENTICOLA)
OCORRENTES EM DIFERENTES FORMAÇÕES FLORESTAIS
DO SUL DO BRASIL**

São Leopoldo
2013

Silvana Vargas do Amaral

**DIFERENCIAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE
PLANÁRIAS TERRESTRES DO GÊNERO *Geoplana*
(PLATYHELMINTHES: TRICLADIDA: CONTINENTICOLA)
OCORRENTES EM DIFERENTES FORMAÇÕES FLORESTAIS
DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia, área de concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre, pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Leal-Zanchet

Coorientador: Dr. Víctor Hugo Valiati

São Leopoldo
2013

Ficha catalográfica

A485d Amaral, Silvana Vargas do
Diferenciação de duas espécies crípticas de planárias terrestres do gênero *Geoplana* (Platyhelminthes: Tricladida: Continenticola) ocorrentes em diferentes formações florestais do sul do Brasil / por Silvana Vargas do Amaral. – 2011.
105 f. : il., 30cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2011.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Leal-Zanchet;
Coorientação: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.

1. Planárias. 2. Taxonomia. 3. Espécies crípticas.
4. Diferenciação de espécies. I. Título.

CDU 595.123

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Pai e mãe, por abdicarem de tantas coisas para que eu pudesse ser o que sou hoje.

À Dr. Ana Maria Leal-Zanchet, por todos esses anos de orientação, pela confiança e pelo apoio profissional e pessoal. Tens minha gratidão, admiração e lealdade.

Ao meu co-orientador, Dr. Victor Hugo Valiati por sua perseverança com as “Geoplanas”, pelo carinho e simplicidade com que sempre me orientou. Agora entendo por que és chamado de “paizinho” por seus orientandos. Posso ser mais uma de suas filhas?

Ao Márcio Hisayuki Sasamori meu companheiro na profissão e na vida, pela ajuda imprescindível nas saídas a campo, pelo incentivo a buscar sempre mais e por querer dividir a tua vida e futuramente teus genes comigo.

Às minhas queridas amigas Deise de Lima e Letícia Ayres Guterres, obrigada por estarem do meu lado neste período um tanto conturbado, oferecendo-me sempre o abraço sincero.

À Vanessa dos Anjos Baptista e Michelle Bicalho Antunes. Foi com vocês que tive meus primeiros ensinamentos de bióloga e professora. Obrigada pela hospitalidade, pela ajuda nas coletas, diurnas e noturnas, por fazerem parte da família que escolhi.

À minha família, pelo entusiasmo com as minhas conquistas e pela compreensão.

Aos colegas do Instituto de Pesquisas de Planárias: Letícia Guterres e Rafaela Canello, obrigada pelos milhares de lâminas e ajuda nas inclusões; Virgínia Lemos, pelas conversas e companheirismo; Stella Souza, pela alegria e vontade sem igual de querer ajudar; Ilana Rossi e Piter Boll, pelo carinho, amizade e pela parceria nos trabalhos; Giuly Iturralde, João Braccini, Ana Laura Moraes, Tatiane Scheren, Denírio Marques e Pe. Benya, obrigada por tornarem os dias de pesquisa mais leves na Unisinos. Ao biólogo Lisandro Negrete, obrigada pela disponibilidade nas coletas de espécimes e ensinamentos.

Ao biólogo Guilherme Cauduro, parte deste trabalho seria impossível sem a tua ajuda! Obrigada pelo carinho, bom humor e comprometimento com as planárias.

Às equipes diretivas e colegas das escolas E. E. E. F. Visconde de São Leopoldo e E. E. E. F. Dr. João Daniel Hillebrand pela compreensão e apoio durante este período.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela bolsa de pós-graduação.

ÍNDICE



RELAÇÃO DE FIGURAS.....	06
RELAÇÃO DE TABELAS.....	09
4- RESUMO.....	11
5- ABSTRACT	13
6- APRESENTAÇÃO	15
7- INTRODUÇÃO	16
7.1- Apresentação do tema.....	16
7.2- Justificativa da pesquisa	18
7.3- Objetivos da pesquisa	19
8- CAPÍTULO I.....	20
9- CAPÍTULO II.....	66
10- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

RELAÇÃO DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: <i>Geoplana</i> sp. em repouso, vista dorsal (parátipo IPP 2145).	28
Figura 2: <i>Geoplana</i> sp. em reptação mostrando detalhe do ventre (parátipo IPP 2193).	28
Figura 3: Vista ventral de <i>Geoplana</i> sp. após fixação (parátipo IPP 2145).....	28
Figura 4: Representação esquemática da morfologia externa e distribuição dos olhos, em vista dorsal de <i>Geoplana</i> sp (parátipo IPP 2145).	29
Figura 5: Distribuição dos olhos de <i>Geoplana</i> sp. na região mediana dorsal (parátipo IPP 2145).....	29
Figura 6: Representação do dorso e do ventre <i>Geoplana</i> sp. na região anterior (parátipo IPP 2145).....	29
Figura 7: Região anterior em corte transversal de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	33
Figura 8: Detalhe da região pré-faríngea em corte transversal de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	33
Figura 9: Região pré-faríngea em corte transversal de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	33
Figura 10: Faringe em corte sagital de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	33
Figura 11: Aparelho copulador em corte sagital de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).	37
Figura 12: Aparelho copulador em corte sagital de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).	37
Figura 13: Reconstrução horizontal do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp. (parátipo IPP 2229).....	38
Figura 14: Reconstrução sagital do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	38
Figura 15: Corte horizontal do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp. (parátipo IPP 296a)	39
Figura 16: Corte horizontal do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp. (parátipo IPP 123c)	39
Figura 17: Abertura do ducto eferente na porção bifurcada da vesícula prostática em corte sagital de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	39
Figura 18: Entrada do ovoviteloducto no ovário em corte sagital de <i>Geoplana</i> sp. (holótipo).....	39
Figura 19: <i>Geoplana ladislavii</i> em repouso, vista dorsal (parátipo IPP 2268).....	44
Figura 20: <i>G. ladislavii</i> em reptação mostrando detalhe do ventre (parátipo IPP 2213).	44
Figura 21: Representação esquemática da morfologia externa e distribuição dos olhos, em vista dorsal de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2268).....	45
Figura 22: Distribuição dos olhos na região mediana dorsal <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2268).	45

Figura 23: Representação do dorso e do ventre <i>G. ladislavii</i> na região anterior (parátipo IPP 2268).....	45
Figura 24: Detalhe da extremidade anterior de um exemplar jovem de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2271).....	45
Figura 25: Detalhe da extremidade anterior de um exemplar maduro de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2268).....	45
Figura 26: Região anterior em corte transversal de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2250).....	50
Figura 27: Detalhe da região pré-faríngea em corte transversal de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2237).....	50
Figura 28: Região pré-faríngea em corte transversal de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2237).	50
Figura 29: Faringe em corte sagital de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 2250).	50
Figura 30: Aparelho copulador em corte sagital de <i>G. ladislavii</i> mostrando a grande quantidade de glândulas cianófilas (parátipo IPP 1360).....	54
Figura 31: Aparelho copulador em corte sagital de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 1360).....	54
Figura 32: Reconstrução horizontal do aparelho copulador de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 84).....	55
Figura 33: Reconstrução sagital do aparelho copulador de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 1360).	55
Figura 34: Aparelho copulador de <i>G. ladislavii</i> em corte horizontal (parátipo IPP 84).	56
Figura 35: Aparelho copulador de <i>G. ladislavii</i> em corte sagital (parátipo IPP 2250).....	56
Figura 36: Abertura do ducto eferente na porção bifurcada da vesícula prostática em corte horizontal de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 1051).....	56
Figura 37: Detalhe do acúmulo de glândulas cianófilas na inserção ventral da papila penial de <i>G. ladislavii</i> (parátipo IPP 1360).	56
Figura 38: Relações filogenéticas recuperadas pela máxima verossimilhança entre espécime <i>Geoplana</i> sp1; dois espécimes de <i>Geoplana</i> 107, dois espécimes de <i>Geoplana ladislavii</i> uma <i>Supramontana irritata</i> e sete espécimes de Geoplanidae com sequências depositadas no GenBank correspondentes ao gene ITS1.	58
Figura 39: Relações filogenéticas recuperadas pela máxima verossimilhança entre o espécime <i>Geoplana</i> sp1 (64), 13 espécimes de Geoplanidae e quatro espécimes de <i>Microplana terrestris</i> (Microplaninae), como grupo externo, com sequências depositadas no GenBank do gene mitocondrial COI.....	59

Capítulo II

Figura 1: Corte transversal da região anterior de <i>Geoplana</i> sp., (a) células secretoras do tipo D3 na epiderme dorsal, coloração: azul de Bromofenol; (b) células do tipo V1 na epiderme ventral, coloração: DMAB (parátipo IPP 2259)	70
Figura 2: Corte transversal da região pré-faríngea de <i>Geoplana</i> sp., (a) células secretoras do tipo D3 na epiderme dorsal, coloração: azul de Bromofenol; (b) células do tipo V1 na epiderme ventral, coloração: DMAB (parátipo IPP 2259)	73
Figura 3: Corte sagital da faringe de <i>Geoplana</i> sp., (a) células secretoras do tipo PH2; coloração: DMAB; (b) células do tipo PH3; coloração: Bromofenol (parátipo IPP 2259)	76
Figura 4: Corte sagital do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp. (a) células secretoras do tipo PV1; (b) células do tipo AM2; (c): células secretoras do tipo AF1; (d): células secretoras do tipo CG1. Coloração: Bromofenol (parátipo IPP 2259)	80
Figura 5: Corte transversal da região anterior de <i>G. ladislavii</i> . (a) células secretoras do tipo D2; (b) células do tipo V1. Coloração: (a) masson; (b) azan (parátipo IPP 2213).	83
Figura 6: Corte transversal da região pré-faríngea de <i>G. ladislavii</i> . (a) células secretoras do tipo D2; (b) células do tipo BG1. Coloração: Bromofenol (parátipo IPP 2213).	86
Figura 7: Corte sagital da faringe de <i>G. ladislavii</i> . (a) células secretoras do tipo PH1; (b) células do tipo PH3. Coloração: Bromofenol (parátipo IPP 2213)	89
Figura 8: Corte sagital do aparelho copulador de <i>G. ladislavii</i> . (a) células secretoras do tipo PV1; (b) células do tipo MA2; (c) células do tipo GC1; (d) células do tipo FA2. Coloração: (a): Bromofenol; (b) e (d): masson; (c): Ninhydrin- Schiff (parátipo IPP 2213).	93

RELAÇÃO DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I: Medidas dos espécimes-tipo de <i>Geoplana</i> sp.	30
Tabela II: Musculatura cutânea da região mediana de um corte transversal da pré-faringe em μm e proporção entre a altura da musculatura cutânea e a altura do corpo (índice mc:h) de espécimes-tipo de <i>Geoplana</i> sp.	32
Tabela III: Comprimento da faringe, bolsa faríngea e esôfago, em mm, de espécimes-tipo de <i>Geoplana</i> sp.....	34
Tabela IV: Medidas dos espécimes-tipo de <i>Geoplana ladislavii</i> Graff, 1899.....	46
Tabela V: Musculatura cutânea da região mediana de um corte transversal da pré-faringe em μm e proporção entre a altura da musculatura cutânea e a altura do corpo (índice mc:h) de espécimes-tipo de <i>Geoplana ladislavii</i> Graff, 1899.	48
Tabela VI: Comprimento da faringe, bolsa faríngea e esôfago, em mm, de espécimes-tipo de <i>Geoplana ladislavii</i> Graff, 1899.	51

Capítulo II

Tabela I: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da região anterior de <i>Geoplana</i> sp.....	71
Tabela II: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da pré-faringe de <i>Geoplana</i> sp	74
Tabela III: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da faringe de <i>Geoplana</i> sp.....	77
Tabela IV: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras do aparelho copulador de <i>Geoplana</i> sp	81
Tabela V: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da região anterior de <i>G. ladislavii</i>	84

Tabela VI: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da pré-faringe de *G. ladislavii*87

Tabela VII: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da faringe de *G. ladislavii*.....90

Tabela VIII: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras do aparelho copulador de *Geoplana ladislavii*..... 94

4. RESUMO

De acordo com a descrição original, os espécimes-tipo de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 caracterizam-se por apresentar dorso de coloração verde. Ao ser redescrita, Froehlich, 1959 considerou que exemplares de coloração marrom-esverdeado também seriam representantes dessa espécie. Em diversas formações florestais do Rio Grande do Sul, tem sido registrada a ocorrência de espécimes de dorso marrom ou marrom-esverdeado (*Geoplana* sp.) em simpatria com espécimes de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899, tanto em áreas de mata quanto em áreas ajardinadas com diversos graus de antropização. No presente estudo, realizam-se análises morfológicas e moleculares das duas espécies visando verificar ou não a coespecificidade. Foram analisados exemplares procedentes de áreas de floresta ombrófila mista, floresta estacional semidecidual e floresta estacional decidual e de áreas ajardinadas de diversos municípios do sul do Brasil. Para identificação, realizou-se inicialmente a análise da morfologia externa, em vida e após fixação, registrando forma e tamanho corpóreos, padrão de coloração, distribuição dos olhos e localização da boca e do gonópodo. Após processamento histológico, analisou-se a morfologia interna em fragmentos do corpo correspondentes à região anterior, à região pré-faríngea, à faringe e ao aparelho copulador. Dois exemplares de cada morfoespécie foram submetidos às reações de Alcian Blue-PAS, azul de Bromofenol, DMAB e Ninhydrin-Schiff, para análise histoquímica das células secretoras. A extração de DNA foi realizada pelo método não-fenólico e proteinase K. A hipótese de relacionamento filogenético foi recuperada utilizando-se o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) e a região do gene nuclear do espaçador transcrito interno 1 (ITS-1), amplificadas por PCR com *primers* específicos. Na epiderme da região anterior e da região pré-faríngea de ambas espécies desembocam células com secreções protéicas e glicoprotéicas, além de células com glicoconjugados neutros em *Geoplana* sp. e células com glicosaminoglicanas em *G. ladislavii*. O bordo glandular de *Geoplana* sp. é conspicuo, constituído por três tipos de células secretoras: eritrófilas com secreção protéica, cianófilas com secreção glicoprotéica e xantófilas com secreção protéica. *Geoplana ladislavii* apresenta o bordo glandular pouco conspicuo, constituído por células eritrófilas com secreção protéica e cianófilas com glicosaminoglicanas. Ambas apresentam faringe cilíndrica, com glândulas cianófilas, eritrófilas e xantófilas/eritrófilas, além de um quarto tipo (células cianófilas com secreção protéica) em *G. ladislavii*. O tipo de secreção produzido pelas células cianófilas e xantófilas e/ou eritrófilas das glândulas faríngeas se diferencia nas duas morfoespécies, apresentando proteína básica ou glicoproteína. A vesícula prostática é tubular com porção ental bifurcada, sendo intrabulbar em *Geoplana* sp. e extrabulbar

em *G. ladislavii*. Ambas apresentam secreção protéica desembocando na vesícula prostática. A papila penial é oblíqua, projetada ventralmente a partir do teto e da parede anterior do átrio masculino, nas quais desembocam células com secreção protéica, glicoprotéica e com glicosaminoglicanas. *Geoplana ladislavii* se diferencia de *Geoplana* sp. por apresentar grande quantidade de células cianófilas desembocando próximo à inserção ventral da papila penial. Quanto ao átrio feminino, *G. ladislavii* apresenta secreções protéicas, enquanto *Geoplana* sp., secreções glicoprotéicas. Em relação às glândulas da casca, ambas as espécies possuem células eritrófilas, com secreção glicoproteica em *G. ladislavii* e secreção proteica em *Geoplana* sp. As análises moleculares indicam que *Geoplana* sp. representa um grupo taxonômico próximo de *Geoplana ladislavii*, mas independente desta. Assim, as análises morfológicas e moleculares indicam que *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* são espécies distintas.

According to its original description, the type-specimens of *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 are characterized by having a green-colored dorsum. When redescribed, specimens with greenish-brown color were also considered members of this species. In several forest formations in Rio Grande do Sul, specimens with brown or greenish-brown dorsum have been registered occurring sympatrically with specimens of *Geoplana ladislavii* Graff, 1899, both in forest and gardened areas with several degrees of human impact. In this study, morphological and molecular analyses of both morphospecies were conducted in order to verify if they belong or not to the same species. The specimens analyzed were collected in areas of mixed ombrophilous forest, seasonal semideciduous forest and seasonal deciduous forest, as well as from gardened areas from several municipalities in southern Brazil. The identification was conducted initially by analysis of external morphology, observing shape and size of the body, color pattern, eyes distribution and position of the mouth and the gonopore. After histological processing, the internal morphology was analyzed in body fragments corresponding to the anterior, pre-pharyngeal, pharyngeal and copulatory apparatus regions. Two specimens of each morphospecies were submitted to reactions of Alcian Blue-PAS, bromophenol blue, DMAB and Ninhydrin-Schiff for histochemical analyses of the secretory cells. The DNA extraction was conducted by the non-phenolic method and proteinase K. The hypothesis of phylogenetic relationship was recovered using the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) and the region of the nuclear gene of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1), amplified by PCR with specific primers. Glands with protein and glycoprotein secretions open through the epidermis of anterior and pre-pharyngeal regions of both morphospecies, as well as glands secreting neutral mucopolysaccharides in *Geoplana* sp. and glycosaminoglycans in *G. ladislavii*. *Geoplana* sp. has a conspicuous glandular border consisting of three types of secretory cells: erythrophil with protein, cyanophil with glycoprotein and xanthophil with proteic secretions. *G. ladislavii* has a less conspicuous glandular border constituting of erythrophil glands with protein and cyanophil glands with glycosaminoglycan secretions. Both morphospecies have a cylindrical pharynx with cyanophil, erythrophil and xanthophil/erythrophil glands, as well as a fourth type (cyanophil cells with protein secretion) in *G. ladislavii*. The secretion type from cyanophil and xanthophil and/or erythrophil cells in pharyngeal glands is different between the two morphospecies, showing basic protein or glycoprotein. The prostatic vesicle is tubular with a forked ental portion, being intrabulbar in *Geoplana* sp. and extrabulbar in *G. ladislavii*. Both morphospecies show glands with proteic secretion opening into the prostatic vesicle. The penis papilla is oblique, projecting ventrally from the roof and anterior wall of the

male atrium and having cells with protein, glycoprotein and glycosaminoglycan secretions. *G. ladislavii* is differentiated from *Geoplana* sp. by having a large amount of cyanophil cells ending close to the ventral insertion of the penis papilla. In the female atrium, *G. ladislavii* has proteic secretions while *Geoplana* sp. has glycoproteic secretions. Both morphospecies have shell glands with erythrophil cells, constituting glycoproteic secretions in *G. ladislavii* and proteic secretions in *Geoplana* sp. Molecular analyses indicate that *Geoplana* sp. constitutes a taxonomic group close to *Geoplana ladislavii*, but independent from it. Thus, morphological and molecular analyses indicate that *Geoplana* sp. and *G. ladislavii* are distinct species.

A presente dissertação intitulada “*Diferenciação de duas espécies crípticas de planárias terrestres do gênero Geoplana ocorrentes em diferentes formações florestais do Sul do Brasil*” é apresentada na forma de artigos científicos, conforme as normas da Revista Zoologia.

O primeiro capítulo aborda a diferenciação de duas espécies crípticas de planárias terrestres, redescrivendo a espécie *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 e descrevendo *Geoplana* sp. No segundo capítulo, descrevem-se aspectos histológicos e histoquímicos das células secretoras de ambas as espécies.

7. INTRODUÇÃO

7.1. Apresentação do tema

7.1.1. Classificação dos Tricladida

Até recentemente, os tricladidos eram classificados, com base em caracteres morfológicos, em quatro infraordens, Maricola, Terricola, Paludicola e Cavernicola, sendo que as planárias terrestres integram a infraordem Terricola (Ogren *et al.*, 1997). No entanto, com base em estudos filogenéticos utilizando dados moleculares, Carranza *et al.* (1998) verificaram que os Paludicola constituem um grupo parafilético, uma vez que um dos grupos integrantes dos Paludicola (Dugesidae) tem um ancestral comum mais recente compartilhado com os Terricola. Assim, esses autores propuseram um novo clado (Continenticola) integrado pelos táxons Dugesidae, Planariidae, Dendrocoelidae e Terricola Sluys *et al.* (1999) propôs a classificação mais recente dos tricladidos, que contém três subordens (Maricola, Cavernicola e Continenticola). A subordem Continenticola inclui duas superfamílias: (1) Planarioidea, contendo as famílias Planariidae, Dendrocoelidae e Kenkiidae e (2) Geoplanoidea, composta pelas famílias Dugesidae e Geoplanidae.

Assim, atualmente, todas as planárias terrestres integram a família Geoplanidae, que passou a englobar as três famílias propostas por Graff (1899) (Geoplanidae, Rhynchodemidae e Bipaliidae) e divide-se em quatro subfamílias: Geoplaninae, Rhynchodeminae, Bipaliinae e Microplaninae (Sluys *et al.*, 2009). Estudos filogenéticos utilizando dados moleculares dos Geoplaninae sugerem que a subfamília seja monofilética, porém, o monofiletismo da subfamília ainda não foi testado (Carranza *et al.* 1998, Baguña *et al.*, 2001, Álvarez-Presas *et al.* 2008). Recentemente, Grau (2010) investigou as relações filogenéticas entre os gêneros de Geoplaninae, com base em dados morfológicos, sustentando o monofiletismo da subfamília. No entanto, diversos gêneros precisam ser revisados, com a inclusão de vários táxons representantes de regiões não exploradas, devendo ser associados caracteres morfológicos e moleculares. Essas informações são importantes para o entendimento da evolução morfológica dos tricladidos (Grau, 2010).

7.1.2. A subfamília Geoplaninae e o gênero *Geoplana*.

A subfamília Geoplaninae apresenta grande riqueza de espécies, cerca de 250, na região Neotropical (Winsor, 1998a, Seitenfus & Leal-Zanchet, 2004). Essa subfamília é composta por 17 gêneros (Ogren *et al.*, 1997; Seitenfus & Leal-Zanchet, 2004, Carbayo, 2010).

O gênero *Geoplana* Stimpson, 1857 possui cerca de 110 espécies descritas, sendo o mais numeroso da subfamília Geoplaninae. Os representantes desse grupo caracterizam-se basicamente por apresentarem corpo alongado, sola rastejadora com um terço ou mais da largura do corpo, musculatura longitudinal cutânea forte, musculatura longitudinal mesenquimática fraca ou ausente, testículos dorsais, papila penial ocupando o átrio masculino e ovoviteloductos desembocando dorsalmente no átrio feminino (Froehlich, 1955, Ogren & Kawakatsu, 1990).

E. M. Froehlich (1955a), ao estudar espécies brasileiras do gênero *Geoplana* Stimpson, 1857, propôs a subdivisão em seis grupos (A, B, C, D, E e F). As espécies foram agrupadas a partir de caracteres da morfologia externa e interna, tais como, forma e dimensões corpóreas, distribuição dos olhos e aspectos morfológicos dos aparelhos masculino e feminino. O grupo “B”, representado por 11 espécies, compreende vermes grandes, largos e chatos, com comprimento máximo de 160 mm e largura máxima de 20 mm, ambos em reptação. Esses vermes possuem olhos dorsais, papila penial ocupando a maior parte do átrio masculino e vagina e ovoviteloducto glandular comum encurvados para o dorso e para frente. As espécies pertencentes a esse grupo são: *Geoplana argus* Graff, 1899, *G. braunsi* Graff, 1899, *G. carinata* Riester, 1938, *G. divae* Marcus, 1951, *G. duca* Marcus, 1951, *G. itatiayana* Schirch, 1929, *G. ladislavii* Graff, 1899, *G. notocelis* Bresslau, 1930, *G. fryi* Graff, 1899 e provavelmente *G. arpi* Schirch, 1929 e *G. blaseri* Schirch, 1929. Posteriormente, C. G. Froehlich (1967) denominou o grupo de “*G. applanata*” e incluiu, adicionalmente, sete espécies registradas no Peru e três na Colômbia.

De acordo com Amaral *et al.* (2012) o grupo “*G. applanata*” pode ser subdividido em dois outros grupos. O primeiro, chamado “grupo *Geoplana ladislavii*”, inclui espécies de aproximadamente 50 mm de comprimento máximo quando maduras, enquanto as espécies que atingem 100 mm ou mais de comprimento quando maduras foram incluídas no “grupo *Geoplana assu*”. O grupo *Geoplana ladislavii* é composto pelas seguintes espécies: *G. argus*, *G. aymara* Du Bois-Reymond Marcus, 1951, *G. burmeisteri* Schultze & Müller, 1857, *G. carrierei* Graff, 1897, *G. dictyonota* Riester, 1938, *G. itatiayana* Schirch, 1929, *G. ladislavii* Graff, 1899, *G. leucophryna* Marcus, 1951, *G. marmorata* Schultze & Müller, 1857, *G.*

notocelis, *G. notophthalma* Riester, 1938, e *G. quichua* Du Bois-Reymond Marcus, 1951.

7.1.3. Ocorrência de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 no sul do Brasil.

Geoplana ladislavii foi descrita por Graff (1899) com base em espécimes de dorso verde e ventre amarelado coletados no município de Taquara, Rio Grande do Sul. Porém, Froehlich (1959), ao redescrever a espécie considerou que espécimes de dorso marrom ou marrom-esverdeado, coletados na mesma localidade, seriam da mesma espécie por apresentarem tamanho, forma corpórea e a anatomia dos órgãos internos semelhantes.

Atualmente, a distribuição conhecida de *G. ladislavii* abrange os estados de Santa Catarina (Froehlich 1959) e Rio Grande do Sul (Leal-Zanchet & Baptista 2009). Esta espécie tem sido registrada em áreas de floresta ombrófila mista e densa (Graff 1899; Carbayo *et al.* 2002; Fick *et al.* 2006; Baptista *et al.* 2006; Leal-Zanchet & Baptista 2009), floresta estacional decidual (Castro & Leal-Zanchet 2005) e floresta estacional semidecidual (Antunes *et al.* 2008).

Em diversas formações florestais do Rio Grande do Sul, têm sido coletados espécimes de *Geoplana* de dorso marrom, ou marrom-esverdeado com os bordos mais claros em relação ao restante do dorso, formato do corpo alongado e foliáceo e olhos dorsais com halos na região mediana do dorso. Em princípio, esses organismos têm sido considerados como pertencentes a uma morfoespécie distinta das espécies formalmente descritas (*Geoplana* sp.). Essa morfoespécie tem sido registrada em simpatria com espécimes de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899, tanto em áreas de mata quanto em áreas ajardinadas com diversos graus de antropização. A forma corpórea e diversos aspectos da anatomia interna são semelhantes nessas duas morfoespécies. Porém, essa coloração é comum entre espécies de planárias terrestres, dificultando, assim, sua determinação taxonômica com base em análises morfológicas.

7.2. Justificativa

Ao redescrever a espécie *Geoplana ladislavii*, Froehlich (1959) considerou que espécimes de coloração marrom esverdeada ou marrom, encontrados frequentemente em simpatria, seriam da mesma espécie em razão da grande semelhança de caracteres morfológicos. No entanto, análises morfológicas preliminares no Laboratório de Histologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos

(UNISINOS), indicaram que os espécimes marrons ou marrons esverdeados e os espécimes verdes representam provavelmente espécies distintas. Apesar do grande número de espécies de planárias terrestres registradas para o país, pouco é conhecido sobre variações inter- e intrapopulacionais. No século XIX e no início do século XX, muitas espécies foram descritas com base em um único exemplar, ou de espécimes ocorrentes em apenas uma localidade. Dessa forma, o conhecimento das variações interpopulacionais ainda é incipiente, dificultando a determinação de espécimes quando procedentes de localidades distintas da localidade-tipo (Leal-Zanchet & Matos, 2011).

Análises moleculares na identificação de espécies crípticas estão sendo adicionadas à taxonomia clássica, a fim de minimizar as determinações taxonômicas inadequadas (Jinbo *et al.*, 2011). As análises morfológicas comparativas, com espécimes procedentes de diferentes populações, associadas a análises moleculares, auxiliarão na redefinição de caracteres de importância taxonômica, contribuindo para determinações mais acuradas nos diferentes níveis taxonômicos.

7.3. Objetivos

7.3.1. Objetivo Geral

Determinar o status taxonômico de duas morfoespécies simpátricas de *Geoplana* (*Geoplana ladislavii* e *Geoplana* sp.), analisando comparativamente indivíduos de populações de diversas procedências.

7.3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a divergência genética de cada espécie de *Geoplana*, utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) e a região nuclear do Espaçador interno transcrito (ITS-1) e, com base nestes genes, propor uma hipótese de relacionamento filogenético e a definição taxonômica de ambas as espécies;
- Analisar variações inter - e intrapopulacionais de espécimes de cada espécie;
- Realizar a descrição formal dos táxons analisados com base em caracteres morfológicos e moleculares do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) e da região nuclear do Espaçador interno transcrito (ITS1).

8. CAPÍTULO I

Nova espécie de planária terrestre do gênero *Geoplana* Stimpson, 1857 (Platyhelminthes: Tricladida: Continenticola: Geoplanoidea) e redescrição de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899

Silvana Vargas do Amaral^{1,3}, Ana Maria Leal-Zanchet^{1,2,4} & Victor Hugo Valiati^{2,3}

¹Instituto de Pesquisas de Planárias, ²Laboratório de Biologia Molecular, ³Programa de Pós-Graduação em Biologia
Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
CEP 93022-000 São Leopoldo, RS, Brasil.

⁴Autor para correspondência: zanchet@unisinis.br

Resumo

De acordo com a descrição original, os espécimes de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 caracterizam-se por apresentar dorso de coloração verde. Ao ser redescrita, indivíduos de coloração marrom-esverdeado foram considerados como representantes dessa espécie. Em formações florestais do sul do Brasil, verifica-se a ocorrência de espécimes com ambos os tipos de coloração, os quais têm sido considerados, *a priori*, como espécies distintas, respectivamente, *Geoplana ladislavii* e *Geoplana* sp. No presente estudo, realizaram-se análises morfológicas e moleculares das duas espécies visando à determinação taxonômica das duas espécies. Os exemplares de ambas espécies apresentam vários aspectos da morfologia externa e da interna semelhantes, mas diferenciam-se em determinados detalhes. *Geoplana ladislavii* possui dorso verde e ventre amarelado, enquanto *Geoplana* sp., dorso marrom com bordos claros, extremidade anterior marrom-escuro e ventre marrom-claro. Ambas possuem olhos marginais na extremidade anterior, tornando-se dorsais no restante do dorso, porém, *Geoplana* sp. apresenta um maior número de fileiras longitudinais de olhos do que *G. ladislavii*. Quanto à morfologia interna, *Geoplana ladislavii* se diferencia de *Geoplana* sp. por apresentar bordo glandular pouco conspícuo, formado por apenas dois tipos de células secretoras – xantófilas e cianófilas, enquanto em *Geoplana* sp. o mesmo é conspícuo, formado por três tipos de células secretoras – xantófilas, eritrófilas e cianófilas. Ambas as espécies se assemelham quanto ao tipo de faringe, mas diferem na altura do epitélio de revestimento do esôfago e na extensão do mesmo. O átrio masculino é ocupado por uma papila penial projetada oblíquamente a partir do dorso do átrio masculino, diferenciando-se na posição da vesícula prostática bifurcada, intrabulbar em *Geoplana* sp. e extrabulbar em *Geoplana ladislavii*. Apesar da semelhança de vários caracteres morfológicos, ambas diferenciam-se, basicamente quanto à coloração do corpo, disposição dos olhos, localização da vesícula prostática e tipos de células secretoras, sendo consideradas espécies distintas. Adicionalmente, *Geoplana* sp. apresenta um conjunto de características único que a diferencia das demais espécies descritas para o gênero, representando uma nova espécie para a ciência. As análises moleculares indicam que *Geoplana* sp. é um grupo taxonômico próximo de *Geoplana ladislavii*, mas, independente desta. Ambas as análises indicam que *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* são espécies distintas.

Palavras-chave: taxonomia, espécies crípticas, análises moleculares.

Introdução

A espécie *Geoplana ladislavii* foi descrita por Graff, em 1899 com base em caracteres anatômicos de espécimes coletados na cidade de Taquara, Rio Grande do Sul. Os espécimes analisados por Graff apresentavam dorso de cor verde e ventre amarelado. Porém, Froehlich (1959) ao redescrever a espécie, com base em material coletado em Blumenau, SC e em Taquara, RS, considerou que espécimes de dorso marrom ou marrom-esverdeado, coletados na mesma localidade, pertenceriam à mesma espécie por apresentarem forma e dimensões corpóreas e a anatomia dos órgãos semelhantes. Em diversas formações florestais do sul do Brasil foi registrada a ocorrência de *Geoplana ladislavii* em simpatria com espécimes de dorso marrom ou marrom-esverdeado, tanto em áreas de mata quanto em áreas ajardinadas. Análises preliminares das células secretoras de vários espécimes mostraram diferenças que sugeriram que os animais fossem de duas espécies diferentes.

No presente estudo foram analisados exemplares de dorso verde para a redescrição de *Geoplana ladislavii* e exemplares de *Geoplana* sp., de dorso marrom, para a descrição formal da espécie, com base em análises morfológicas, moleculares e histoquímicas.

Material e Métodos

Procedência dos espécimes

Os exemplares estudados são procedentes de áreas de floresta ombrófila mista da Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA/SFP) localizada no distrito do Rincão dos Kroeff, Rio Grande do Sul (RS), entre as coordenadas 29°23' e 29°27' S e 50°23' e 50°25' W e do Parque Nacional dos Aparados da Serra (29° 05' e 29° 15' S e 50°00' e 50° 15'W), áreas de floresta estacional semidecidual; no campus da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, localizado em São Leopoldo a 29°47'31" S e 51°09'07" W, áreas de floresta estacional decidual; em Santa Maria (29°43' e 29°44' S – 53°42' e 53°44' W) no distrito de São Valentin, bem como áreas ajardinadas de diversos municípios do Rio Grande do Sul.

Análises morfológicas

A análise da morfologia externa consistiu em observar o padrão de coloração, forma do corpo, comprimento e largura dos espécimes, em reptação e em repouso, bem como após fixação, distância da boca e do gonóporo em relação à extremidade

anterior e distribuição dos olhos. Cortes histológicos de 6 µm de espessura foram confeccionados da região anterior, região pré-faríngea, região da faringe e do aparelho copulador e corados com Hematoxilina/eosina ou com os tricrômicos de Azan/Heidenhain, Masson/Goldner e Mallory/Cason (Romeis 1989). Reconstruções da faringe e do aparelho copulador foram realizadas com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio. Microfotografias foram feitas com auxílio de microscópio óptico Axiophot. A relação espessura da musculatura cutânea: altura do corpo (índice mc:h), foi calculada a partir de cortes transversais da região pré-faríngea, conforme o método de Froehlich (1955a). A classificação das células secretoras foi realizada com base na coloração das secreções com Mallory/Cason, utilizando-se as denominações cianófilo (a), eritrófilo (a) e xantófilo (a) para as células cuja secreção cora-se, respectivamente, em verde, vermelho e laranja.

Análises moleculares

Dois espécimes de *Geoplana ladislavii* e dois de *Geoplana* sp. tiveram um pequeno fragmento posterior do corpo seccionado – em vida – para realização da análise molecular. Esse fragmento foi fixado e armazenado em etanol 100%. A parte restante foi morta em água fervente e fixada com formalina neutra ou SUSa (Sublimat-Saure) (Romeis, 1989).

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA total foi isolado utilizando-se *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA). Após a extração o DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com solução 0,02% de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. Após a extração do DNA foi realizada a amplificação de um segmento do gene da COI pela técnica de PCR com os *primers* BART 5'-ATGACDGCSCATGGTTTAATAATGAT-3' e COIR 5'-CCWGTYARMCCHCCWAYAGTAAA-3', (Álvarez-Presas, et al., 2011). As condições para amplificação foram: Para um volume de 25 µL, 15,75 µL de água ultra pura, 2,5 µL de Tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 pmol/µL de cada *primer*, 0,4 pmol/µL de DNTPs, 1 U/µL de Taq Polimerase e 1 µL de DNA, com o seguinte programa para amplificação por PCR: 94 °C por 60 s; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 s, anelamento a 45 °C por 40 s e extensão a 72 °C por 90 s; extensão final a 72 °C por 7 min. Após a amplificação foi realizada a quantificação utilizando-se um marcador de peso molecular aplicado em gel de agarose 1%, a 80 V por 45 minutos. Também, foi amplificado a região do Espaçador Interno Transcrito (ITS-1) utilizando-se dos *primers*

9F 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3' e ITSr 5'-TGCGTTCAAATTGTCAATGATC-3' (Baguñà et al., 1999). As condições para amplificação foram: Para o volume de 25 µL, 17,8 µL de água ultra pura, 10x Tampão, 10 mM dNTP, 20 pMol de cada *primer* e 50 mM MgCl₂, 1 U de Taq Polimerase e 100 ng/µL de DNA. As condições de PCR foram: 94 °C por 60 s; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 s, anelamento a 45 °C por 40 s e extensão a 72 °C por 90 s; extensão final a 72 °C por 7 min. Após a amplificação foi feita a quantificação utilizando-se um marcador de peso molecular aplicado em gel de agarose 1%, a 100 V por 45 minutos.

A purificação foi realizada com as amostras amplificadas pela PCR sendo cortadas direto do gel de agarose realizando a limpeza do material utilizando-se do protocolo comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). Os sequenciamentos foram realizados pela empresa *Advancing through Genomics MACROGEN* (Coréia do Sul), sendo sequenciadas em ambas as direções (senso e anti-senso), no sequenciador automático 3730XL DNA sequencer.

A qualidade do sequenciamento foi avaliada pelo “software” Chromas 2.33 (<http://www.technelysium.com.au>) e sua identidade confirmada utilizando-se o BlastN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) (NCBI site). O alinhamento das sequências foi feito no ClustalW, ferramenta incorporada no “software” MEGA 5.0 (Tamura, *et al.*, 2011) e a edição visual realizada no programa BioEdit 5.0.9. (Hall, 1999).

Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de máxima verossimilhança (ML), usando PHYML 2.4.4 (Guindon & Gascuel, 2003) e inferência Bayesiana da filogenia (BI) utilizando MrBayes 3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2005). Para o gene da COI o critério AIC (Akaike, 1974) indicou o modelo GTR+G (Rodríguez *et al.*, 1990) como o melhor ajuste do modelo de evolução das sequências (-LNL = 3410.0132, AIC = 6836.5957), distribuição gama (1,4147) e proporção de sítios invariáveis 0,4998. Para o gene ITS-1 o critério AIC (Akaike, 1974) indicou o modelo HKY+G (Hasegawa *et al.*, 1985) como o melhor ajuste do modelo de evolução das sequências (-LNL = 2701.6965, AIC = 5413.3931), distribuição gama (0,6061). Para o BI um milhão de gerações usando duas corridas independentes foram submetidos os conjuntos de dados. As Cadeias de Markov foram amostradas para ambos os genes em intervalos de 1000 gerações e a árvore consenso foi estimada após remover as primeiras 250 árvores salvas como *burn-in* para evitar incluir amostras antes de chegar

a estacionariedade. O grau de confiabilidade das árvores filogenéticas obtidas testadas através da reamostragem por *bootstrap* (Felsenstein, 1985) para a máxima verossimilhança e probabilidades à posteriori na inferência Bayesiana.

Resultados

PARTE TAXONÔMICA

Família Geoplanidae Stimpson, 1857

Subfamília Geoplaninae Stimpson, 1857

Geoplana Stimpson, 1857

Geoplana sp.

Geoplana ladislavii: Froehlich, 1959

Geoplana carrierei: Froehlich, 1959

Geoplana carrierei: Hauser & Maurmann, 1959

Geoplana sp. 2: Leal-Zanchet & Carbayo, 2000

Geoplana sp. 10: Baptista *et. al.*, 2006

Geoplanidae 2: Fick *et al.*, 2006

Geoplana sp. 1: Antunes *et. al.*, 2008

Geoplana sp. 1: Fonseca *et. al.*, 2009

MATERIAL-TIPO

Holótipo: IPP nº 1332: V. Dias, *leg.* 29. IX. 2002: Santa Maria – extremidade anterior: cortes transversais em 26 lâminas; região anterior ao nível dos ovários em três fragmentos: cortes sagitais em 65 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 12 lâminas; faringe: cortes sagitais em 28 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 50 lâminas.

Parátipos: **Parátipos:** IPP nº 64: A. M. Leal-Zanchet, *leg.* 21. II. 1997: Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – faringe: cortes transversais em 30 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 17 lâminas. IPP nº 333a: L. S. Teixeira, *leg.* 10. VII. 1998: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – região anterior no nível dos ovários em 47 lâminas. IPP nº 352: A. M. Leal-Zanchet, *leg.* 31. VII. 1998: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – região anterior no nível dos ovários: cortes horizontais em 19 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 23 lâminas; faringe: cortes sagitais em 28 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 36 lâminas. IPP nº 966: M. Cardoso, *leg.* 22. XII. 1999: Cambará do Sul –

região pré-faríngea: cortes transversais em 22 lâminas; faringe: cortes sagitais em 24 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 37 lâminas. IPP nº 1200: A. L. Seitenfus, *leg.* 13. I. 2001: Santa Maria – região pré-faríngea: cortes transversais em 8 lâminas; faringe: cortes sagitais em 33 lâminas; aparelho copulador: cortes transversais em 14 lâminas. IPP nº 2094: P. K. Boll, *leg.* 14. V. 2011: Ivoti – aparelho copulador: cortes sagitais em 39 lâminas; IPP nº 2145: M. H. Sasamori, *leg.* 24. VII. 2011: Taquara - conservado em álcool 70%; IPP nº 2146: S. V. Amaral, *leg.* 24. VII. 2011: Taquara – aparelho copulador: cortes sagitais em 37 lâminas. IPP nº 2193: D. J. Endres, *leg.* 13. IX. 2011: Novo Hamburgo – extremidade anterior: cortes transversais em 45 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 24 lâminas; faringe: cortes sagitais em 39 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 38 lâminas; IPP nº 2219 P. K. Boll, *leg.* 10.X.2011: Ivoti – extremidade anterior: cortes transversais em 32 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 7 lâminas; faringe: cortes sagitais em 45 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 43 lâminas. IPP nº 2229: W. H. Santos, *leg.*31. X. 2011 – aparelho copulador: cortes horizontais em 36 lâminas; IPP nº 2243: S. V. Amaral, *leg.* 20.XI.2012: Portão – extremidade anterior: cortes transversais em 50 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 50 lâminas; faringe: cortes sagitais em 75 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 150 lâminas; IPP nº 2259: P. K. Boll, *leg.* 21. XII. 2012 – extremidade anterior: cortes transversais em 50 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 50 lâminas; faringe: cortes sagitais em 75 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 150 lâminas; IPP nº 2281: L. H. L. Negrete, *leg.*08. IX. 2011: Santa Maria – faringe e aparelho copulador: cortes sagitais em 27 lâminas. EMF/TaqA: Taquara – região anterior no nível dos ovários: cortes sagitais em 19 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 12 lâminas; faringe: cortes sagitais em 17 lâminas; aparelho copulador: cortes horizontais em 18 lâminas.

Localidade-tipo: Município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS) em áreas de Floresta Estacional Decidual.

Distribuição: Rio Grande do Sul (Cambará do Sul, São Leopoldo, São Francisco de Paula, Taquara, Novo Hamburgo, Santa Maria, São Sebastião do Caí, Portão, Ivoti, Montenegro).

Diagnose: corpo alongado e foliáceo; dorso marrom-escuro com os bordos marrom-claros; olhos marginais e dorsais com halos, mais numerosos no terço médio do corpo; índice mc:h, 6% – 8%; bordo glandular com três tipos de células secretoras; faringe cilíndrica; esôfago curto; os testículos mais anteriores estão a 6 mm da extremidade

anterior; os mais posteriores, ocorrem aproximadamente no mesmo nível transversal da inserção ventral da faringe, situando-se aproximadamente a 27 mm da extremidade anterior; ovários posteriores aos testículos mais anteriores; espermiductos desembocam lateralmente na parte ental da vesícula prostática; vesícula prostática intrabulbar, tubular, com porção ental bifurcada; átrio masculino sem pregas; papila penial oblíqua, projetando-se do teto do átrio masculino e assimétrica, com inserção dorsal deslocada posteriormente; ovoviteloductos emergem dorsalmente dos ovários e dirigem-se para o dorso posteriormente ao canal do gonóporo; ovoviteloducto glandular comum curto; vagina curta; átrio feminino de forma oval, revestido por epitélio de aparência estratificada; comprimento do átrio feminino 71% do átrio masculino.

MORFOLOGIA EXTERNA

Animais de corpo alongado e foliáceo. Em reptação, o maior exemplar atingiu 65 mm de comprimento e 10 mm de largura. Após fixação, o comprimento máximo atingido foi de 56 mm de comprimento (Tabela I).

Os exemplares de *Geoplana* sp. apresentam dorso variando de cinza a marrom-escuro com os bordos marrom claros. A extremidade anterior, cerca de dois milímetros iniciais do corpo no parátipo IPP 2145 (6% do comprimento do corpo) apresenta a mesma tonalidade dos bordos (Figuras 1, 2). O ventre é acinzentado ou marrom-claro, com a região anterior e bordos do corpo escuros, da mesma tonalidade do dorso. Sob o estereomicroscópio, a cor de fundo do dorso é marrom-claro, coberto por pigmentação marrom escura. Nos animais fixados com formalina neutra, a coloração do dorso torna-se marrom claro ou bege e a do ventre, bege (Figura 3). Os olhos são marginais e uniseriais contornando a extremidade anterior do corpo aproximadamente nos três milímetros iniciais (aproximadamente 17% do comprimento do corpo, no parátipo IPP 2145). Posteriormente, olhos maiores, pluriseriais com halos claros, visíveis a olho nu, invadem o dorso, concentrando-se no terço médio do corpo, ocupando largura máxima de três milímetros de cada lado do corpo (75% da largura do corpo, no parátipo IPP 2145) (Figuras 4,5). Ocorrem em toda a extensão do corpo sendo mais numerosos no terço médio do corpo. No ventre dos animais é possível visualizar, por transparência, nos primeiros 5 mm do corpo, os olhos do dorso (Figura 6).



Figuras 1-3: Espécimes de *Geoplana* sp. (1) Parátipo IPP 2145, em repouso, em vista dorsal, (2) Parátipo IPP 2193 em reptação, mostrando detalhe do ventre, (3) Parátipo IPP 2145 após fixação, em vista ventral. Barra: 10 mm.

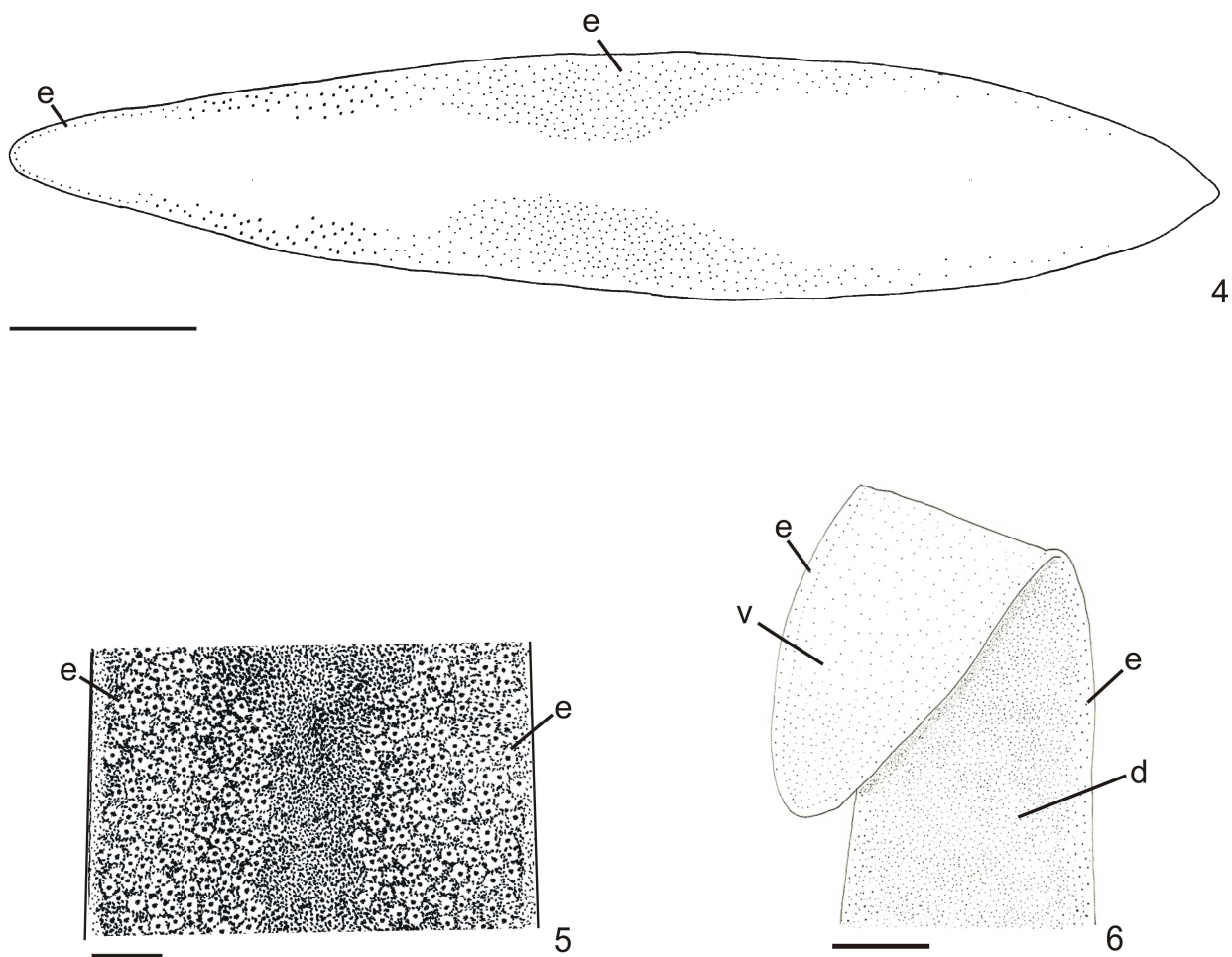


Figura 4 - 6: (4-5): Representação esquemática da morfologia externa e distribuição dos olhos, em vista dorsal; (5) distribuição dos olhos na região mediana dorsal; (6): representação do dorso e do ventre do parátipo IPP 2145. (e): olhos, (d) dorso, (v) ventre. Barras: (4): 10 mm; (5-6): 1 mm

Tabela I: Medidas dos espécimes de *Geoplana* sp. (em mm). -: medida não realizada; *: após fixação; DG: distância do gonóporo até a extremidade anterior; DM: distância da boca até a extremidade anterior; DMG: distância entre a boca e o gonóporo; DPVP: distância entre a vesícula prostática e a bolsa faríngea. Os números indicados entre parênteses representam a posição em relação ao comprimento do corpo. EMF/TaqA: exemplar cedido por E. M. Froehlich.

	Holótipo 1332	Parátipo 64	Parátipo 333a	Parátipo 352	Parátipo 966	Parátipo 1200	Parátipo 2094	Parátipo 2145	Parátipo 2146	Parátipo 2193	Parátipo 2219	Parátipo 2229	Parátipo 2243	Parátipo 2259	Parátipo 2281	EMF/ TaqA
Comprimento em reptação	55	50	70	76	61	60	52	35	42	55	50	70	65	65	27	-
Largura em reptação	6	4	4	5	4	4	5	5	6	5	5	5	5	5	2	-
Comprimento em repouso	30	30	24	30	32	40	30	28	30	27	32	40	30	33	13	-
Largura em repouso	9	7	10	11	7	6	8	7	9	11	20	11	10	11	5	-
Comprimento*	46	38	40	48	43	45	56	35	40	42	49	64	52	55	22	37
Largura*	7	7	6	7,5	7	6,5	6	4	6	7	7	7	6	8	4	4
DM*	30 (65)	-	28 (70)	31 (64,5)	27,5 (64)	25,5 (56)	30 (53)	22 (63)	29 (72,5)	32 (76)	31 (63)	44 (69)	37 (71)	37 (67)	15 (68)	23,5 (63,5)
DG*	39 (85)	32 (67)	33 (82)	38 (79)	34,5 (80)	34 (75,5)	36 (64)	27 (77)	34 (85)	39 (93)	37 (76)	54 (84)	45 (86,5)	47 (85)	20 (90)	30 (81)
DMG*	9	-	5	7	7	8,5	6	5	5	7	6	10	8	10	5	6,5
DPVP*	3	-	1,9	1,6	2,2	2,1	-	-	-	1,4	1,6	-	-	-	0,3	2,0
Sola rastejadora	98	-	-	98	-	98	-	-	-	95	97	-	-	98	-	99
Ovários	15 (32)	-	7 (14)	11 (23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6 (16)
Testículos anteriores	6 (13)	-	6 (15)	10 (21)	-	-	-	-	-	-	7 (14)	-	-	-	-	-
Testículos posteriores	27 (58)	-	-	-	14 (32,5)	23 (51)	-	-	-	18,5 (44)	14 (28)	-	-	-	-	15 (40)
Vesícula prostática (porção bifurcada)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,16	0,1	-	0,1	0,1	0,09	0,09	-	0,1	0,1	0,1
Vesícula prostática (porção ímpar)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	-	0,5	0,3	0,3	0,2	-	0,6	0,3	0,2
Papila penial	2,0	1,7	1,8	1,8	1,5	2,4	2,2	-	1,7	1,8	1,4	2,3	-	1,9	1,3	1,4
Átrio masculino	1,8	1,5	1,8	2,2	1,9	2,6	1,8	-	1,7	1,7	1,7	2,5	-	1,9	1,1	2
Átrio feminino	1,3	1,2	1,4	1,1	1,5	1,6	1,4	-	1,3	1,2	1,3	1,1	-	1,7	0,9	1
Vagina	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	-	0,2	0,1	0,3	0,4	-	0,2	0,2	0,3
Ovoviteloducto glandular comum	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1

MORFOLOGIA INTERNA

Extremidade anterior:

Fossetas sensoriais presentes nos 7 mm iniciais do corpo (15 % do comprimento do corpo no holótipo). A profundidade varia entre 31 e 43 μm . As fossetas ocorrem em intervalos de aproximadamente 18 μm , próximo à extremidade anterior (Figura 7), tornando-se mais espaçadas em direção posterior. Os olhos contornam a extremidade anterior, com diâmetro de 18 a 50 μm . A musculatura cutânea apresenta disposição semelhante à da região pré-faríngea, porém menor espessura, próximo à extremidade anterior. A epiderme dorsal apresenta células secretoras rabditógenas e células cianófilas com secreção fina (0,5 μm). Na epiderme ventral desembocam dois tipos de células secretoras cianófilas: com secreção amorfa e de granulação fina (1 μm) respectivamente. Próximo à extremidade anterior, as células secretoras são menos abundantes. Após 0,6 mm da extremidade anterior do corpo, células eritrófilas, xantófilas e cianófilas se acumulam nas margens do corpo para formar o bordo glandular.

Epiderme e musculatura da região pré-faríngea (Tabela II):

Sola rastejadora ciliada ocupando de 94% a 99% da largura do corpo. O índice mc:h varia de 6% a 8% (Tabela II). A musculatura cutânea é composta por três camadas: uma subepitelial com fibras circulares seguida por uma camada diagonal com fibras oblíquas entrecruzadas e uma camada de feixes de fibras longitudinais. A musculatura cutânea dorsal é mais desenvolvida do que a ventral.

A epiderme dorsal recebe a desembocadura de numerosas células rabditógenas com secreção xantófila, dois tipos de células cianófilas (secreção amorfa e secreção granular fina, respectivamente, além de células eritrófilas com secreção granular fina menos abundante). A epiderme ventral apresenta apenas células rabditógenas com secreção xantófila, abundantes células cianófilas com secreção amorfa e poucas células cianófilas de secreção granular fina (Figuras 8, 9). Os corpos celulares dessas glândulas estão localizados no mesênquima.

O bordo glandular (Figuras 8, 9) é constituído por três tipos de células secretoras: numerosas células eritrófilas e xantófilas de secreção granular grossa (2 μm) e células cianófilas com secreção granular fina menos abundantes.

A musculatura mesenquimática é constituída pelas camadas suprintestinal, subintestinal e subneural de fibras transversais. As camadas transversais supra- e subintestinais apresentam 3-5 fibras em cada feixe, enquanto a camada transversal

subneural apresenta feixes com 2-3 fibras. As fibras dorsoventrais formam feixes com 3-4 fibras.

Tabela II: Espessura (em μm) da musculatura cutânea à altura da região pré-faríngea e índice mc: h em relação a largura do corpo de *Geoplana* sp.. EMF/TaqA: exemplar cedido por E. M. Froehlich.

	Holótipo 1332	Parátipo 352	Parátipo 1200	Parátipo 2219	EMF/ TaqA
Dorsal circular	2	3	4	5	3
Dorsal oblíqua	3	2	5	5	4
Dorsal longitudinal	33	26	33	26	22
Dorsal total	35	39	40	33	29
Ventral circular	3	2	10	3	5
Ventral oblíqua	6	3	10	5	5
Ventral longitudinal	27	32	22	21	28
Ventral total	33	37	40	29	40
Altura do corpo	1157	1000	1283	975	1138
Mc:h (%)	6	8	6	6	6

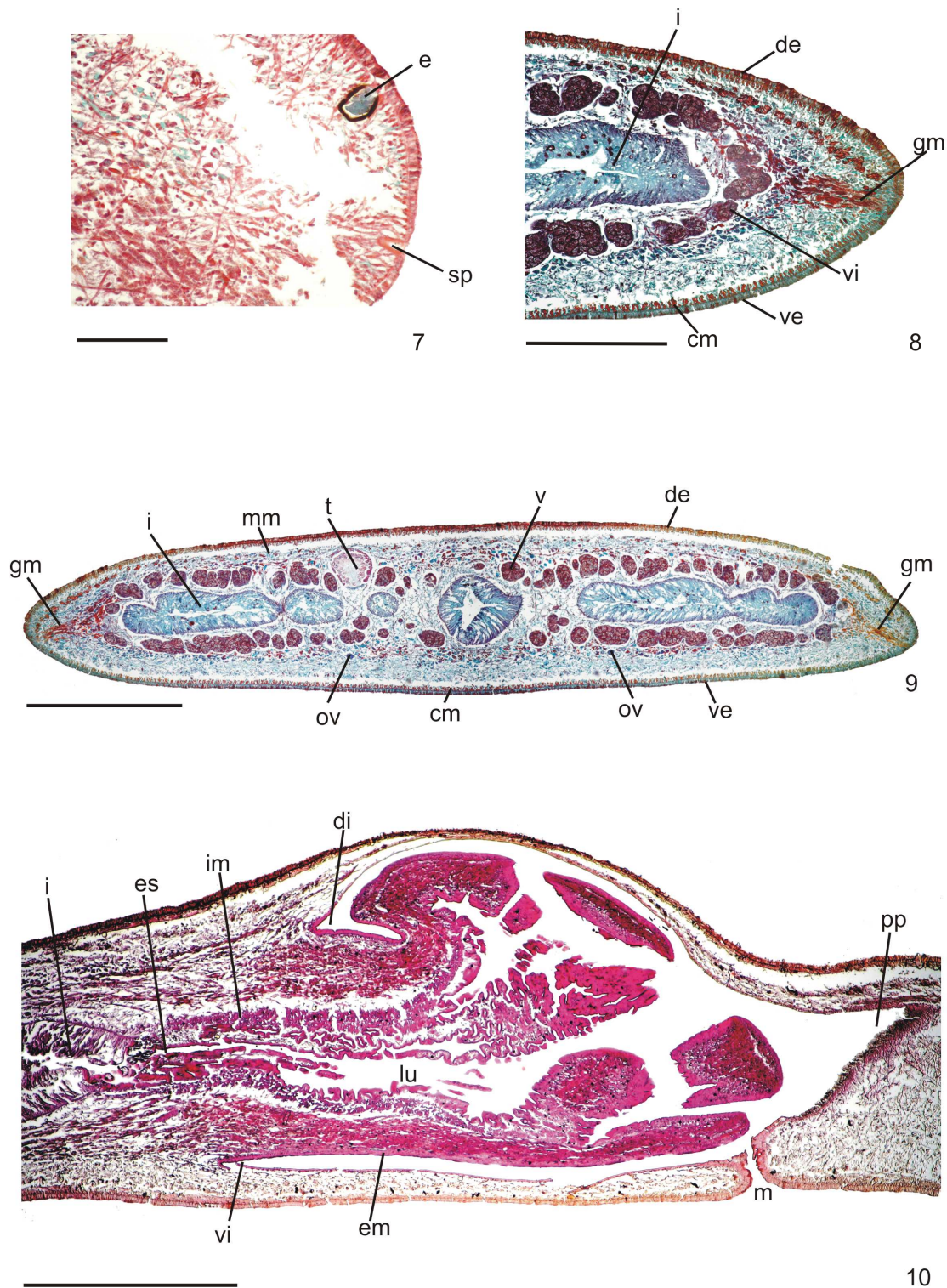
Faringe (Figura 10):

A faringe é do tipo cilíndrica, com bordo livre pregueado, inserção dorsal pouco deslocada posteriormente e esôfago curto. A boca situa-se no terço posterior da bolsa faríngea.

A faringe é revestida por epitélio cúbico ciliado com núcleos aprofundados, recebendo a desembocadura de células secretoras cianófilas com secreção amorfa, células eritrófilas e xantófilas, ambas de granulação fina. Os corpos celulares das células eritrófilas e xantófilas desembocam no bordo livre da faringe.

A musculatura interna da faringe (60 μm de espessura) é constituída por uma camada de fibras circulares e fibras longitudinais entremeadas. A musculatura externa (40 μm de espessura) apresenta uma camada subepitelial de fibras longitudinais e uma camada subjacente de fibras circulares.

O esôfago é revestido por epitélio cúbico ciliado (4 μm de espessura) e apresenta espessa camada de fibras circulares e longitudinais intercaladas (62 μm de espessura). O comprimento do esôfago em relação à faringe é de 16% no holótipo.



Figuras 7-10: *Geoplana* sp.: (7) região anterior em corte transversal; (8-9) região pré-faríngea em corte transversal (holótipo); (10) faringe em corte sagital (holótipo). (cm) musculatura cutânea, (de) epiderme dorsal, (di) inserção dorsal, (e) olhos, (em) musculatura externa, (es) esôfago, (gm) margem glandular, (i) intestino, (im) musculatura interna, (lu) lúmen faríngeal, (m) boca, (mm) musculatura mesenquimática, (pp) bolsa faríngea, (sp) fossetas sensoriais, (t) testículo, (v) vitelários, (ve) musculatura cutânea ventral, (vi) inserção ventral. Barra: 1 mm

Tabela III: Medidas da faringe de espécimes-tipo de *Geoplana* sp., em mm. EMF/TaqA: exemplar cedido por E. M. Froehlich.

	Holótipo 1332	Parátipo 966	Parátipo 1200	Parátipo 2219	EMF/ TaqA
Comprimento da faringe	2,4	2,5	2,3	2,6	1,6
Comprimento da bolsa faríngea	2,9	2,7	4,0	3,9	2,9
Distância entre a boca e a inserção ventral	2,3	2,6	2,2	1,9	1,9
Distância do deslocamento da inserção dorsal	0,3	0,8	1,1	0,6	0,3
Comprimento do esôfago	0,4	0,5	0,9	0,3	0,6

Aparelho Reprodutor (Tabela I, Figuras 11, 18)

Os testículos são pré-faringeais, arranjados dorsalmente em uma ou duas fileiras de cada lado do corpo. Os mais anteriores surgem a cerca de 6 mm da extremidade anterior do corpo (13 % do comprimento do corpo no holótipo). Os testículos mais posteriores ocorrem aproximadamente no mesmo nível transversal da inserção ventral da faringe, situando-se aproximadamente a 27 mm da extremidade anterior (58% do comprimento do corpo). Dúctulos dorso-ventrais comunicam os testículos aos espermi ductos, que desembocam lateralmente na parte ental da vesícula prostática. A vesícula prostática é intrabulbar e tubular. Sua porção ental é voltada para o ventre e bifurcada. O ducto ejaculatório progride encurvando-se para o ventre, desembocando próximo à inserção ventral, anterior, da papila penial assimétrica. A papila é uma projeção oblíqua das paredes dorsal e anterior do átrio masculino, apresentando uma inserção anterior ventral e uma posterior dorsal. O átrio masculino, amplo, é ocupado pela papila penial (Figuras 13-16).

Os espermi ductos são revestidos por epitélio cúbico simples (3 µm de altura) com uma camada subjacente de fibras circulares (6 µm de espessura). Vesícula prostática revestida por epitélio cilíndrico ciliado (25 µm), recebendo a desembocadura de células de secreção granular mista, (porção periférica cianófila e central eritrófila), além de células eritrófilas de granulação grossa, ambas com corpos celulares no mesênquima, próximos à vesícula. A muscularis da vesícula (35 µm) apresenta uma

camada espessa de fibras circulares com escassas fibras longitudinais entremeadas (Figura 17).

O ducto ejacatório é revestido por epitélio cilíndrico ciliado (22 μm de altura), recebendo a desembocadura de células cianófilas com secreção amorfa. A muscularis (8 μm de espessura) é composta principalmente de fibras circulares. A papila penial é revestida por epitélio cilíndrico alto (aproximadamente 32 μm de altura), recebendo a desembocadura de abundantes células secretoras eritrófilas de granulação fina, cianófilas de secreção amorfa e células xantófilas de secreção grossa. Os corpos celulares das células cianófilas e eritrófilas ocorrem externamente à capa muscular. As glândulas xantófilas apresentam corpos celulares subepiteliais. O átrio masculino é revestido por epitélio cilíndrico alto, não ciliado, tornando-se ventralmente ciliado próximo ao gonóporo. Quatro tipos de células secretoras, com corpos celulares externos à capa muscular desembocam através do epitélio de revestimento do átrio masculino: células cianófilas de secreção amorfa, células xantófilas de granulação grossa, células eritrófilas de granulação fina e células eritrófilas de granulação grossa. A muscularis do átrio masculino (87 μm de espessura) é constituída por uma camada de fibras circulares e escassas fibras longitudinais subjacentes.

Os ovários são posteriores aos testículos mais anteriores, situando-se a uma distância média de 15 mm da extremidade anterior (aproximadamente 33% do comprimento do corpo). Os ovários medem 0,4 mm no sentido ântero-posterior e 0,2 mm no eixo lateral (Figura 18). Os ovoviteloductos emergem dorsalmente do terço médio dos ovários e dirigem-se posteriormente dorsalmente à placa nervosa. Após o canal do gonóporo direcionam-se para o dorso e para o plano mediano, unindo-se e formando um curto ovoviteloducto glandular comum. Este desemboca na extremidade posterior do átrio feminino, através de uma vagina curta (Figuras 13, 14). O Átrio feminino apresenta forma oval, correspondendo a 71% do átrio masculino.

Os ovoviteloductos são revestidos por epitélio cilíndrico ciliado (10 μm de espessura). Na porção ectal dos ovoviteloductos e no ovoviteloducto glandular comum há a desembocadura de glândulas da casca com secreção eritrófila de granulação grossa. A muscularis dos ovoviteloductos (13 μm de espessura) é composta por fibras circulares e longitudinais intercaladas. O ovoviteloducto glandular comum é revestido por epitélio cilíndrico (2 μm de espessura), com muscularis composta por fibras circulares (5 μm).

O átrio feminino é revestido por epitélio de aparência estratificada (130 μm de espessura). A muscularis é constituída por uma camada subepitelial de fibras circulares e uma camada subjacente de fibras longitudinais, parcialmente entremeadas. A musculatura própria é pouco desenvolvida. Abundantes células

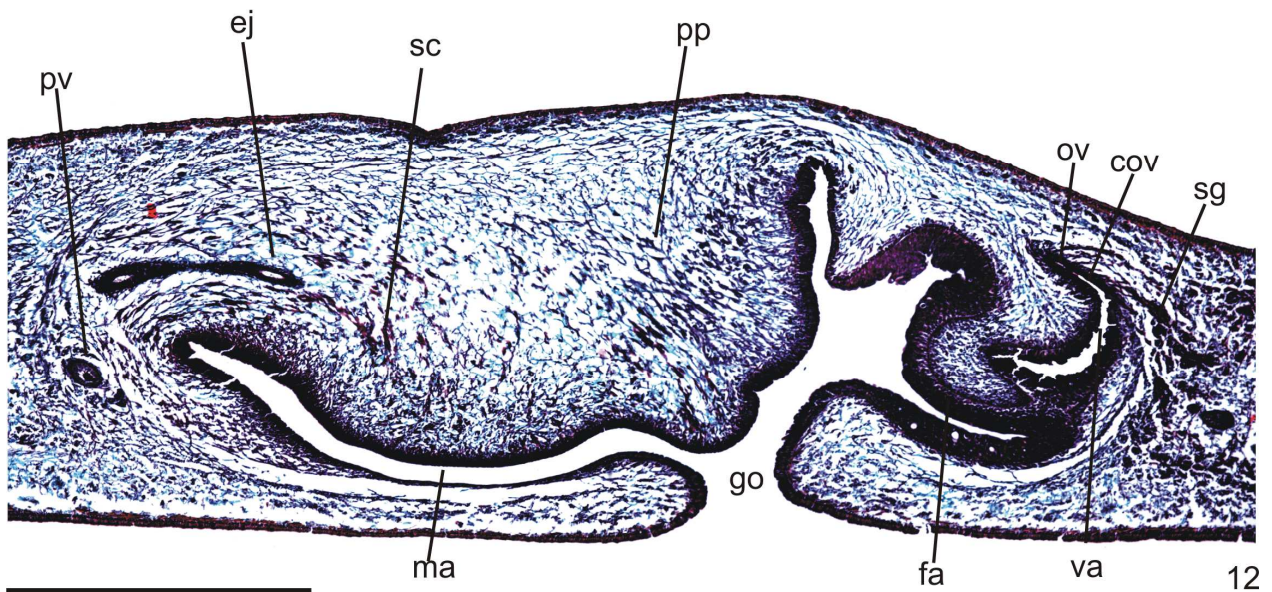
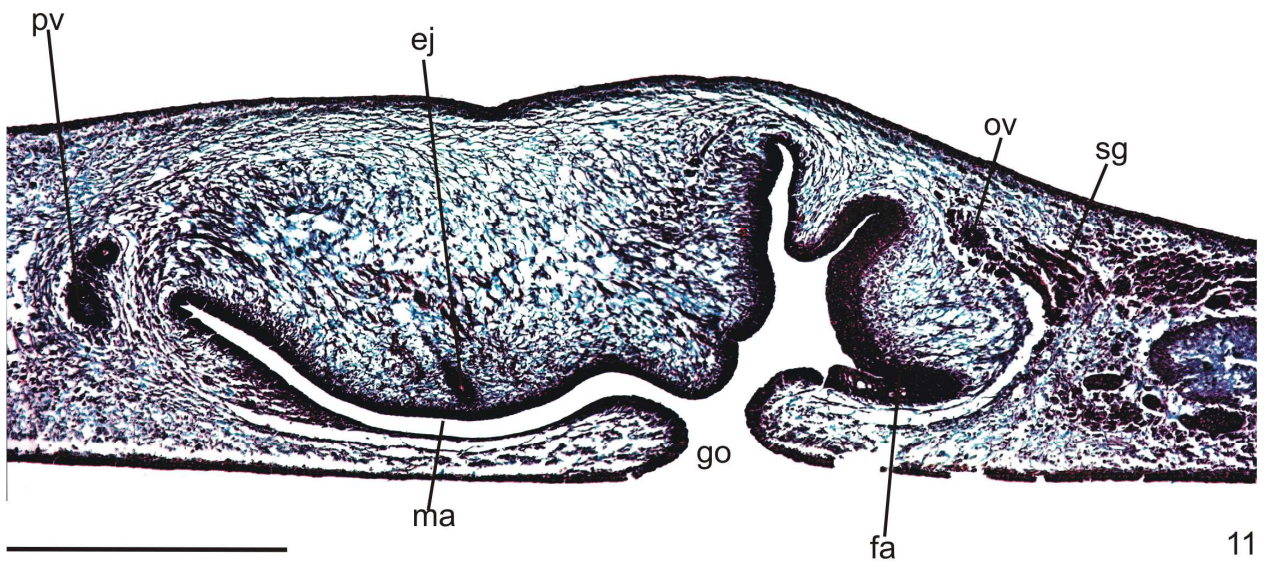
eritrófilas e cianófilas de granulação fina e células xantófilas de granulação grossa desembocam no átrio feminino. Os corpos celulares das células xantófilas são subepiteliais e as células eritrófilas e cianófilas apresentam corpos celulares externos e próximos à capa muscular comum. O holótipo apresenta lacunas com secreção cianófila amorfa ou secreção xantófila grossa no epitélio do átrio feminino. O comprimento do átrio feminino corresponde a 71% do comprimento do átrio masculino no holótipo.

A vagina é revestida por epitélio de aparência estratificada (65 μm de altura), recebendo a desembocadura de células eritrófilas de granulação fina e cianófilas com secreção amorfa.

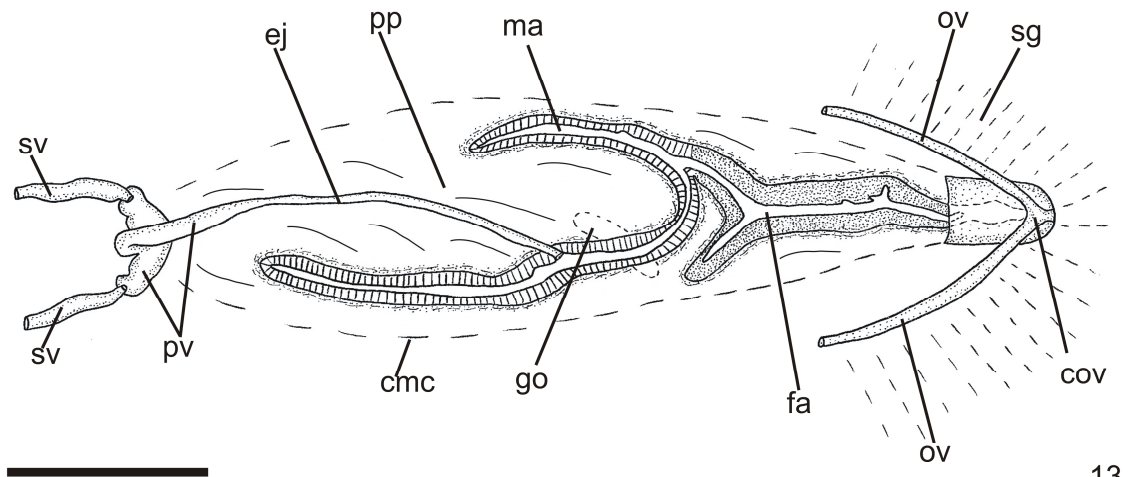
O canal do gonóporo é aproximadamente vertical no plano sagital. Os átrios masculino e feminino apresentam comunicação ampla. O gonóporo é revestido por epitélio cilíndrico ciliado com desembocadura de numerosas células rhabditógenas, células cianófilas com secreção amorfa, células eritrófilas de granulação fina e células xantófilas de granulação grossa. A muscularis é composta por uma camada de fibras circulares e algumas fibras longitudinais intercaladas.

A capa muscular comum é pouco espessa, composta por uma fina camada de fibras longitudinais, circulares intercaladas e escassas fibras diagonais.

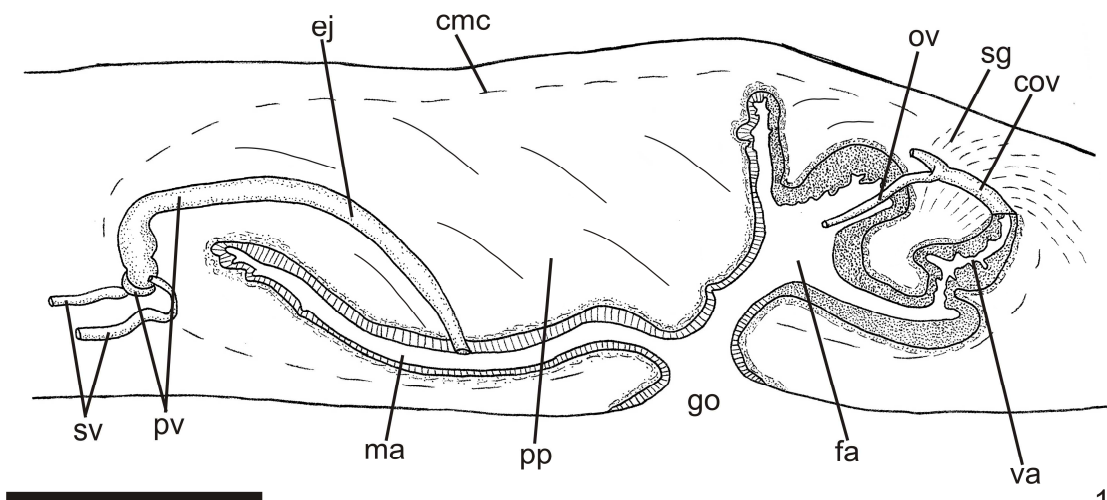
Os vitelários são encontrados entre os ramos intestinais, desembocando nos ovoviteloductos.



Figuras 11-12. *Geoplana* sp.: Aparelho copulador em corte sagital (holótipo); (cov) ovoviteloducto glandular comum (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) oviducto, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sc) células secretoras, (sg) glândulas da casca (va) vagina. Barra: 1 mm.

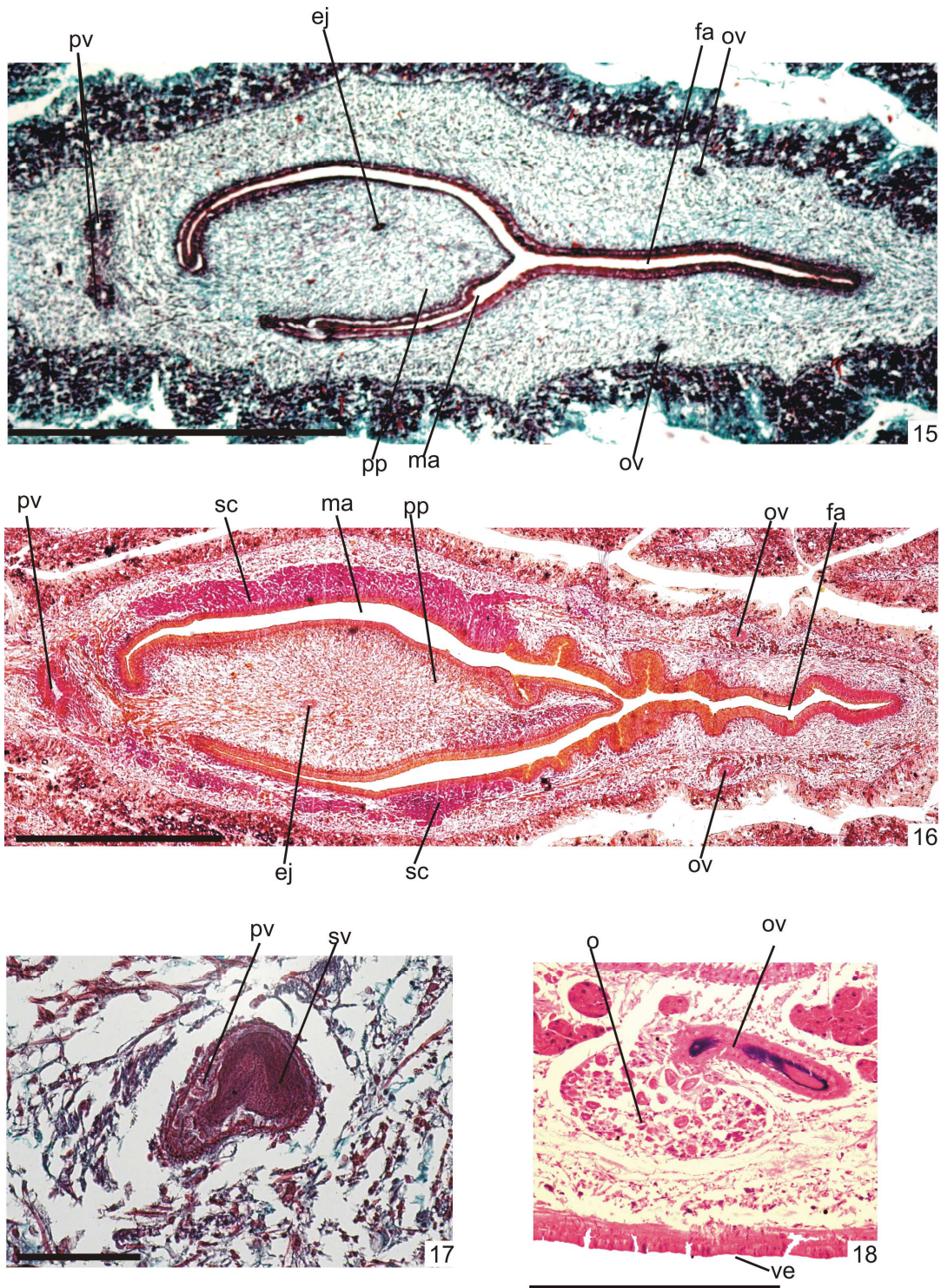


13



14

Figuras 13-14. *Geoplana* sp.: (13) Reconstrução do aparelho copulador do parátipo IPP 2229, a partir de cortes horizontais; (14) reconstrução do aparelho copulador do holótipo, a partir de cortes sagitais; (cmc) capa muscular, (cov) ovoviteloducto glandular comum, (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) ovoviteloductos, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sg) glândulas da casca, (sv) ducto eferente, (va) vagina. Barra: 1 mm.



Figuras 15-18. *Geoplana* sp.: (15) Aparelho copulador do parátipo IPP 296a em corte horizontal; (16) aparelho copulador do parátipo IPP 123c em corte horizontal; (17) abertura do ducto eferente na porção bifurcada da vesícula prostática em corte sagital (holótipo) (18) entrada do oviducto no ovário em corte sagital (holótipo); (de) epiderme dorsal, (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) oviducto, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sv) ducto eferente, (va) vagina. Barras: (15-16): 1 mm (17): 0,1 mm (18):0,5 mm.

Comentários:

Os exemplares IPP 64 e IPP 2281 apresentaram, em vida, coloração do dorso marrom muito escuro, podendo ser confundido com preto. Sob o estereomicroscópio, é possível visualizar a pigmentação marrom escura muito concentrada, fazendo com que a coloração do dorso torne-se mais escura. O parátipo IPP 966 apresenta o esôfago projetado posteriormente, ocorrendo internamente à faringe, devido à contração do espécime durante a fixação. O holótipo e os parátipos IPP 333a, IPP 352, IPP 966, IPP 2094, IPP 2229 e EMF/TaqA são animais maduros. Todos possuem testículos com espermatozoides e vitelários repletos de vitelócitos, além de glândulas da casca abundantes. O exemplar IPP 2281 possui poucas glândulas da casca. Os exemplares IPP 352 e IPP 333 procedentes da FLONA/SFP apresentam a papila penial cônica e vesícula prostática com uma porção extrabulbar. O exemplar IPP 2281 possui vesícula prostática totalmente intrabulbar, provavelmente em decorrência do seu grau de maturação.

PARTE TAXONÔMICA

Família Geoplanidae Stimpson, 1857

Subfamília Geoplaninae Stimpson, 1857

Geoplana Stimpson, 1857

Geoplana ladislavii Graff, 1899

Grünen *Geoplana* aus Rio Grande do Sul: Ijima, 1884

Geoplana ladislavii: Froehlich, 1959

Geoplana ladislavii: Leal-Zanchet & Carbayo, 2000

Geoplana ladislavii: Castro & Leal-Zanchet, 2005

Geoplana ladislavii: Baptista *et al.*, 2006

Geoplana ladislavii: Fick *et al.*, 2006

Geoplana ladislavii: Antunes *et al.*, 2008

Localidade-tipo: “Taguara do Mundo Nuovo, Prov. do Rio Grande do Sul” (Graff, 1899, p. 300). (Taguara, Rio Grande do Sul), Brazil.

Espécimes analisados: IPP nº 84: A. M. Leal-Zanchet, *leg.* 11.IV.1997: São Pedro da Serra – aparelho copulador: cortes horizontais em 21 lâminas. IPP nº 97: M. Cardoso, *leg.* 11. IV. 1997: Tupandi – região anterior no nível dos ovários: cortes sagitais em 16

lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 9 lâminas; faringe: cortes sagitais em 20 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 45 lâminas; IPP nº 105: G. Fiorentin, *leg.* 17. V. 97: Riozinho - região anterior no nível dos ovários: cortes horizontais em 20 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 35 lâminas; faringe: cortes sagitais em 56 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 50 lâminas; IPP nº 261: A. M. Leal-Zanchet, *leg.* 04. V. 1998: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – região pré-faríngea: cortes transversais em 26 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 153 lâminas; IPP nº 1051: I. A. Fick, *leg.* 23.VI.2000: Praia Grande, Santa Catarina – região anterior no nível dos ovários: cortes horizontais em 19 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 2 lâminas; faringe: cortes sagitais em 20 lâminas; aparelho copulador: cortes horizontais em 53 lâminas; IPP nº 1360: V. Dias, *leg.* 25. I. 2002: Três Barras, Santa Maria – região pré-faríngea: cortes transversais em 9 lâminas; faringe: cortes sagitais em 28 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 18 lâminas; IPP nº 1584: M. Santana, *leg.* 23. VIII.2003: Três Barras, Santa Maria – região pré-faríngea: cortes transversais em 6 lâminas; faringe: cortes sagitais em 21 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 9 lâminas. IPP nº 1729: C. M. Palacios, *leg.* 17.X.2004: São Francisco de Paula (Promata) - região pré-faríngea: cortes transversais em 23 lâminas; faringe: cortes sagitais em 48 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 48 lâminas. IPP nº 2110: J. A. L. Braccini, *leg.* 10.VI.2011: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – conservado em álcool 70%. IPP nº 2134: G. G. Iturralde, *leg.* 09.VI.2011: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – conservado em álcool 70%. IPP nº 2213: S. V. Amaral, *leg.* 09. X. 2011: São Leopoldo – extremidade anterior: cortes transversais em 50 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 154 lâminas; faringe: cortes sagitais em 235 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 228 lâminas. IPP nº 2237: S. V. Amaral, *leg.* 02. XI. 2011: Taquara – extremidade anterior: cortes transversais em 51 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 36 lâminas; faringe: cortes sagitais em 144 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 65 lâminas. IPP nº 2250: I. R. Hack, *leg.* 15. XI. 2011: Montenegro - extremidade anterior: cortes transversais em 36 lâminas; região pré-faríngea: cortes transversais em 17 lâminas; faringe: cortes sagitais em 58 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 49 lâminas; IPP nº 2268: P. K. Boll, *leg.* 21. IV. 2012: São Francisco de Paula (FLONA - São Francisco de Paula) – conservado em álcool 70%. IPP nº 2271: S. V. Amaral, *leg.* 08.VII.2012: Taquara - conservado em álcool 70%. IPP nº 2272: S. V. Amaral, *leg.* 08.VII.2012: Taquara – extremidade anterior: cortes transversais em 50 lâminas; região pré-faríngea: cortes

transversais em 50 lâminas; faringe: cortes sagitais em 75 lâminas; aparelho copulador: cortes sagitais em 150 lâminas.

Diagnose: Corpo alongado e foliáceo; em vida, dorso verde homogêneo com bordos mais claros; ventre amarelado; olhos marginais e dorsais; halos pouco nítidos concentrados no terço médio do corpo; índice mc:h 6% – 8%; bordo glandular com dois tipos de células secretoras; faringe cilíndrica; esôfago curto; os testículos mais anteriores surgem a 14 mm da extremidade anterior do corpo. Os testículos mais posteriores ocorrem até o nível da inserção dorsal da faringe, situando-se aproximadamente a 33 mm da extremidade anterior; ovários aproximadamente no mesmo nível transversal dos testículos mais anteriores; espermióduos desembocam lateralmente na parte ental da vesícula prostática; vesícula prostática extrabulbar, tubular, com porção final bifurcada; átrio masculino longo, sem pregas; papila penial oblíqua e assimétrica, com inserção dorsal deslocada posteriormente; ovoviteloductos emergem dorsalmente dos ovários e unem-se anteriormente ao gonópore; ovoviteloducto glandular comum curto; vagina curta; átrio feminino de forma oval, revestido por epitélio de aparência estratificada; comprimento do átrio feminino 56% o do átrio masculino.

MORFOLOGIA EXTERNA

Geoplana ladislavii Graff, 1899 apresenta corpo alongado e foliáceo (Figura 19). Em reptação, o maior exemplar atingiu 90 mm de comprimento e 9 mm de largura. Após fixação, o comprimento máximo atingido foi de 75 mm de comprimento (Tabela IV).

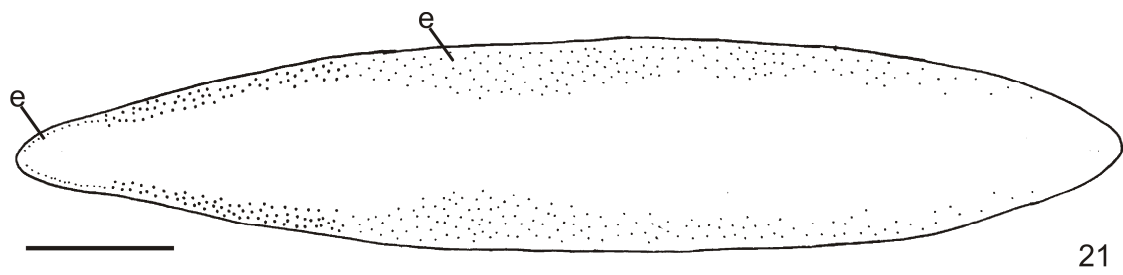
Os exemplares de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 apresentam dorso verde homogêneo com os bordos do corpo (cerca de 1 mm) mais claros e ventre amarelado. Sob o estereomicroscópio, a cor de fundo do dorso é verde-claro, coberto por pigmentação verde-escuro. Nos animais fixados com formalina neutra, a coloração do dorso torna-se desbotada, variando de verde-claro a bege e a do ventre, bege (Figuras 19, 20).

Os olhos são marginais e unisseriais até aproximadamente 2 milímetros de comprimento (cerca de 4% do comprimento do corpo, no exemplar IPP nº 2268). Nos exemplares imaturos, observa-se que os olhos contornam a extremidade anterior, enquanto nos espécimes maduros, há um espaçamento maior entre os primeiros olhos do que entre os seguintes (Figuras 24, 25). Posteriormente, olhos maiores, plurisseriais

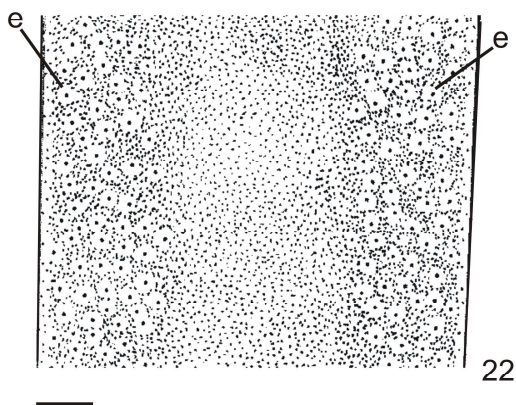
com halos pouco nítidos invadem o dorso, concentrando-se no terço médio do corpo, ocupando largura máxima de dois milímetros (28% da largura do corpo, no exemplar IPP nº 2268) de cada lado do corpo. Os olhos ocorrem em toda a extensão do corpo. No ventre dos animais é possível visualizar, por transparência, nos primeiros 5 mm do corpo, os olhos do dorso. (Figuras 21-23).



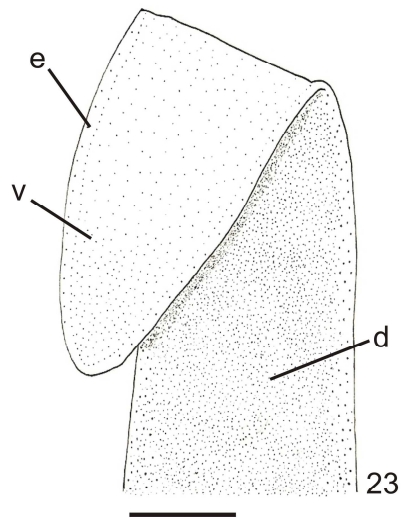
Figuras 19-20: Espécimes de *Geoplana ladislavii*. (19) Exemplar IPP 2268 em repouso, (20) Exemplar IPP 2213 em reptação mostrando detalhe do ventre. Barra: 10 mm.



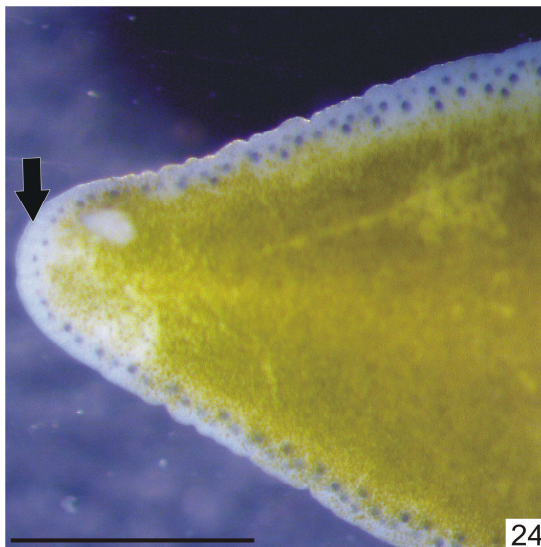
21



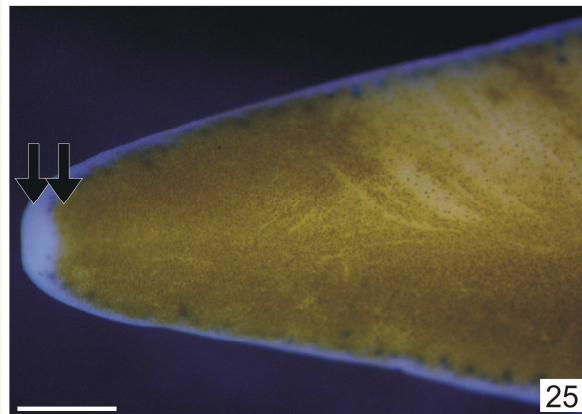
22



23



24



25

Figuras 21-25. *Geoplana ladislavii*: (21) Representação esquemática da morfologia externa e distribuição dos olhos do exemplar IPP 2268 em vista dorsal; (22) distribuição dos olhos na região mediana do corpo do espécime IPP 2268 em vista dorsal; (23) detalhe do ventre mostrando os olhos do exemplar IPP 2268; (24) detalhe da extremidade anterior do exemplar IPP 2271 de Portão, RS. A seta indica a extremidade anterior e a disposição dos olhos em um exemplar jovem. (25) detalhe da extremidade anterior do exemplar 2268. A seta dupla aponta o espaçamento entre os olhos mais anteriores de um exemplar maduro. (e) olhos, (d) dorso, (v) ventre. Barras: (21): 10 mm; (23-25): 1 mm.

Tabela IV: Medidas dos espécimes de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899 (em mm). -: medida não realizada; *: após fixação. Ex.: exemplar; DG: distância do gonópore até a extremidade anterior; DM: distância da boca até a extremidade anterior; DMG: distância entre a boca e o gonópore; DPVP: distância entre a vesícula prostática e a bolsa faríngea. Os números indicados entre parênteses representam a posição em relação ao comprimento do corpo.

	Ex. 84	Ex. 97	Ex. 105	Ex. 261	Ex. 1051	Ex. 1360	Ex. 1584	Ex. 1729	Ex. 2110	Ex. 2134	Ex. 2213	Ex. 2237	Ex. 2250	Ex. 2268	Ex. 2271	Ex. 2272
Comprimento em reptação	45	50	80	55	68	40	-	50	45	25	75	80	73	52	28	90
Largura em reptação	6	3	7	7	6	3	-	4	6	4	8	5	6	8	3	9
Comprimento em repouso	-	-	-	45	25	30	-	35	28	16	40	50	40	33	15	40
Largura em repouso	-	-	-	9	9	5	-	6	7	5	11	10	12	10	5	15
Comprimento*	43	30	60	54	62	34	-	43	44	24	57	53	56	50	18	75
Largura*	7	5	7	9	10	5	-	5	11,5	4	8	11	9	7	4	11
DM*	28 (65)	19 (63)	36 (60)	33 (61)	45 (62,5)	23 (68)	-	26 (60)	17 (38,5)	16 (64)	38 (67)	36 (68)	37 (66)	34 (68)	13 (72)	51 (68)
DG*	35 (81)	24 (80)	46 (77)	42 (78)	58 (80,5)	28 (82)	-	34 (79)	35,5 (80,5)	22 (88)	48 (84)	48 (90)	47 (84)	40 (80)	-	66 (88)
DMG*	7	5	10	9	13	5	-	8	-	6	10	12	10	6	-	-
DPVP*	1,1	0,5	2,5	2,2	3,7	0,6	-	0,7	-	-	-	4,0	2,6	-	-	-
Sola rastejadora	-	87,5	93	94,5	95	86	93	-	-	-	-	-	94	-	-	-
Ovários	-	7 (23)	14 (23)	-	15 (21)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testículos anteriores	-	8 (26,5)	15 (25)	-	12,5 (8)	-	-	-	-	-	-	-	14 (25)	-	-	-
Testículos posteriores	-	14 (46,5)	23 (38)	-	26 (41)	-	-	-	-	-	-	-	33 (59)	-	-	-
Vesícula prostática (porção bifurcada)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,2	0,2	0,2	-	-	0,3
Vesícula prostática (porção ímpar)	0,4	0,5	0,6	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	-	-	0,6	0,4	0,5	-	-	0,7
Papila penial	1,2	1,2	2,2	2,0	3,2	1,4	1,2	1,5	-	-	2,1	2,1	2,5	-	-	3,5
Átrio masculino	1,3	1,0	2,4	2,7	2,9	1,4	1,3	1,7	-	-	2,3	2,8	2,5	-	-	4,1
Átrio feminino	0,6	0,7	1,6	1,0	1,7	1,0	0,8	0,8	-	-	1,5	1,4	1,4	-	-	2,1
Vagina	0,1	0,09	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	-	-	0,4	0,4	0,3	-	-	0,4
Ovoviteloducto glandular comum	0,07	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	-	-	0,3	0,3	0,2	-	-	0,3

MORFOLOGIA INTERNA

Extremidade anterior:

Fossetas sensoriais presentes, localizadas no bordo ventral, ocorrendo nos 13 mm iniciais do corpo (23% do comprimento do corpo no exemplar IPP 2250). A profundidade varia entre 19 μm e 60 μm . As fossetas ocorrem em intervalos de aproximadamente 30 μm próximo à extremidade anterior (Figura 26), tornando-se espaçadas em direção posterior. Os olhos contornam a extremidade anterior, com diâmetro de 25 μm a 59 μm . A musculatura cutânea apresenta disposição semelhante a da região pré-faríngea, porém menos espessa próximo à extremidade anterior. A epiderme dorsal recebe a desembocadura de células rabditógenas, células xantófilas e cianófilas, ambas de granulação grossa (2 μm e 3 μm , respectivamente). Na epiderme ventral desembocam células rabditógenas, eritrófilas de granulação grossa (2 μm) e células cianófilas com secreção amorfa. Próximo à extremidade anterior, as células secretoras são menos abundantes. Após 1,2 mm da extremidade anterior do corpo, células eritrófilas, xantófilas e cianófilas se acumulam nas margens do corpo para formar o bordo glandular.

Epiderme e musculatura da região pré-faríngea (Tabela V):

Sola rastejadora ocupando de 86% a 95% da largura do corpo. O índice mc:h varia de 6% a 11% (Tabela V). A musculatura subepidérmica é composta por três camadas: uma subepitelial com fibras circulares seguida por uma camada diagonal com fibras oblíquas entrecruzadas e feixes de fibras longitudinais. A musculatura cutânea ventral é mais espessa do que a musculatura dorsal (Tabela V).

A epiderme dorsal recebe a desembocadura de numerosas células rabditógenas com secreção xantófila, células cianófilas com secreção amorfa, células eritrófilas com secreção granular grossa (3 μm) e células xantófilas com secreção granular fina (1 μm). A epiderme ventral recebe a desembocadura de células eritrófilas de granulação fina, células rabditógenas com secreção xantófila e células cianófilas com secreção amorfa, sendo estas últimas mais abundantes do que as demais (Figuras 27, 28).

Bordo glandular pouco conspícuo com dois tipos de células secretoras: abundantes células xantófilas de secreção granular grossa (2 μm) e escassas células cianófilas com secreção amorfa (Figura 27). A musculatura mesenquimática é constituída pelas camadas de fibras transversais, suprainestinal e subintestinal. Todas

as camadas apresentam aproximadamente 2-3 fibras por feixe. Poucas fibras oblíquas dorsais e fibras dorsoventrais formam feixes com 3-4 fibras.

Tabela V: Espessura (em μm) da musculatura cutânea à altura da região pré-faríngea e índice mc:h de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899.

	Exemplar 105	Exemplar 261	Exemplar 1051	Exemplar 1360	Exemplar 1584	Exemplar 2250
Dorsal circular	4	6	6	2	3	3
Dorsal oblíqua	3	8	5	5	4	6
Dorsal longitudinal	36	43	65	26	43	31
Dorsal total	45	57	73	37	53	49
Ventral circular	4	4	7	2	4	5
Ventral oblíqua	6	6	15	6	8	7
Ventral longitudinal	37	35	41	77	48	23
Ventral total	47	45	60	63	61	40
Altura do corpo	1486	1415	1570	937	1268	1270
Mc:h (%)	6	7	8	11	9	7

Faringe (Figura 29, tabela VI):

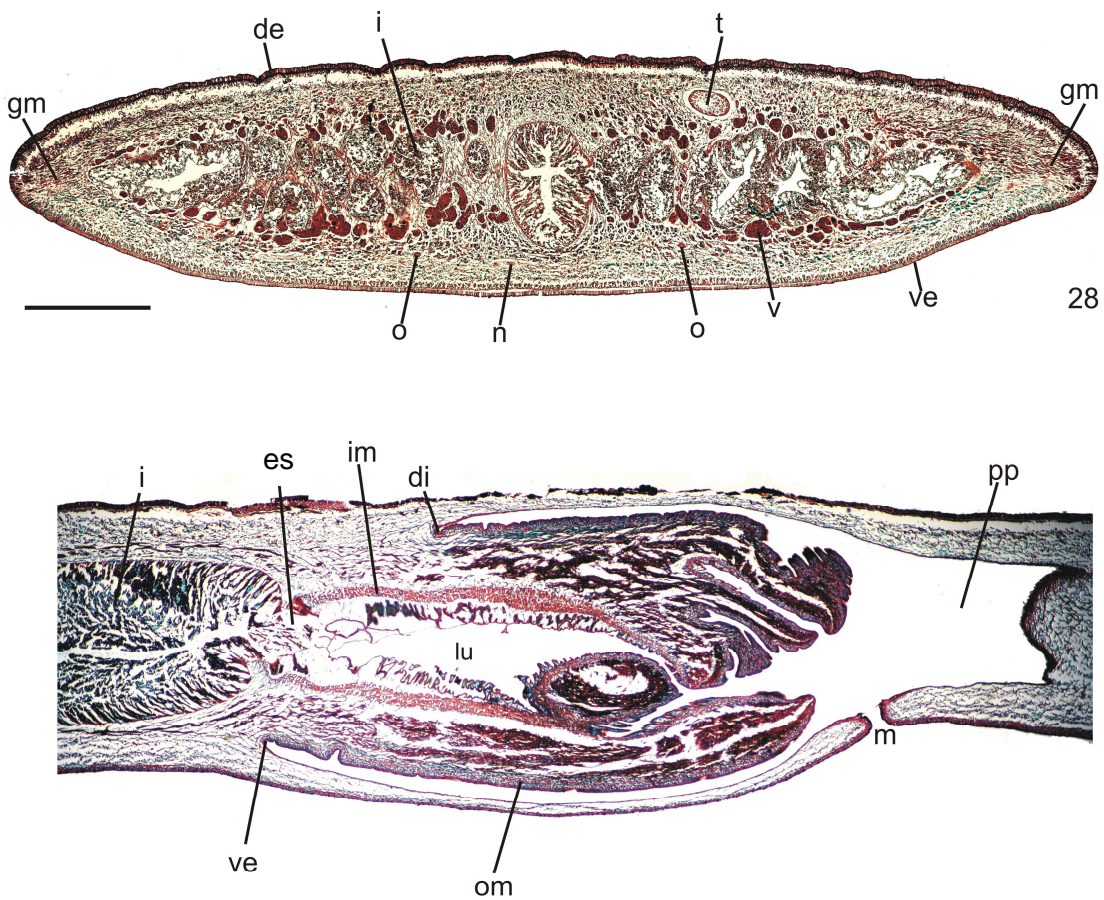
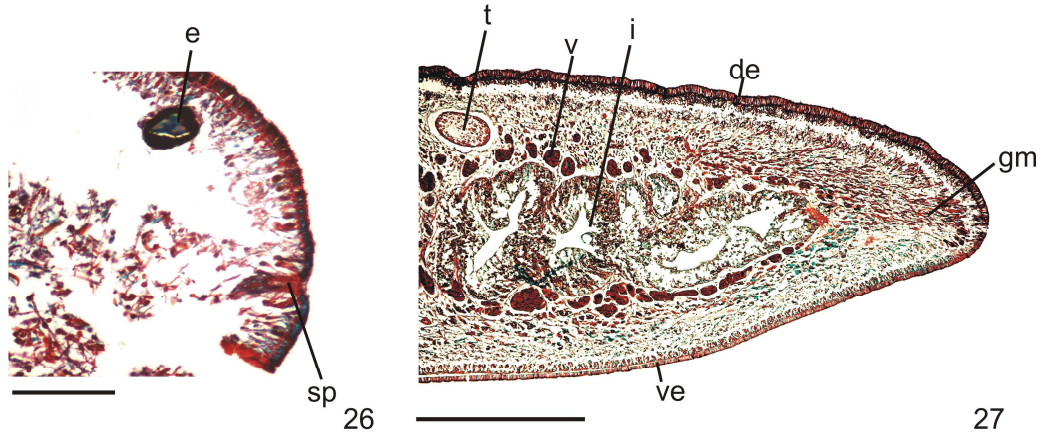
A faringe é do tipo cilíndrica, com bordo pregueado e inserção dorsal deslocada posteriormente (Tabela VI). A boca situa-se no terço posterior da bolsa faríngea.

A faringe é revestida por epitélio cúbico ciliado com núcleos aprofundados, recebendo a desembocadura de dois tipos de células secretoras cianófilas, sendo uma com secreção amorfa e outra com secreção granular fina (lilás) além de células eritrófilas de granulação fina e de células xantófilas, com secreção granular fina, situadas próximo ao epitélio externo. A desembocadura das células secretoras ocorre próximo ao epitélio externo da faringe. Os corpos celulares das células secretoras da faringe estão localizados no mesênquima, posteriormente e anteriormente à faringe.

A musculatura interna da faringe (105 μm de espessura no exemplar IPP 2250) é constituída por uma camada circular subepitelial intercalada com fibras longitudinais. Em direção ao ápice da faringe e ao intestino, a musculatura interna tem sua espessura reduzida. A musculatura externa (62 μm de espessura, no exemplar IPP

2250) é constituída por uma camada subepitelial de fibras longitudinais seguida de uma camada de fibras circulares com longitudinais intercaladas.

A comunicação da faringe com o intestino se dá através de um esôfago curto. Este é revestido por epitélio cúbico ciliado (18 μm de espessura no exemplar IPP 2250) (Tabela VI, Figura 29), sob o qual ocorre espessa camada de fibras musculares circulares intercaladas com fibras longitudinais (80 μm de espessura no exemplar IPP 2250). O comprimento do esôfago em relação ao comprimento da faringe varia de 2,5% a 5%.



29

Figuras 26-29: *Geoplana ladislavii*. (26) região anterior em corte transversal do exemplar IPP 2250; (27-28) região pré-faríngea em corte transversal do exemplar IPP 2237; (29) faringe do exemplar IPP 2250 em corte sagital (cm) musculatura cutânea, (de) epiderme dorsal, (di) inserção dorsal, (e) olho, (es) esôfago, (gm) margem glandular, (i) intestino, (im) musculatura interna, (lu) lúmen faríngeal, (m) boca, (mm) musculatura mesenquimática, (n) placa nervosa, (o) ovovitelo ductos, (om) outra musculatura, (pp) bolsa faríngea, (sp) fosseta sensorial, (t) testículos, (v) vitelários, (ve) musculatura cutânea ventral, (vi) inserção ventral. Barra: 1 mm.

Tabela VI: Medidas da faringe de espécimes-tipo de *Geoplana ladislavii* Graff, 1899, em mm.

	Exemplar 105	Exemplar 1360	Exemplar 1584	Exemplar 1729	Exemplar 2250
Comprimento da faringe	5	2,4	2,5	3,7	4
Comprimento da bolsa faríngea	7	4	4	4	6
Distância entre a boca e a inserção ventral	4	2,4	2	3	4
Deslocamento da inserção dorsal	0,3	0,5	1,6	0,5	1
Comprimento do esôfago	-	0,2	0,3	0,2	0,1

Aparelho Reprodutor (Tabela IV, Figuras 30-37)

Os testículos são pré-faríngeais, arranjados dorsalmente em uma ou duas fileiras de cada lado do corpo. Os mais anteriores surgem a 14 mm da extremidade anterior no exemplar IPP 2250 (25% do comprimento do corpo). Os testículos mais posteriores ocorrem até o nível da inserção dorsal da faringe, situando-se aproximadamente a 33 mm da extremidade anterior (59% do comprimento do corpo). Dúctulos dorso-ventrais comunicam os testículos aos espermiductos, que desembocam lateralmente na parte ental da vesícula prostática. A vesícula prostática é extrabulbar, tubular, com porção ental voltada para o ventre e bifurcada. Após penetrar a musculatura bulbar, a vesícula continua-se com o ducto ejaculatório, que atravessa a papila penial, desembocando no ápice da mesma, levemente excêntrico. A papila penial projeta-se ventralmente a partir da parede anterior e do teto do átrio masculino, sendo pouco oblíqua. O átrio masculino, sem pregas, é ocupado pela papila penial.

Os espermiductos são revestidos por epitélio cúbico (4 μm de altura no exemplar IPP 2250); sua muscularis é constituída por uma camada de fibras circulares e longitudinais entremeadas (5 μm de espessura). A vesícula prostática é revestida por epitélio cilíndrico ciliado (24 μm de altura), recebendo a desembocadura de células secretoras eritrófilas de granulação grossa (2 μm) e células cianófilas de secreção amorfa, ambas com corpos celulares no mesênquima, próximos à vesícula. A muscularis da vesícula (30 μm de espessura) é constituída por fibras circulares e longitudinais entremeadas (Figura 36).

O ducto ejaculatório é revestido por epitélio cilíndrico ciliado (19 μm de espessura), apresentando células cianófilas de granulação fina. A muscularis (6 μm de espessura) é composta por uma camada principalmente circular. A papila penial é revestida por epitélio cilíndrico alto (40 μm de espessura), recebendo a desembocadura de células eritrófilas de granulação fina e cianófilas com secreção amorfa, ambas com corpos celulares externos à capa muscular comum. As células cianófilas são observadas em secções parasagittais, em ambos os lados do corpo, desembocando em maior quantidade próximo à inserção ventral da papila penial.

O átrio masculino é revestido por epitélio cilíndrico alto (50 μm), não ciliado, tornando-se ciliado ventralmente, próximo ao gonóporo. A muscularis (62 μm) é constituída por uma camada de fibras longitudinais e circulares intercaladas. Três tipos de células secretoras, com corpos celulares internos à capa muscular desembocam através do epitélio de revestimento do átrio masculino: células cianófilas de secreção amorfa, células cianófilas com secreção granular grossa e células eritrófilas com secreção granular fina.

Os ovários são anteriores aos testículos, situando-se a uma distância de 7 mm e 14 mm da extremidade anterior (cerca de 23 % do comprimento do corpo, respectivamente, nos exemplares IPP 97 e IPP 105). Os ovários medem 0,6 mm no sentido ântero-posterior e 0,1 mm no eixo lateral no parátipo 105.

Os ovoviteloductos realizam uma pequena curvatura para emergirem dorsalmente do terço médio dos ovários, direcionando-se posteriormente acima da placa nervosa. Anteriormente ao gonóporo, sobem inclinados posteriormente para o plano mediano e unem-se em um ovoviteloducto glandular comum. O ovoviteloducto glandular comum desemboca na vagina, divertículo dorsal, curvado para a frente, do extremo posterior do átrio feminino. O átrio feminino é ovalado e pregueado. O comprimento do átrio feminino corresponde a 56% do comprimento do átrio masculino no exemplar IPP 2250.

Os ovoviteloductos são revestidos por epitélio cilíndrico ciliado (24 μm de altura). Na porção ectal dos ovoviteloductos e no ovoviteloducto glandular comum, há a desembocadura de glândulas da casca predominantemente com secreção eritrófila. A muscularis (6 μm de espessura) dos ovoviteloductos é composta por uma camada de fibras circulares e escassas fibras longitudinais intercaladas. O ovoviteloducto glandular comum é revestido por epitélio cilíndrico ciliado (16 μm de altura). A muscularis (18 μm de espessura) do ovoviteloducto glandular comum é composta por fibras circulares e longitudinais intercaladas.

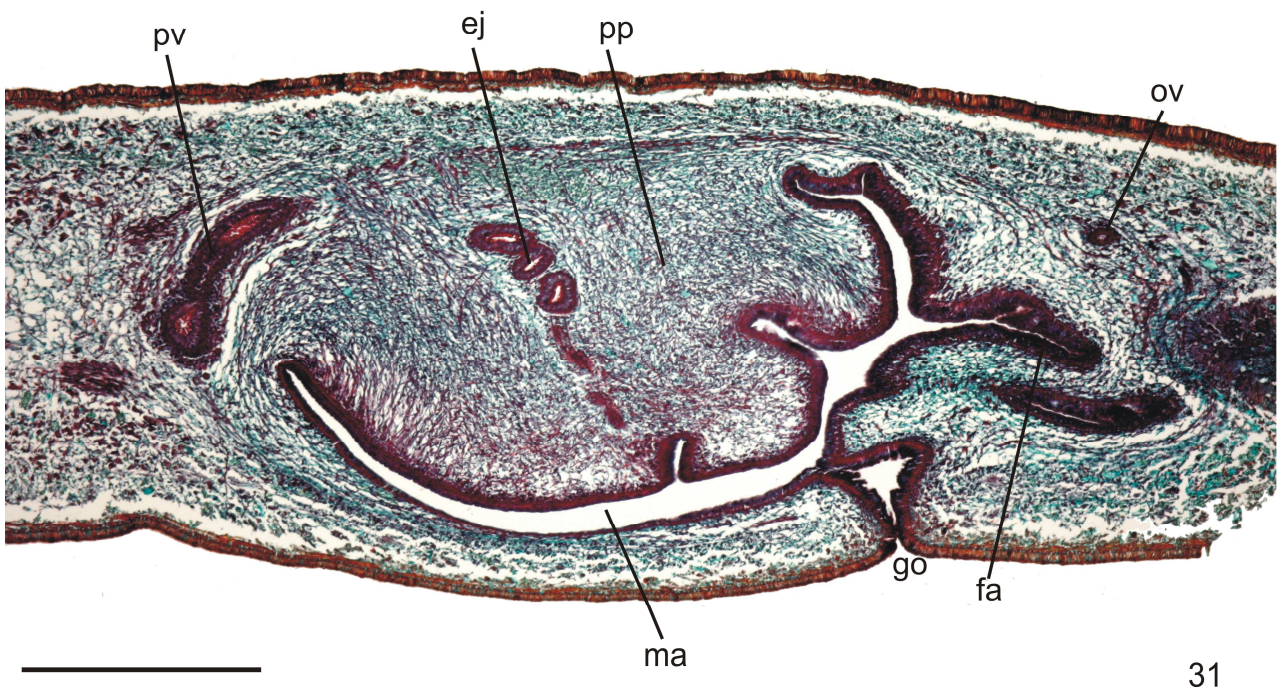
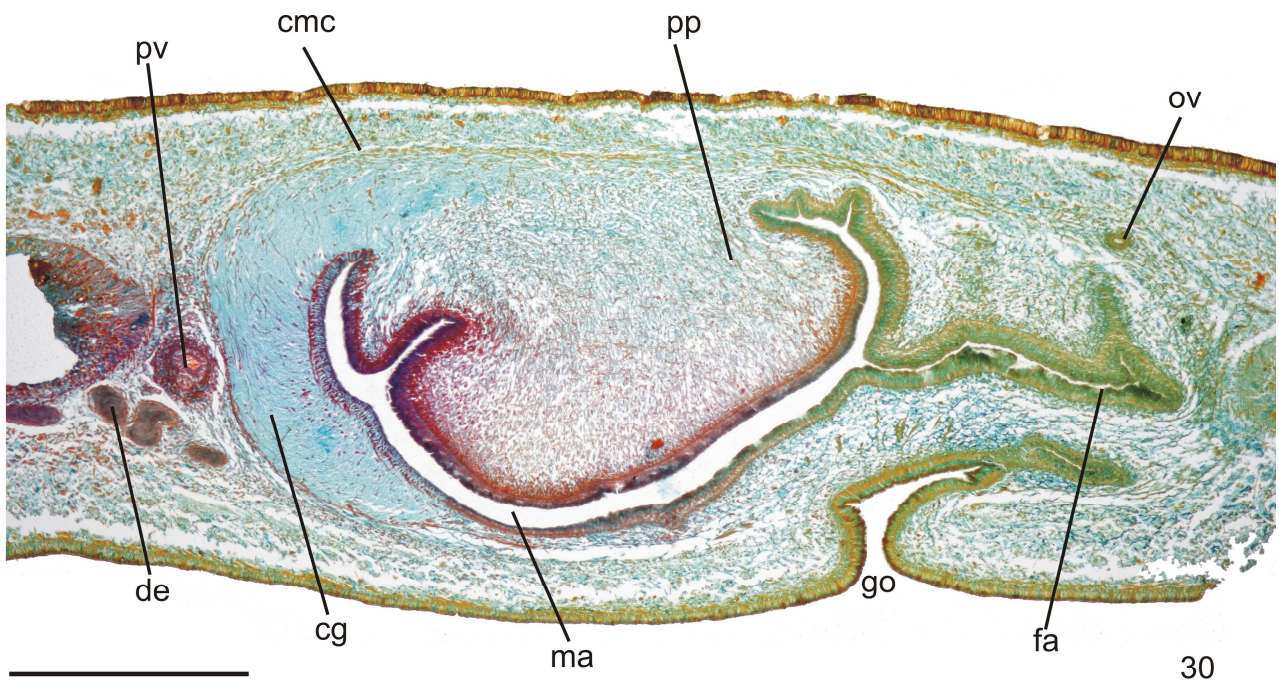
O átrio feminino é revestido por epitélio alto de aparência estratificada (300 μm). A muscularis é constituída por uma camada de fibras longitudinais e circulares intercaladas e esparsas fibras oblíquas. A musculatura própria do aparelho copulador é pouco desenvolvida. Desembocam no átrio feminino dois tipos de células secretoras com corpos celulares externos e próximos da capa muscular: abundantes células eritrófilas de granulação grossa (2 μm), além de numerosas células secretoras cianófilas com secreção amorfa.

A vagina é revestida por epitélio cilíndrico a pluriestratificado (43 μm de altura) recebendo a desembocadura de células eritrófilas com secreção granular fina e células cianófilas com secreção amorfa, ambas com corpos celulares externos à capa muscular.

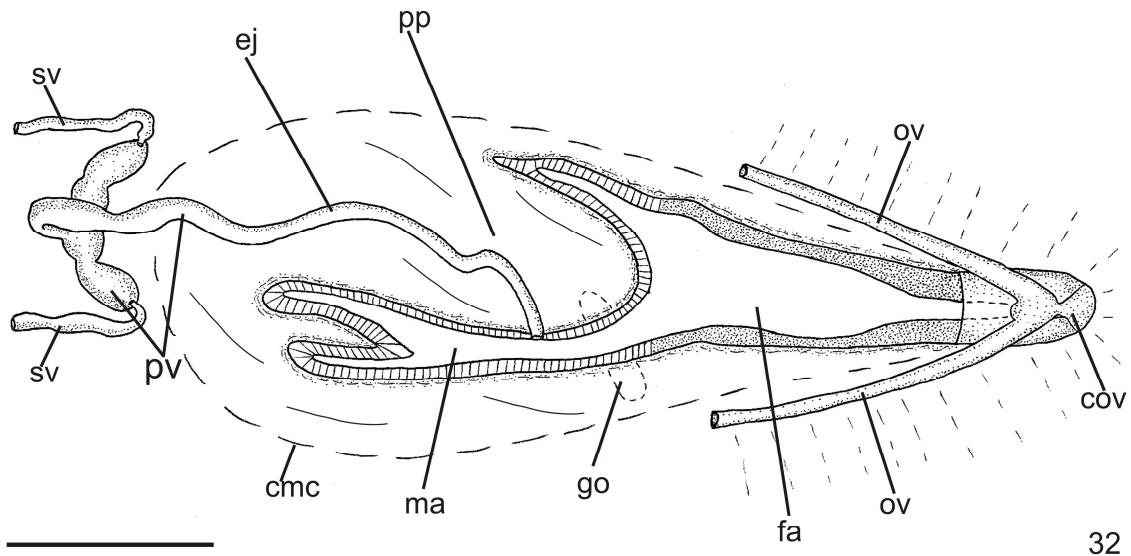
O canal do gonóporo é aproximadamente vertical no plano sagital. Os átrios masculino e feminino se comunicam amplamente, sem a ocorrência de dobras separando-os. O gonóporo é revestido por epitélio cilíndrico ciliado com numerosas células rhabditógenas, células cianófilas com secreção amorfa e células eritrófilas de granulação fina. Os corpos celulares dessas células são subepiteliais. A muscularis é composta por uma camada de fibras circulares e algumas fibras longitudinais intercaladas.

A capa muscular comum é pouco espessa, sendo constituída por fibras longitudinais intercaladas com fibras circulares e escassas fibras diagonais.

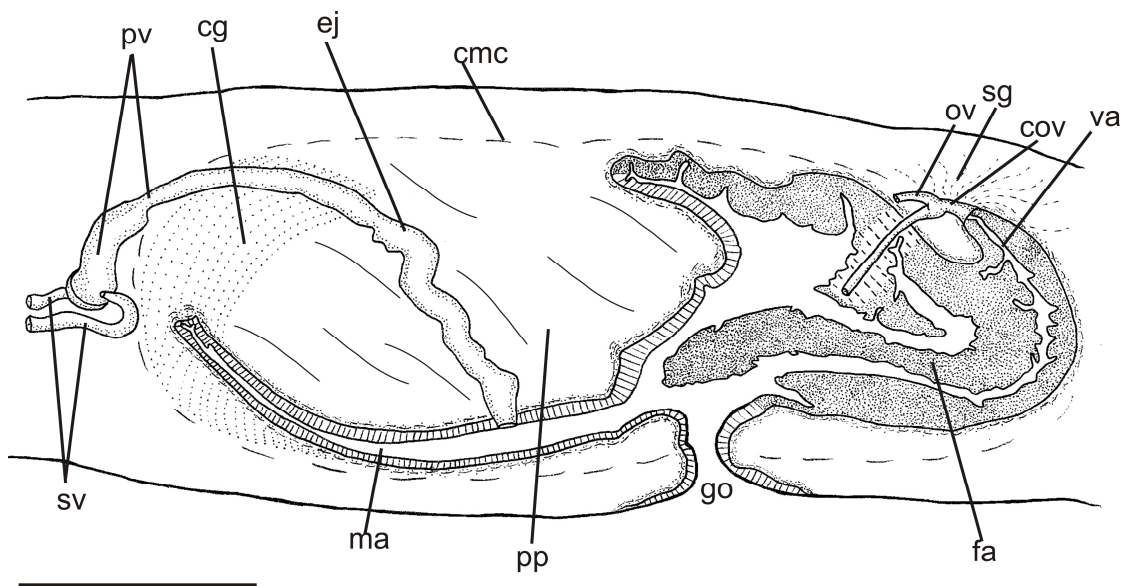
Os vitelários são encontrados entre os ramos intestinais, desembocando nos ovoviteloductos.



Figuras 30-31. *Geoplana ladislavii*: Aparelho copulador do exemplar IPP 1360; (30) corte parasagital mostrando a abundância de glândulas cianófilas; (31) corte sagital (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) oviducto, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sc) células secretoras, (va) vagina. Barra: 1 mm.

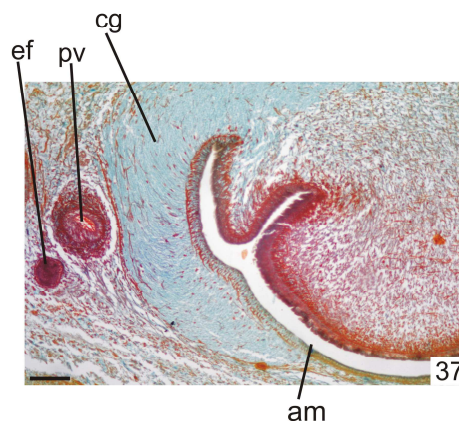
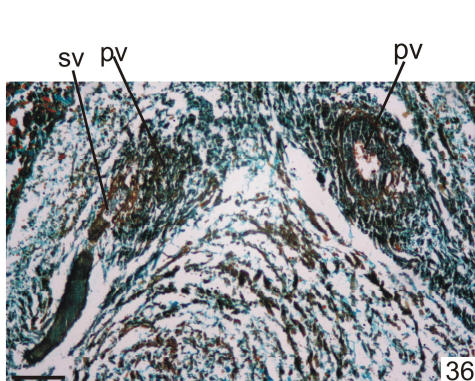
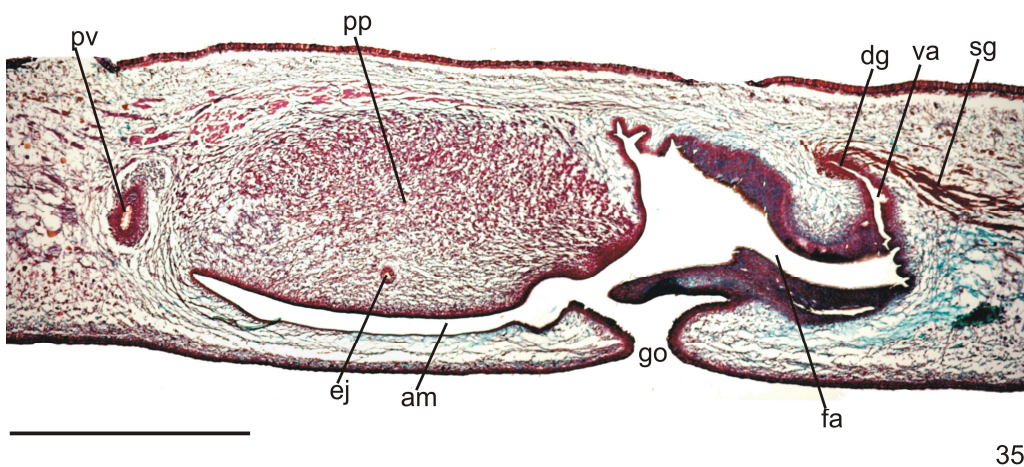
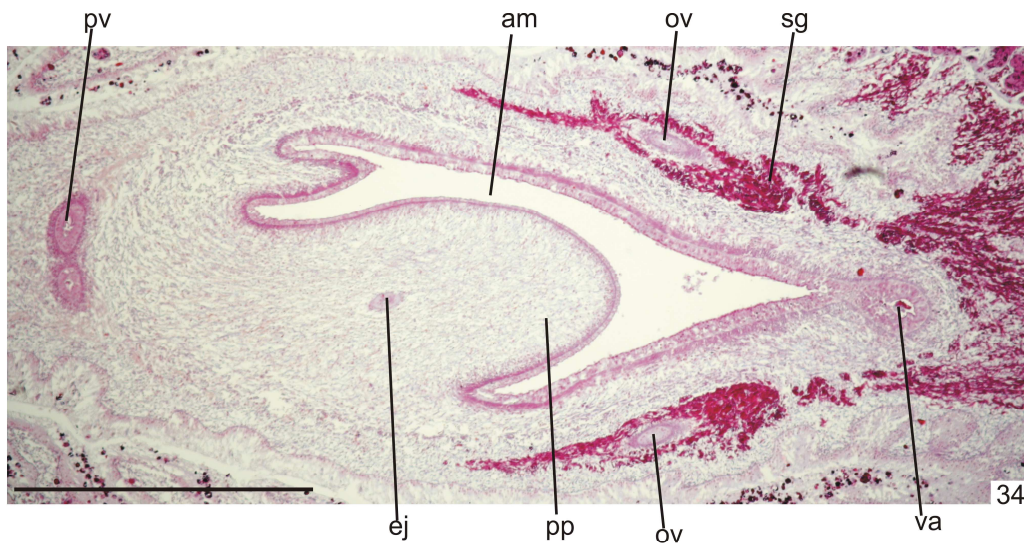


32



33

Figuras 32-33. *Geoplana ladislavii*: (32) Reconstrução do aparelho copulador do parátipo IPP 84, a partir de cortes horizontais; (33) reconstrução do aparelho copulador do exemplar IPP 1360, a partir de cortes sagitais; (cmc) capa muscular, (cov) ovoviteloducto glandular comum, (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) ovoviteloductos, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sg) glândulas da casca, (sv) ducto eferente, (va) vagina. Barra: 1 mm.



Figuras 34-37. *Geoplana ladislavii*. (34) Aparelho copulador do exemplar IPP 84 em corte horizontal; (35) aparelho copulador do exemplar IPP 2250 em corte sagital; (36) abertura de um dos espermióducos na porção bifurcada da vesícula prostática em corte horizontal do exemplar IPP 1051; (37) detalhe do acúmulo de glândulas cianófilas na inserção ventral da papila penial do exemplar IPP 1360; (cg) glândulas cianófilas, (de) epiderme dorsal, (ej) ducto ejaculatório, (fa) átrio feminino, (go) gonóporo, (ma) átrio masculino, (ov) oviducto, (pp) papila penial, (pv) vesícula prostática, (sv) ducto eferente, (va) vagina. Barra: (34-35): 1 mm (36-37): 0,1 mm.

Comentários:

Os exemplares IPP 105 e IPP 2250 não possuem esôfago; No exemplar IPP 2250, a inserção dorsal da faringe localiza-se no terço médio da bolsa faríngea. Os exemplares IPP 84, IPP 105, IPP 261, IPP 2237 e IPP 2250 são maduros, apresentando testículos e vitelários desenvolvidos e glândulas da casca abundantes. Já os exemplares IPP 97, IPP 1360, IPP 1729, IPP 1051 e IPP 2213 não possuem vitelários e/ou testículos desenvolvidos, encontrando-se em maturação. O exemplar IPP 1729 está parasitado na região do aparelho copulador por uma metacercária.

Análises Filogenéticas

As reconstruções filogenéticas pelos métodos de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana para o gene mitocondrial COI e nuclear ITS-1 são mostradas nas Figuras 38 e 39. As topologias recuperadas foram as mesmas para os dois métodos em cada um dos genes e bem suportados estatisticamente (*bootstraps* e probabilidades a posteriores > 80%), indicando que *Geoplana* sp. é um grupo taxonômico próximo de *Geoplana ladislavii*, mas independente desta. As taxas de substituições nucleotídicas, estimadas pela distância de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980), apontam para diferenças intraespecíficas de 0,5% para *G. burmeisteri* a 4,2% para *Choeradoplana iheringi*. Os dois espécimes de *G. ladislavii* do GenBank não apresentam diferenças entre si e há somente um exemplar de *Geoplana* sp.. As taxas de substituição nucleotídicas interespecíficas para os espécimes de *Geoplana* utilizados na hipótese de relacionamento (Figura 38) oscilou de 6,2% entre *Geoplana ladislavii* e *Geoplana* sp. e 10,2% entre *G. ladislavii* e *G. burmeisteri*.

Para o gene ITS-1 foram utilizados mais dois espécimes identificados morfologicamente como *Geoplana ladislavii* e as relações recuperadas foram similares as observadas quando da utilização das sequências da COI depositadas no GenBank. Pela primeira vez, *Supramontana irritata* possui o referido gene sequenciado e utilizado em uma reconstrução filogenética. As taxas de substituições nucleotídicas demonstraram variações intraespecíficas de 3% para *G. ladislavii* do presente estudo a 7,5% para *Cephaloflexa bergi*. Somente um exemplar de *Geoplana* sp. foi analisado molecularmente para este gene. As taxas de substituição nucleotídicas interespecíficas entre *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* é de 10,6% e com os demais gêneros mais de 20%.

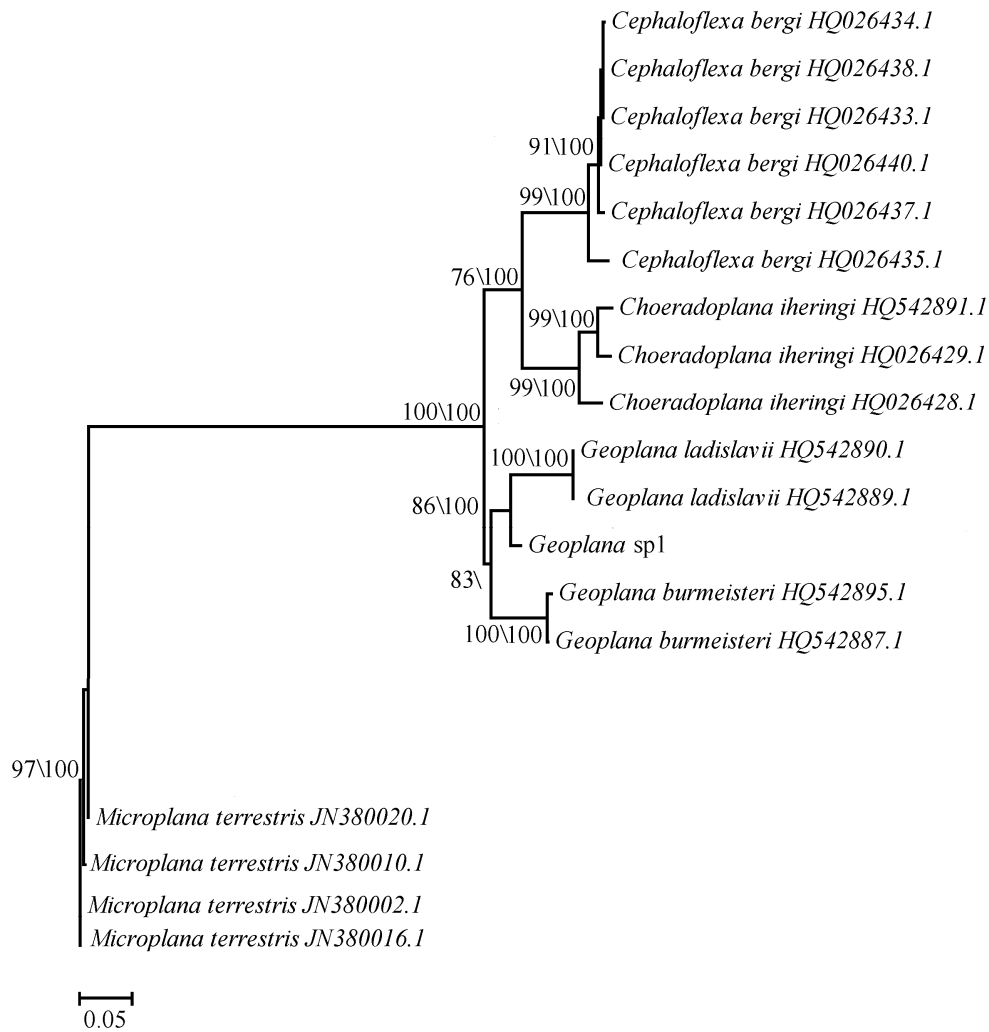
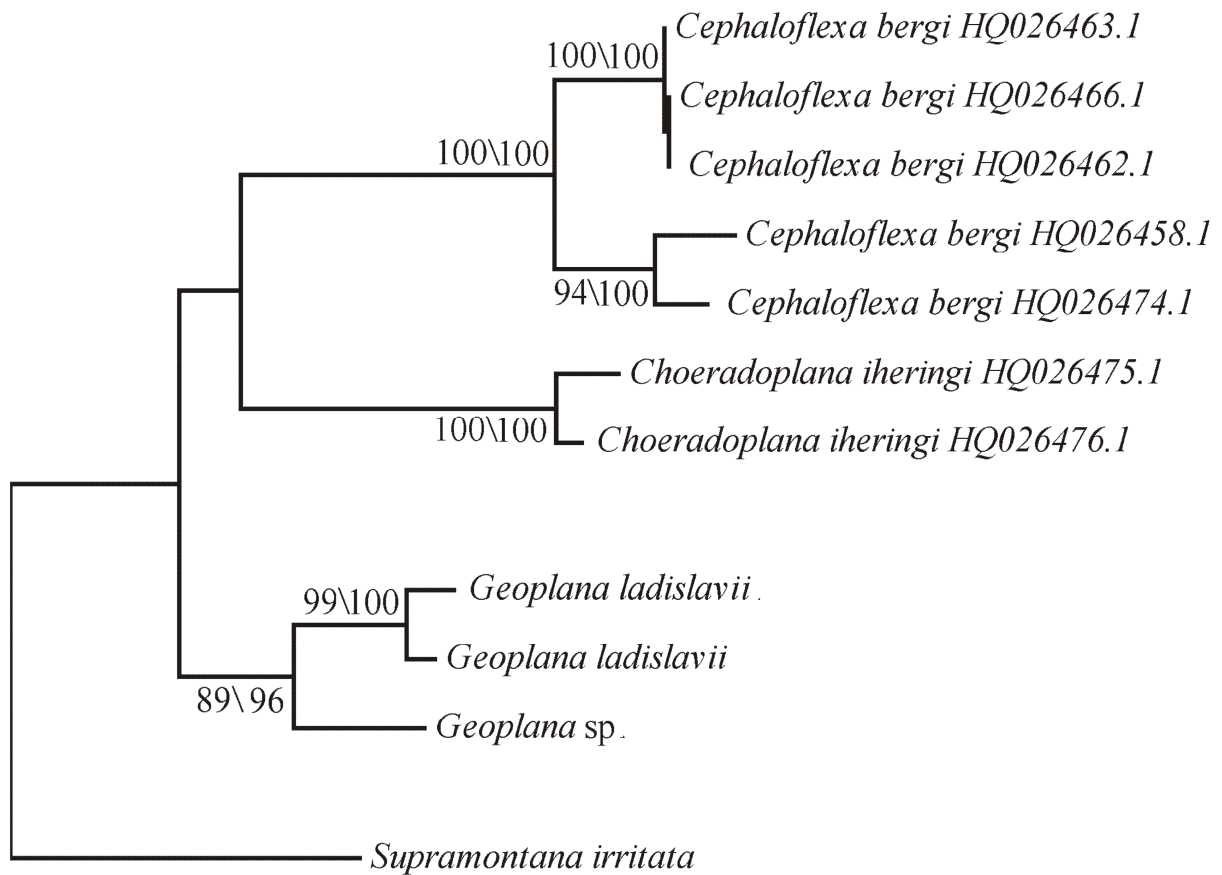


Figura 38. As relações filogenéticas recuperadas pela máxima verossimilhança entre o espécime *Geoplana* sp., 13 espécimes de Geoplanidae e quatro espécimes de *Microplana terrestris* (Microplaninae), como grupo externo, com sequências depositadas no GenBank (códigos de acesso junto aos nomes). A hipótese de relacionamento a partir das sequências de 822 pares de bases correspondentes ao gene mitocondrial COI. Os valores nos ramos representam apoio de *bootstrap* com 1000 repetições para máxima verossimilhança e as probabilidades a posterior para a inferência Bayesiana respectivamente. Apenas os valores de suporte superiores a 70% são apresentados.



0.05

39

Figura 39. As relações filogenéticas recuperadas pela máxima verossimilhança entre espécime *Geoplana sp.*; dois espécimes de *Geoplana ladislavii* um espécime de *Supramontana irritata* e sete espécimes de Geoplanidae com sequências depositadas no GenBank correspondentes ao gene ITS-1.(códigos de acesso junto aos nomes). Os valores nos ramos representam apoio de *bootstrap* com 1000 repetições para máxima verossimilhança e as probabilidades as posteriores para a inferência Bayesiana respectivamente. Apenas os valores de suporte superiores a 70% são apresentados.

DISCUSSÃO

Ao comparar *Geoplana* sp. com as espécies do grupo *Geoplana ladislavii* constata-se que essa espécie diferencia-se das demais, com exceção de *G. ladislavii* Graff, 1899, por apresentar padrão de coloração homogêneo, enquanto as outras espécies possuem estrias e/ou pigmentações variadas. *Geoplana aymara* Du Bois-Reymond Marcus, 1951 apresenta dorso preto com faixa mediana escura e duas estrias paramedianas alaranjadas; *Geoplana quichua* Du Bois-Reymond Marcus, 1951, dorso escuro com pigmentação preta e estria mediana preta; *Geoplana leucophryna* Marcus, 1951, coloração avermelhada, com faixa mediana clara. Em *Geoplana carrierei* Graff, 1899, o dorso é amarelado com densa pigmentação preta e extremidade anterior avermelhada. *Geoplana argus* Graff, 1899, *Geoplana itatiayana* Schirch, 1929, *Geoplana notocelis* Bresslau, 1930 e *Geoplana notophtalma* Riester, 1938 apresentam dorso amarelo com manchas escuras. *Geoplana burmeisteri* Schultze & Müller, 1857 apresenta dorso marrom com estria mediana marrom clara. *Geoplana marmorata* Schultze & Müller, 1857 apresenta dorso marrom com faixa mediana mais clara e manchas escuras espalhadas pelo dorso. *Geoplana dictyonota* Riester, 1938 apresenta o dorso preto com manchas escuras e uma estria avermelhada. *Geoplana* sp. se diferencia de *G. ladislavii* por apresentar dorso marrom-homogêneo ou marrom esverdeado e ventre marrom-claro, enquanto que *G. ladislavii* apresenta dorso verde homogêneo e ventre amarelado. Ambas as espécies apresentam os bordos do corpo mais claros em relação ao restante do dorso.

Quanto à disposição dos olhos, *Geoplana* sp. assemelha-se às demais espécies do grupo *G. ladislavii*, marginais e uniseriais contornando a extremidade anterior do corpo e invadindo o dorso posteriormente. Assim como em *Geoplana* sp., em *G. quichua*, *G. leucophryna*, *G. carrierei*, *G. dictyonota* e *G. ladislavii*, ocorre a presença de olhos com halos no terço médio do corpo onde são mais numerosos. *Geoplana* sp. pode apresentar os olhos distribuídos irregularmente, invadindo o dorso em até três milímetros. Nos exemplares de *Geoplana ladislavii*, observam-se no máximo, olhos em dois milímetros. Ambas as espécies possuem halos que iniciam no terço médio do corpo, porém, em *G. ladislavii* esses halos são pouco nítidos a olho nu, possivelmente em razão da coloração clara do dorso. Segundo Marcus (1951) essa característica não é apropriada para a comparação de espécies devido à ocorrência de variações intraespecíficas.

A faringe de *Geoplana* sp., cilíndrica, é semelhante à da maioria das espécies do mesmo grupo, diferindo apenas de *G. dictyonota* e *G. quichua*, que apresentam

faringe dos tipos colarinho e campanuliforme, respectivamente. O deslocamento médio da inserção dorsal é maior em *G. ladislavii* do que em *Geoplana* sp. Já o esôfago de *Geoplana* sp. é em média mais comprido do que o de *G. ladislavii*, porém a musculatura e o epitélio de revestimento são mais espessos em *G. ladislavii* do que em *Geoplana* sp. O mesmo ocorre com a espessura da muscularis do lúmen da faringe. A composição histoquímica das secreções cianófilas que desembocam na faringe também difere entre as espécies: *G. ladislavii* apresenta dois tipos de células cianófilas, um tipo de secreção amorfa e outro tipo de secreção granular fina, enquanto *Geoplana* sp. apresenta apenas células cianófilas com secreção amorfa.

Em relação ao aparelho copulador masculino, em *Geoplana* sp., o átrio é ocupado por uma papila penial oblíqua, assimétrica, projetando-se da parede anterior e do teto do átrio masculino e com inserção dorsal deslocada posteriormente, semelhante à de *G. ladislavii*, *G. carrierei*, *G. dictyonota*, *G. marmorata*, *G. notophthalma* e *G. quichua*. As demais espécies do grupo apresentam papila penial cônica e simétrica.

A vesícula prostática de *Geoplana* sp. é intrabulbar com a porção ental bifurcada e voltada para o ventre. No entanto, observa-se certa variação nessa característica, provavelmente relacionada com diversos graus de maturidade dos espécimes. A única espécie do grupo *G. ladislavii* que apresenta esse tipo de vesícula é *G. dictyonota*. As demais espécies do grupo apresentam vesícula extrabulbar. *Geoplana argus*, *G. itatiayana* e *G. dictyonota* também diferem de *Geoplana* sp. por não apresentarem porção anterior bifurcada. *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* diferem na posição da vesícula prostática e assemelham-se no formato da mesma. Em *G. ladislavii* a vesícula prostática apresentou-se extrabulbar, em todos os espécimes analisados.

O átrio feminino de *Geoplana* sp. apresenta formato oval e epitélio de aparência estratificada, mas com cavidade ampla, semelhante às demais espécies do grupo *G. ladislavii*.

Além das características relacionadas ao padrão de coloração e aspectos histológicos da faringe, detalhes histológicos do bordo glandular e do aparelho copulador diferenciam *Geoplana* sp. e *Geoplana ladislavii*. O bordo glandular de *Geoplana* sp., é conspícuo, sendo constituído por três tipos de células secretoras – xantófilas, eritrófilas e cianófilas. Em *Geoplana ladislavii*, o bordo glandular é pouco conspícuo, formado por dois tipos de células secretoras – xantófilas e cianófilas. Em relação à musculatura cutânea, em *Geoplana* sp., a musculatura dorsal é mais

desenvolvida do que a ventral, enquanto em *G. ladislavii*, a musculatura ventral é mais desenvolvida do que a dorsal.

Quanto às células secretoras da vesícula prostática, *Geoplana* sp. apresenta células de secreção mista (eritrófila e cianófila) e células de secreção eritrófila, enquanto *Geoplana ladislavii* apresenta células cianófilas de secreção amorfa e ausência de células de secreção mista. O ducto ejaculatório difere quanto ao percurso entre as duas espécies. *Geoplana* sp. apresenta ducto ejaculatório menos sinuoso do que *G. ladislavii*. *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* se diferenciam quanto ao conjunto de células secretoras que desembocam no átrio masculino. *Geoplana* sp. apresenta células cianófilas, com secreção amorfa, além de células eritrófilas de granulação fina e células xantófilas e eritrófilas de granulação grossa. Próximo à inserção ventral da papila penial, *G. ladislavii* apresenta uma grande quantidade de células secretoras cianófilas, diferindo de *Geoplana* sp.

Ambas as espécies diferem entre si quanto à composição de células secretoras que desembocam através do epitélio de revestimento e na espessura do átrio feminino. Em *Geoplana* sp. desembocam no átrio feminino três tipos de glândulas, a saber células eritrófilas e cianófilas com granulação fina e células xantófilas com granulação grossa. *Geoplana ladislavii* apresenta apenas dois tipos de células secretoras desembocando no átrio feminino: células eritrófilas de granulação grossa e células cianófilas de secreção amorfa desembocando no átrio feminino. Além disso, o epitélio de revestimento do átrio feminino de *G. ladislavii* tem aproximadamente o dobro da altura do epitélio de *Geoplana* sp. Em *G. ladislavii* o comprimento do átrio feminino corresponde a 56% do comprimento do átrio masculino, diferindo de *Geoplana* sp., na qual o mesmo corresponde a 71% do comprimento do átrio masculino.

A comparação dos espécimes de *G. ladislavii* procedentes de diversos municípios do Rio Grande do Sul com o material-tipo depositado no Museu de Hamburgo indicou que os espécimes aqui analisados têm características similares entre si e com o material original. Observou-se apenas uma variação não significativa nas células secretoras que compõem o bordo glandular, formado por células secretoras eritrófilas e cianófilas no material original, enquanto que nos exemplares aqui analisados, o bordo é composto por células xantófilas e cianófilas. Essa variação pode ser em decorrência da coloração utilizada. Em relação aos exemplares analisados por Froehlich (1959) na redescritção da espécie, estes apresentam papila

penial simétrica e com inserção dorsal pouco deslocada posteriormente, diferindo dos espécimes aqui analisados, bem como dos espécimes estudados por Graff (1899).

Quanto às análises moleculares, *G. ladislavii* e *Geoplana* sp. se mostraram próximas, mas independentes. Apesar do número reduzido de espécimes de *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* para a determinação real das divergências genéticas intraespecíficas, os valores de 6% para o gene da COI e 10,6% para o ITS-1 em relação as diferenças entre estas são valores consistentes para sustentar que estas não são divergências a nível de espécie e sim supraespecíficas. Portanto, *Geoplana ladislavii* e *Geoplana* sp. diferenciam-se entre si pelo conjunto de características morfológicas e moleculares apresentado. Adicionalmente, *Geoplana* sp. apresenta um conjunto de características morfológicas único que a diferencia das demais espécies descritas para o gênero.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de produtividade em pesquisa e de pós-graduação concedidas, respectivamente, à Ana Maria Leal-Zanchet e a Silvana Vargas do Amaral. Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Secretaria de Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (SEMA-RS) pela autorização da pesquisa na Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA/SFP) e no Parque Nacional dos Aparados da Serra. À prof. Dr^a Eudóxia Froehlich pelo empréstimo de espécimes de *Geoplana* sp. Ao prof. Dr. Fernando Carbayo pelas informações sobre o material-tipo de *G. ladislavii* depositado no Museu de Hamburgo. Ao Tenente Cesar Augusto Rodrigues Cezar, pela autorização de entrada no Campo de Instrução do Exército de Santa Maria. Às laboratoristas Aline Centa, Letícia Guterres e Rafaela Canello pelo auxílio no processamento histológico. Ao biólogo Guilherme Pinto Cauduro pelo auxílio no processamento e na análise dos dados moleculares. Aos biólogos Délio Endres, Ilana Rossi, João Braccini, Márcio Sasamori, Michelle Antunes, Piter Boll, Vanessa Baptista e Welcy Santos pelo auxílio na coleta de espécimes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-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**: 1-10.
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. **IEE Transactions on Automatic Control**, **19**: 716-723.
- BAGUÑÀ, J., CARRANZA, S., PALA, M., RIBERA, C., GIRIBET, G., ARNEDO, M., RIBAS, M., RIUTORT, M., 1999. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. **Italian Journal of Zoology** **66**: 207–214.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: 791-793
- FROEHLICH, C.G. 1955a. Sobre morfologia e taxonomia das Geoplanidae. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Série Zoologia**, **19**: 195-279.
- FROEHLICH, C.G. 1959. On geoplanids from Brazil. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, série Zoologia, **22**: 201-265.
- GRAFF, L. 1899. **Monographie der Turbellarien**: II. Tricladida Terricola. Leipzig, Engelmann. 574 p.
- GUIDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Molecular Systems Biology**, **52**: 696-704.
- HALL, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT..**Nucl. Acids. Symp. Ser.** **41**: 95-98.

- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, **21**: 160-174.
- MARCUS, E., 1951. Turbellaria brasileiros. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, série Zoologia, **16**: 51-214
- RODRÍGUEZ, F. J.; OLIVER, J. L.; MARÍN, A. & MEDINA, J. R. 1990. The general stochastic modelo of nucleotide substitution. **Journal of Theoretical Biology**, **142**: 485-501.
- ROMEIS, B., 1989. Mikroskopische Technik. **München, Urban und Schwarzenberg**. 697 p.
- RONQUIST F.; HUELSENBECK, J. P.; VAN DER MARK, P. 2005. **MrBayes 3.1**.
- TAMURA, K.; PETERSON D., PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, **28**: 2731-2739.

9. CAPÍTULO II

Caracterização histológica e histoquímica das células secretoras de duas espécies crípticas de planárias terrestres do gênero *Geoplana* (Platyhelminthes: Tricladida: Continenticola)

Silvana Vargas do Amaral^{1,2} & Ana Maria Leal-Zanchet^{1,2,3}

¹Instituto de Pesquisas de Planárias e ²Programa de Pós-Graduação em Biologia
Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS
CEP 93022-000 São Leopoldo, RS, Brasil

³Autor para correspondência: zanchet@unisinis.br

RESUMO

Análises histoquímicas são usualmente utilizadas na identificação de substâncias produzidas ou armazenadas nas células de um determinado órgão, para auxiliar a compreensão de sua fisiologia. Adicionalmente, podem ser utilizadas como ferramenta para análises filogenéticas e taxonômicas, auxiliando na tabulação de caracteres e diferenciação de espécies crípticas. No presente estudo, é realizada a primeira caracterização histoquímica das células secretoras das diferentes regiões do corpo de duas espécies crípticas de planárias terrestres, *Geoplana* sp. e *Geoplana ladislavii*, Graff, 1899, com a finalidade de contribuir para diferenciá-las. As células secretoras são analisadas e classificadas de acordo com as reações a colorações tricrômicas e corantes histoquímicos. Na epiderme da região anterior e pré-faringea de ambas espécies desembocam células com secreções protéicas e glicoprotéicas, além de células com glicoconjugados neutros em *Geoplana* sp. e células com glicosaminoglicanas em *G. ladislavii*. O bordo glandular possui células secretoras eritrófilas com secreção protéica e cianófilas com secreção glicoprotéica e células xantófilas com secreção protéica exclusivamente em *Geoplana* sp. Adicionalmente, as células cianófilas das duas espécies possuem secreção distinta, i. e., glicosaminoglicanas em *G. ladislavii* e glicoproteína em *Geoplana* sp. Quanto às glândulas faringiais, há três tipos de células secretoras: cianófilas, eritrófilas e xantófilas/eritrófilas em ambas espécies, além de um quarto tipo (células cianófilas com secreção protéica) em *G. ladislavii*. No entanto, a secreção produzida pelas células cianófilas e xantófilas e/ou eritrófilas das glândulas faringiais se diferencia nas duas espécies, apresentando proteína básica ou glicoproteína. A vesícula prostática de ambas apresenta secreção proteica. Na papila penial desembocam células com

secreção proteica, glicoproteica e com glicosaminoglicanas. *Geoplana ladislavii* se diferencia de *Geoplana* sp. por apresentar grande quantidade de células cianófilas desembocando próximo à inserção ventral da papila penial. No átrio feminino, *G. ladislavii* apresenta secreções protéicas, enquanto *Geoplana* sp., secreções glicoprotéicas. Em relação às glândulas da casca, ambas as espécies possuem células eritrófilas, com secreção glicoproteica em *G. ladislavii* e secreção proteica em *Geoplana* sp. Os resultados confirmam a possibilidade de utilização de análises histoquímicas das glândulas para a caracterização e diferenciação de espécies.

Palavras-chave: células secretoras, diferenciação de espécies, espécies crípticas.

INTRODUÇÃO

Análises histoquímicas podem ser utilizadas como ferramenta para análises filogenéticas e taxonômicas, auxiliando na tabulação de caracteres e diferenciação de espécies crípticas, respectivamente. Em 1899, Graff analisou as células secretoras de várias espécies, mas em razão das técnicas histológicas utilizadas, não conseguiu observar a desembocadura das células secretoras e classificou-as apenas em eritrófilas e cianófilas. Nas descrições de espécies realizadas a partir de meados do século XIX e no século XX, bem como posteriormente (Marcus, 1951, E.M. Froehlich, 1955a, C. G. Froehlich, 1955a, b, 1959, Carbayo & Leal-Zanchet, 2003, Amaral *et al.*, 2012, dentre outros), a descrição histológica e a caracterização das glândulas da epiderme, da faringe e do aparelho copulador mostraram-se importantes para a caracterização dos táxons. Além da importância na caracterização taxonômica, a anatomia interna e a histoquímica das secreções das planárias terrestres fornecem caracteres de importância filogenética (Winsor, 1998a). O conhecimento sobre a morfologia funcional de órgãos e sistemas das planárias terrestres ainda é incipiente, sendo escassos dados histoquímicos de planárias terrestres. Winsor (1998a) analisou células secretoras do aparelho copulador de *Platydemus manokwari* Beauchamp, 1962; Fernandes *et al.* (2003) analisaram as células secretoras da região cefálica de *Bipalium kewense* Moseley, 1878 e Souza & Leal-Zanchet (2004) investigaram as células secretoras da epiderme, faringe e aparelho copulador de *Choeradoplana iheringi* Graff, 1899.

Geoplana ladislavii foi descrita por Graff (1899) com base em espécimes com dorso de coloração verde. Ao redescrever a espécie, Froehlich (1959) considerou que espécimes de coloração marrom esverdeada ou marrom seriam da mesma espécie em razão da grande semelhança de caracteres morfológicos. No entanto, ao analisar detalhadamente a morfologia externa e a interna de espécimes de ambas as espécies

percebem-se pequenas variações quanto à distribuição dos olhos, localização da vesícula prostática e a presença e tipo de células secretoras em diversas regiões do corpo. Os espécimes esverdeados (*Geoplana ladislavii*) se diferenciam dos espécimes marrons ou marrons-esverdeados (*Geoplana* sp.) por apresentarem bordo glandular pouco conspícuo, com apenas dois tipos de células secretoras, vesícula prostática extrabulbar e pela presença de células secretoras cianófilas que desembocam em grande quantidade na inserção ventral da papila penial.

No presente estudo, é realizada a primeira caracterização histoquímica das células secretoras das regiões anterior e pré-faríngea, da faringe e do aparelho copulador de duas espécies crípticas de planárias terrestres, *Geoplana* sp. e *Geoplana ladislavii*, Graff, 1899. As células secretoras são analisadas e classificadas de acordo com as reações a colorações tricrômicas e corantes histoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados animais maduros, com cerca de 60 mm de comprimento, coletados em áreas ajardinadas dos municípios de Ivoti, Portão, São Leopoldo e Taquara, RS. Cortes histológicos de 6 µm de espessura foram realizados da região anterior, da região pré-faríngea, da faringe e do aparelho copulador e submetidos às reações de Alcian Blue-PAS (AB/PAS) (Pearse 1968); azul de Bromofenol segundo Bonhag (Pearse 1968); DMAB segundo Adams (Romeis 1989), Ninhydrin-Schiff segundo Yasuma and Itchikawa (Romeis 1989) e Carmin de Best (Romeis 1989). Alguns cortes foram corados com os tricrômicos de Azan/Heidenhain e Masson/Goldner (Romeis 1989).

As células secretoras foram classificadas de acordo com a coloração das secreções com Azan e Masson, utilizando-se as denominações cianófilo (a), eritrófilo (a) e xantófilo (a) para as células cuja secreção corou-se em verde, vermelho e laranja, respectivamente (Romeis 1989). Os grânulos de secreção foram medidos com auxílio de lâmina micrométrica. Os cortes foram analisados e fotografados com auxílio de microscópio Zeiss Axiophot com equipamento fotográfico digital acoplado.

RESULTADOS

***Geoplana* sp.**

Epiderme

Região anterior (figura 1, tabela I)

Oito tipos de células secretoras desembocam através da epiderme de *Geoplana* sp. ao nível da extremidade anterior do corpo, sendo três tipos na epiderme dorsal (células rabditógenas - D1, cianófilas - D2 e D3) e quatro na epiderme ventral (cianófilas - V3, xantófilas - V1, eritrófilas ou xantófilas - V4 e eritrófilas - V5).

As células rabditógenas (tipo D1, figura 1a) se apresentam moderadamente positivas ao Bromofenol, contendo proteína básica (tabela I). As células secretoras cianófilas com granulação fina (tipos D2 e V2) são moderadamente positivas ao PAS, indicando a presença de glicoconjugados neutros. Um segundo tipo de secreção cianófila desemboca na epiderme dorsal e ventral, com secreção amorfa (tipos D3 e V3). Essas células são fracamente positivas ao PAS, apresentando glicoconjugados neutros na sua composição (tabela I).

Três tipos de células secretoras, contendo granulação grossa (tabela I), desembocam exclusivamente na epiderme ventral: xantófilas (tipo V1, Figura 1b), eritrófilas ou xantófilas (tipo V4) e eritrófilas (tipo V5). As células dos tipos V1 e V5 são fortemente positivas ao DMAB e moderadamente positivas ao PAS e a Ninhydrin-Schiff, indicando secreção glicoprotéica. As células do tipo V4 são moderadamente positivas ao Bromofenol e fracamente positivas ao DMAB, indicando presença de proteína básica na sua composição (tabela I). Essas células formarão, na região pré-faríngea, o bordo glandular.

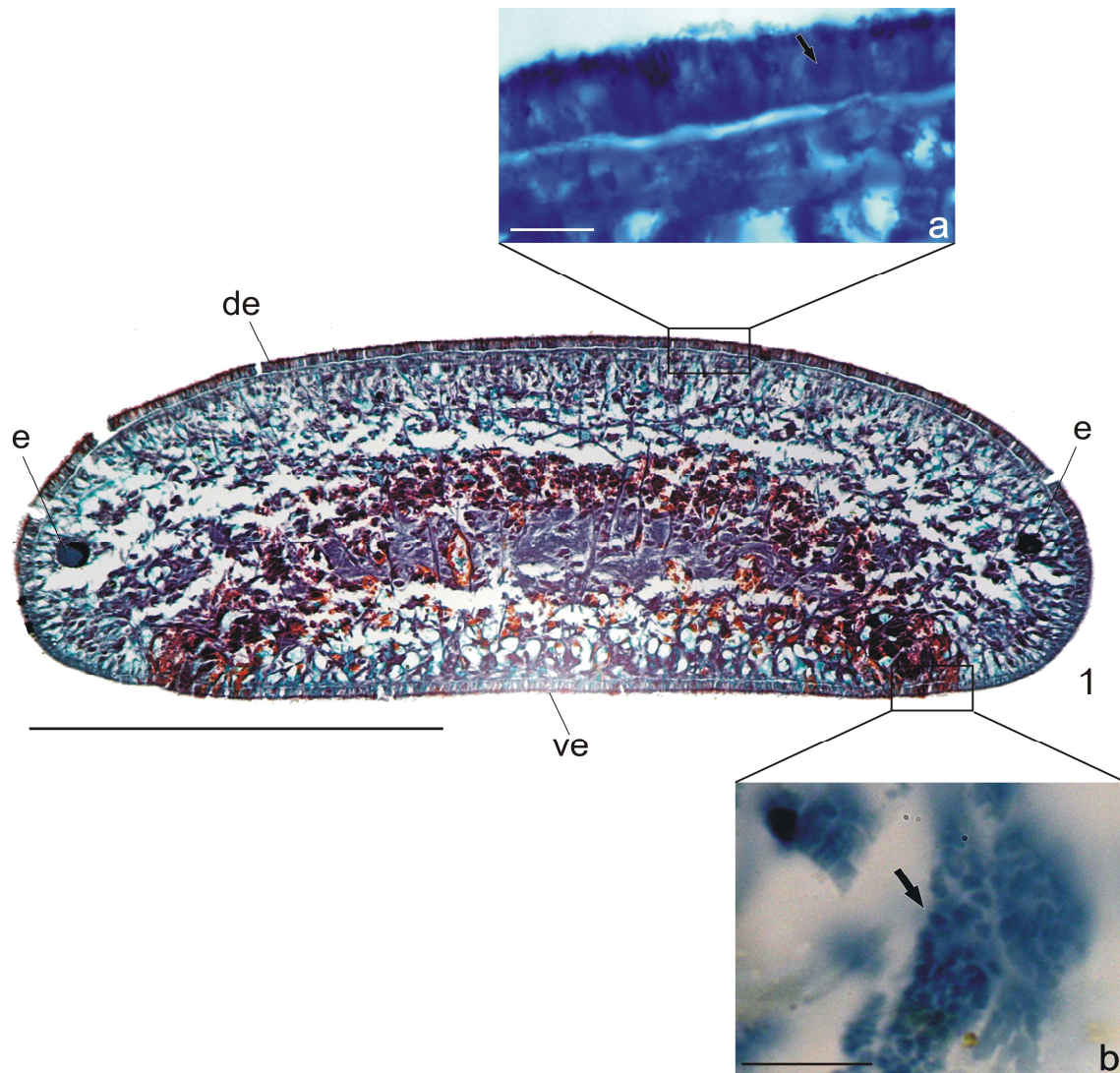


Figura 1. *Geoplana* sp.: Corte transversal da região anterior do exemplar 2259. (a) células secretoras do tipo D3 na epiderme dorsal. Coloração: azul de Bromofenol; (b) células do tipo V1 na epiderme ventral. Coloração: DMAB. de: epiderme dorsal; e: olhos; ve: epiderme ventral. As setas apontam os grânulos de secreção. Coloração: DMAB. Barras: (1): 0,5 mm; (a) e (b): 0,01 mm.

Tabela I: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da epiderme da região anterior de *Geoplana* sp. --: secreção amorfa; *: comprimento e largura das células rabditógenas; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
D1	8 x 4*	Vermelho	Laranja	++	-	-	-	Eritrófila/xantófila	Proteína básica Glicoconjugados
D2	0,6 (\pm 0,09)	Azul claro	Verde	-	++ PAS	-	-	Cianófila	neutros Glicoconjugados
D3	--	Azul claro	Verde claro	-	+ PAS	-	-	Cianófila	neutros
V1	2,4 (\pm 0,2)	Laranja	Laranja	-	+ PAS	+++	+	Xantófila	Glicoproteína Glicoconjugados
V2	1,0 (\pm 0,2)	Azul claro	Verde	-	++ PAS	-	-	Cianófila	neutros Glicoconjugados
V3	--	Azul claro	Verde	-	+ PAS	-	-	Cianófila	neutros
V4	2,5 (\pm 0,3)	Vermelho	Vermelho/alaranjado	++	-	+	-	Eritrófila/xantófila	Proteína básica
V5	2,5 (\pm 0,3)	Vermelho	Vermelho escuro	-	+ PAS	+++	+	Eritrófila	Glicoproteína

Região pré-faríngea: (figura 2, tabela II)

Na pré-faringe desembocam 10 tipos de células secretoras, a saber: quatro tipos na epiderme dorsal (células rabditógenas – D1, células cianófilas – D2 e D3, células xantófilas ou eritrófilas – D4) e três na epiderme ventral (eritrófilas ou xantófilas – V1 e cianófilas – V2 e V3). Nas margens do corpo desembocam três tipos de células secretoras, formando o bordo glandular (células xantófilas – BG1, eritrófilas – BG2 e cianófilas – BG3). As células secretoras do tipo rabditógenas (tipos D1 e V1) são fortemente positivas ao Bromofenol, sendo que apenas as do tipo D1 são fracamente positivas a Ninhydrin-Schiff, indicando um tipo de proteína básica (tabela II).

O segundo tipo de célula secretora é cianófila com secreção amorfa (tipos D2 e V2). Ambas são moderadamente positivas ao PAS e fracamente positivas a Ninhydrin-Schiff. Apenas a célula do tipo D2 é moderadamente positiva do DMAB. Esse tipo de célula secretora apresenta secreção glicoprotéica (tabela II).

As células secretoras dos tipos D3 e V3 são cianófilas com granulação fina. Ambas são moderadamente positivas ao Bromofenol e a célula do tipo D3 é moderadamente positiva também ao DMAB. Ambas as reações indicam que essas secreções contêm proteína básica (tabela II).

Na epiderme dorsal desemboca um tipo de célula xantófila com granulação fina (tipo D4), que não apresentou reação positiva às reações utilizadas (tabela II).

O bordo glandular é formado por um tipo de célula xantófila e um tipo de célula eritrófila (tipos BG1 e BG2, respectivamente), ambas com granulação grossa, fortemente positivas ao bromofenol e ao DMAB, indicando um tipo de proteína básica. Há também um tipo de célula cianófila com secreção amorfa (tipo BG3), fracamente positiva ao PAS, indicando glicoconjugados neutros (tabela II, figura 2).

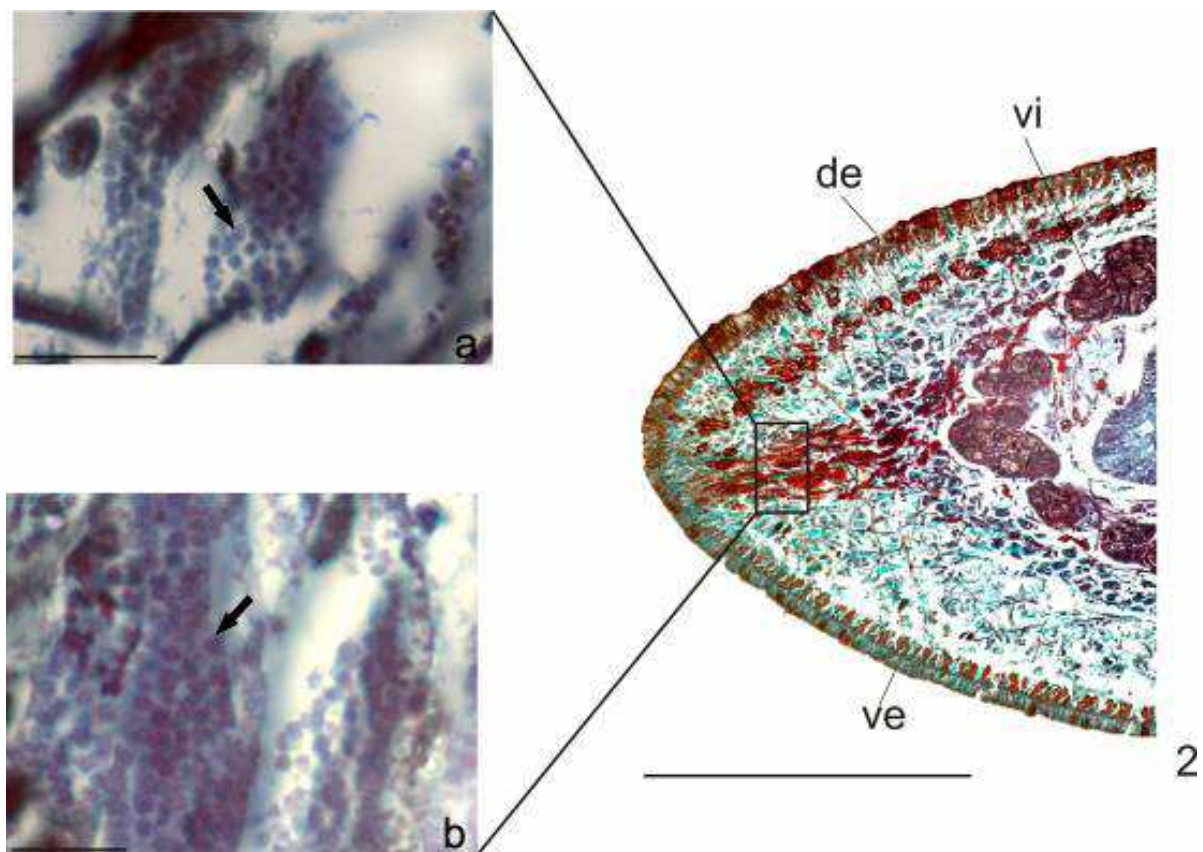


Figura 2. *Geoplana* sp.: Corte transversal da região pré-faríngea do exemplar 2259, destacando as células que compõem o bordo glandular. (a) células secretoras do tipo BG1; (b) células do tipo BG2. de: epiderme dorsal; ve: epiderme ventral; vi: vitelários. A seta aponta os grânulos de secreção. Coloração: DMAB. Barras: (2): 1 mm; (a) e (b): 0,01 mm

Tabela II: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da epiderme da região pré-faríngea de *Geoplana* sp.. --: secreção amorfa; *: comprimento e largura das células rabditógenas; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
D1	21 x 3*	Vermelho	Laranja	+++	-	-	+	Eritrófila/Xantófila	Proteína básica
D2	--	Azul claro	Verde	-	++ PAS	++	-	Cianófila	Glicoproteína
D3	0,8 (\pm 0,2)	Azul claro	Verde	++	-	++	-	Cianófila	Proteína básica
D4	0,7 (\pm 0,2)	Laranja	Vermelho	-	-	-	-	Xantófila/Eritrófila	-
V1	18 x 6*	Vermelho	Laranja	+++	-	-	-	Eritrófila/Xantófila	Proteína básica
V2	--	Azul claro	Verde	-	++ PAS	-	+	Cianófila	Glicoconjugados neutros
V3	0.8 (\pm 0,2)	Azul claro	Verde	++	-	-	-	Cianófila	Proteína básica
BG1	1,6 (\pm 0,2)	Laranja	Laranja	+++	-	+++	-	Xantófila	Proteína básica
BG2	1,7 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	+++	-	+++	-	Eritrófila	Proteína básica
BG3	--	Azul claro	Verde	-	+ PAS	-	-	Cianófila	Glicoconjugados neutros

Faringe (figura 3, tabela III)

Desembocam no ápice da faringe três tipos de células secretoras, sendo um tipo de célula cianófila com secreção amorfa (tipo PH1), células eritrófilas e células xantófilas (tipos PH2 e PH3, respectivamente). As células secretoras do tipo PH1 são moderadamente positivas ao PAS, indicando a ocorrência de glicoconjugados neutros (tabela III). As células secretoras do tipo PH2 são fortemente positivas ao DMAB, indicando um tipo de proteína básica (tabela III, figura 3a). Já as células do tipo PH3 são moderadamente positivas ao azul de Bromofenol e DMAB e fracamente positivas ao PAS, indicando secreção glicoprotéica (tabela III, Figura 3b).

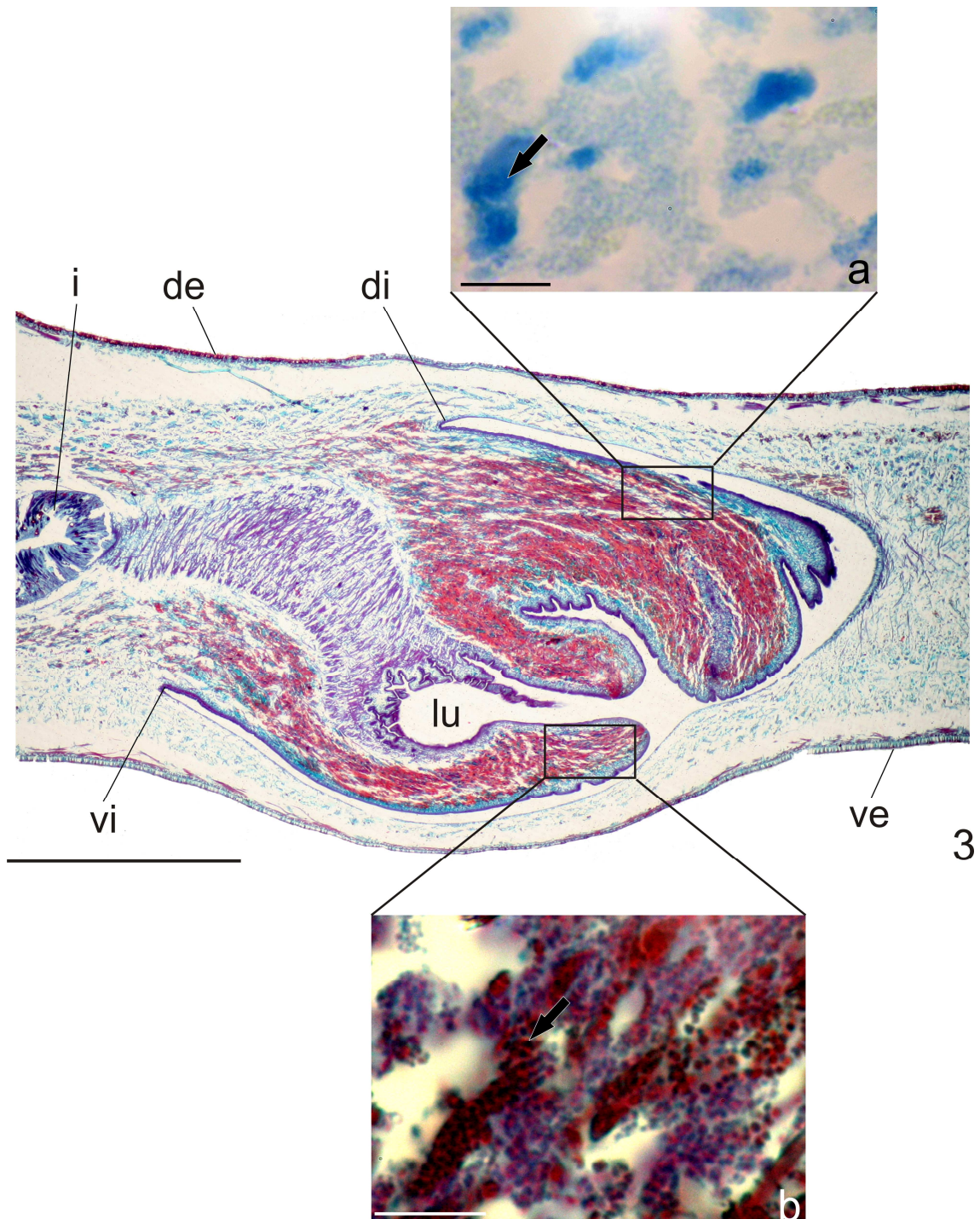


Figura 3. *Geoplana* sp.: Corte sagital da faringe do exemplar 2259. (a) células secretoras do tipo PH2; coloração: DMAB; (b) células do tipo PH3; coloração: Bromofenol. De: epiderme dorsal; di: inserção dorsal; i: intestino; lu: lúmen faringeal; vi: inserção ventral. Coloração: Bromofenol. As setas apontam os grânulos de secreção. Barras: (4): 1 mm; (a) e (b): 0,01 mm

Tabela III: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da faringe de *Geoplana* sp.. --: secreção amorfa; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
PH1	--	Azul claro	Verde	-	+ PAS	-	-	Cianófila	Glicoconjugados neutros
PH2	1,1 ($\pm 0,2$)	Laranja/avermelhado	Vermelho	-	-	+++	-	Xantófila/ Eritrófila	Proteína básica
PH3	0.7 ($\pm 0,2$)	Laranja claro	Laranja	++	+ PAS	++	-	Xantófila	Glicoproteína

Aparelho copulador (figura 4, tabela IV)

Na vesícula prostática de *Geoplana* sp. desembocam dois tipos de células secretoras (PV1 e PV2). As células secretoras do tipo PV1 são eritrófilas com granulação grossa. Essas células são fortemente positivas ao Bromofenol, indicando um tipo de proteína básica (tabela IV, figura 4a). A célula secretora do segundo tipo (tipo PV2) é cianófila com secreção amorfa. Esse tipo de célula é moderadamente positiva ao DMAB, contendo proteína básica em sua composição (tabela IV). Ambas as células possuem corpos celulares no mesênquima, próximos à vesícula.

A papila penial recebe a desembocadura de abundantes células secretoras eritrófilas de granulação fina (tipo PP1), células xantófilas de secreção fina (tipo PP2) e células cianófilas de secreção amorfa (tipo PP3). Os corpos celulares das células cianófilas e eritrófilas ocorrem externamente à capa muscular. As glândulas xantófilas apresentam corpos celulares subepiteliais. As células do tipo PP1 são fracamente positivas ao DMAB, indicando secreção protéica (tabela IV). As células do tipo PP2 são fracamente positivas ao azul de Bromofenol, PAS e Ninhydrin-Schiff apresentando secreção glicoprotéica na sua composição (tabela IV). As células do tipo PP3 reagiram fortemente ao Alcian-Blue, indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela IV). No ducto ejaculatório desemboca um tipo de célula cromófoba (tipo DE1) que não apresentou reação positiva às reações utilizadas (tabela IV).

Quatro tipos de células secretoras, com corpos celulares externos à capa muscular desembocam através do epitélio de revestimento do átrio masculino: células xantófilas de granulação grossa (tipo AM1), células cianófilas com secreção amorfa (tipo AM2), células eritrófilas de granulação fina (tipo AM3) que desembocam na região dorsal do átrio e células eritrófilas de granulação grossa desembocando na região ventral do átrio masculino (tipo AM4). As células do tipo AM1 são moderadamente positivas a Ninhydrin-Schiff, indicando proteína básica (tabela IV). As células secretoras do tipo AM2 (figura 4b) e AM3 também contêm um tipo de proteína básica, reagindo moderadamente ao DMAB (tabela IV). As células do tipo AM4 são fracamente positivas ao Alcian Blue, contendo glicosaminoglicanas (tabela IV).

No átrio feminino desembocam quatro tipos de células secretoras, sendo abundantes as células xantófilas de granulação grossa (tipo AF1) e as células eritrófilas de granulação fina (tipo AF2). Os outros dois tipos de células secretoras são cianófilas, apresentando secreção granular grossa (tipo AF3) e secreção amorfa (tipo AF4). As células secretoras do tipo AF1 são fortemente positivas ao Bromofenol e moderadamente positivas ao PAS, apresentando secreção glicoprotéica (tabela IV,

figura 4c). As células eritrófilas não reagiram às reações histoquímicas utilizadas (tabela IV). O terceiro tipo de célula secretora (tipo AF3) é moderadamente positivo ao DMAB e fracamente positivo ao PAS e a Ninhydrin-Schiff, indicando secreção glicoproteica (tabela IV). As células cianófilas com secreção amorfa (tipo AF4) são fracamente positivas ao Alcian-Blue, indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela IV). Os corpos celulares das células xantófilas são subepiteliais e as células eritrófilas e cianófilas apresentam corpos celulares externos e próximos à capa muscular.

Na vagina de *Geoplana* sp. desembocam dois tipos de células secretoras (VA1 e VA2). O primeiro tipo (VA1) libera secreção eritrófila que reage moderadamente a Ninhydrin-Schiff e fracamente ao PAS, indicando presença de glicoproteína (tabela IV). As células secretoras do segundo tipo (VA2) são cianófilas com secreção granular amorfa. Essa secreção é fracamente positiva ao Alcian Blue, indicando a presença de glicosaminoglicanas (tabela IV). Os corpos celulares de ambas as células são externos à capa muscular. As glândulas da casca (tipo CG1), desembocando nas porções terminais dos ovoviteloductos e no ovoviteloducto glandular comum, produzem secreção eritrófila, fracamente positiva ao Bromofenol, indicando ser uma proteína básica (tabela IV, figura 4d).

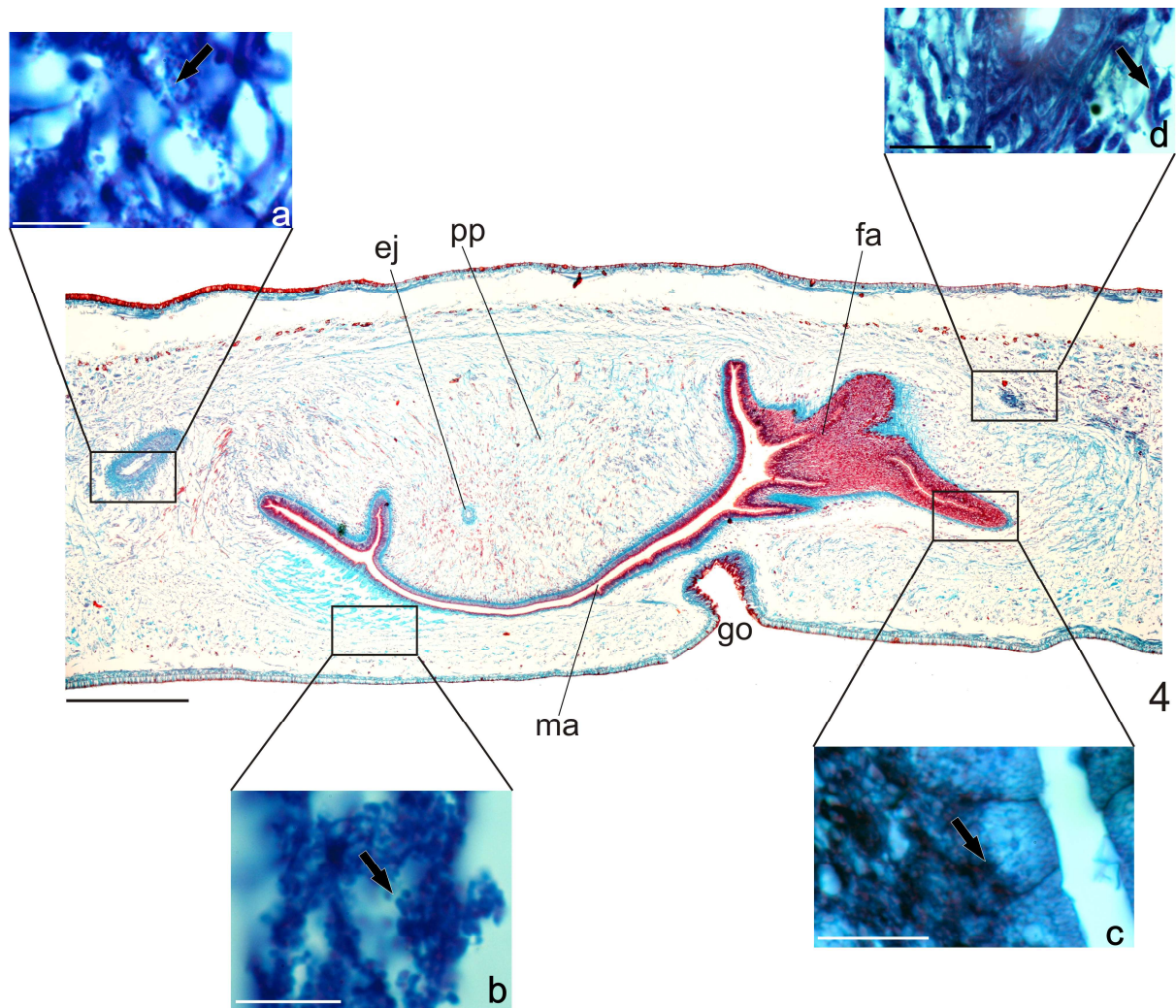


Figura 4. *Geoplana* sp.: Corte sagital do aparelho copulador do exemplar 2259. (a) células secretoras do tipo PV1; (b) células do tipo AM2; (c): células secretoras do tipo AF1; (d): células secretoras do tipo CG1. Ej: ducto ejaculatório; fa: átrio feminino; go: gonóporo; ma: átrio masculino. As setas apontam os grânulos de secreção. Coloração: Bromofenol. Barras: (2): 1 mm; (a) e (b): 0,01 mm

Tabela IV: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras do aparelho copulador de *Geoplana* sp. -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

		Diâmetro	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
Vesícula	PV1	0.5 (\pm 0,09)	Vermelha	vermelho	+++	-	-	-	Eritrófila	Proteína básica
	PV2	--	Azul claro	Verde	-	-	++	-	Cianófila	Proteína básica
Papila penial	PP1	0.8 (\pm 0,2)	Vermelha	Vermelha	-	-	+	-	Eritrófila	Proteína básica
	PP2	0.8 (\pm 0,2)	Laranja	Laranja	+	+ PAS	-	+	Xantófila	Glicoproteína
	PP3	--	Azul claro	Verde	-	+++ AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Átrio masculino	AM1	0.6 (\pm 0,1)	Laranja	Laranja	-	-	-	++	Xantófila	Proteína básica
	AM2	0.7 (\pm 0,2)	Azul forte	Azul forte	++	-	++	-	Cianófila	Proteína básica
	AM3	0.7 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	-	-	++	-	Eritrófila	Proteína básica
	AM4	--	Azul claro	Verde	-	+ AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Átrio feminino	AF1	3,0 (\pm 0,7)	Laranja	Laranja	+++	++ PAS	-	-	Xantófila	Glicoproteína
	AF2	0.6 (\pm 0,1)	Vermelho	Vermelho	-	-	-	-	Eritrófila	-
	AF3	5,0 (\pm 0,4)	Azul	Verde	-	+ PAS	++	+	Cianófila	Glicoproteína
	AF4	--	Azul claro	Verde	-	+ AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Vagina	VA1	0.6 (\pm 0,1)	Vermelho	Vermelho	-	+ PAS	-	++	Eritrófila	Glicoproteína
	VA2	--	Azul claro	Verde	-	+AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Ovoviteloducto glandular comum	GC1	2,9 (\pm 0,5)	Vermelho	Vermelha	+	-	-	-	Eritrófila	Proteína básica
Ducto ejaculatório	DE1	--	Cromófoba	Cromófoba	-	-	-	-	-	-

Geoplana ladislavii

Região anterior (figura 5, tabela V)

Cinco tipos de células secretoras desembocam através da epiderme de *Geoplana ladislavii* ao nível da extremidade anterior do corpo: células rabidtógenas (tipos D2 e V2) e dois tipos eritrófilas/xantófilas que desembocam na epiderme dorsal (tipo D1) e ventral (tipo V1). As células do tipo D2 são moderadamente positivas ao Bromofenol, contendo secreção protéica (tabela V, figura 5a). Já as células do tipo V2 não apresentaram reação positiva a nenhuma das reações submetidas (tabela V). As células do tipo D1 são fortemente positivas ao DMAB e moderadamente positivas ao Bromofenol indicando também presença de proteína básica (tabela V). As células do tipo V1 reagiram fortemente a Ninhydrin-Schiff e moderadamente ao Bromofenol e ao DMAB, contendo secreção glicoprotéica (tabela V, figura 5b).

Na epiderme dorsal desemboca um terceiro tipo de célula secretora (tipo D3) com secreção cianófila amorfa que não reagiu positivamente a nenhuma das reações (tabela V).

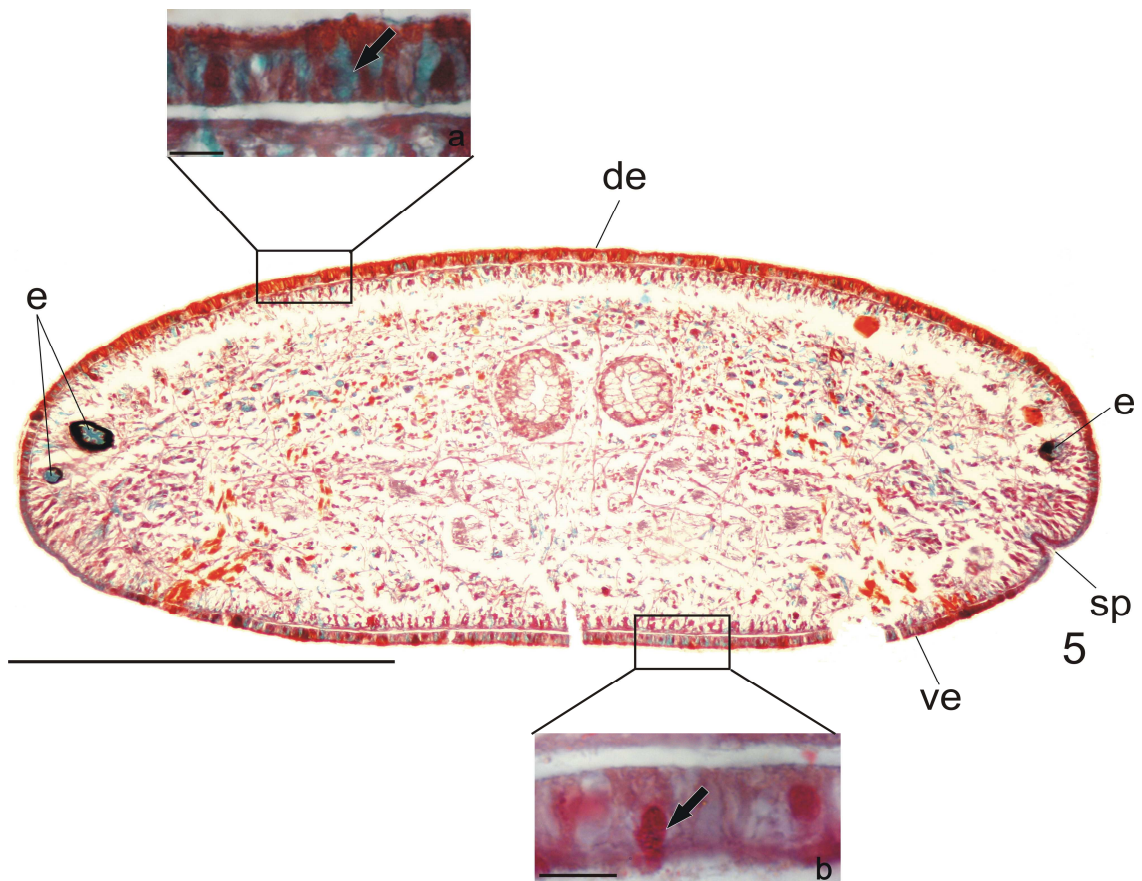


Figura 5. *G. ladislavii*: Corte transversal da região anterior do exemplar 2213. (a) células secretoras do tipo D2; (b) células do tipo V1. De: epiderme dorsal; e: olhos; sp: fosseta sensorial; ve: epiderme ventral. As setas apontam os grânulos de secreção. Coloração: (a): Masson/Goldner; (b): Azan/Heidenhain. Barras: (5): 0,5 mm; (a) e (b): 0,01 mm.

Tabela V: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da região anterior de *Geoplana ladislavii*. --: secreção amorfa; *: comprimento e largura das células rabaditógenas; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
D1	0,8 (\pm 0,2)	Vermelho	Laranja	++	-	+++	-	Eritrófila/Xantófila	Proteína básica
D2	21 x 4*	Vermelho	Vermelho-alaranjado	++	-	-	-	Eritrófila/xantófila	Proteína básica
D3	1,5 (\pm 0,3)	Azul claro	Verde claro	-	-	-	-	Cianófila	-
V1	2,5 (\pm 0,3)	Vermelho	Laranja	++	-	++	+++	Xantófila	Proteína básica
V2	13 x 4*	Vermelho	Vermelho-alaranjado	-	-	-	-	Eritrófila/xantófila	-

Região Pré-faríngea (figura 6, tabela VI)

Na região pré-faríngea desembocam nove tipos de células secretoras. Quatro tipos na epiderme dorsal (células eritrófilas ou xantófilas – D1, rabditógenas – D2, cianófilas – D3 e xantófilas – D4) e três na epiderme ventral (células eritrófilas – V1, rabditógenas – V2 e cianófilas – V3) Dois tipos de células secretoras desembocam nas margens do corpo, formando o bordo glandular (células células eritrófilas ou xantófilas – BG1 e cianófilas – BG2). As células secretoras D1 e V1 são rabditógenas e desembocam no dorso e no ventre de *G. ladislavii*, respectivamente. As células do tipo D1 são fortemente positivas ao Bromofenol e moderadamente positivas ao PAS e a Ninhydrin-Schiff, contendo glicoproteína (tabela VI). As células do tipo V1 reagem fortemente a Ninhydrin-Schiff, moderadamente ao Bromofenol e fracamente ao PAS, indicando ser também uma glicoproteína (tabela VI). O segundo tipo de célula secretora (tipo V2) é eritrófila com secreção granular grossa (tabela VI). O tipo D2 reage fortemente ao Bromofenol e ao DMAB e o tipo V2 reage moderadamente ao Bromofenol. Os dois tipos de células apresentam secreção protéica básica (tabela VI).

As células dos tipos D3 e V3 são cianófilas com secreção amorfa. Apenas as células que desembocam no ventre (V3) reagem moderadamente ao Alcian-Blue, indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela VI). Ainda na epiderme dorsal observa-se um tipo de secreção xantófila (tipo D4) que reage fracamente ao Bromofenol, indicando presença de proteína básica (tabela VI).

Nas margens do corpo, duas células secretoras se agrupam para formar o bordo glandular. Um tipo é eritrófila/xantófila de granulação grossa (tipo BG1) e o outro tipo é cianófila de secreção amorfa (tipo BG2). As células do tipo BG1 reagem fortemente ao Bromofenol e moderadamente ao DMAB, indicando secreção protéica (tabela VI). As células do tipo BG2 reagem moderadamente ao Alcian-Blue, indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela VI).

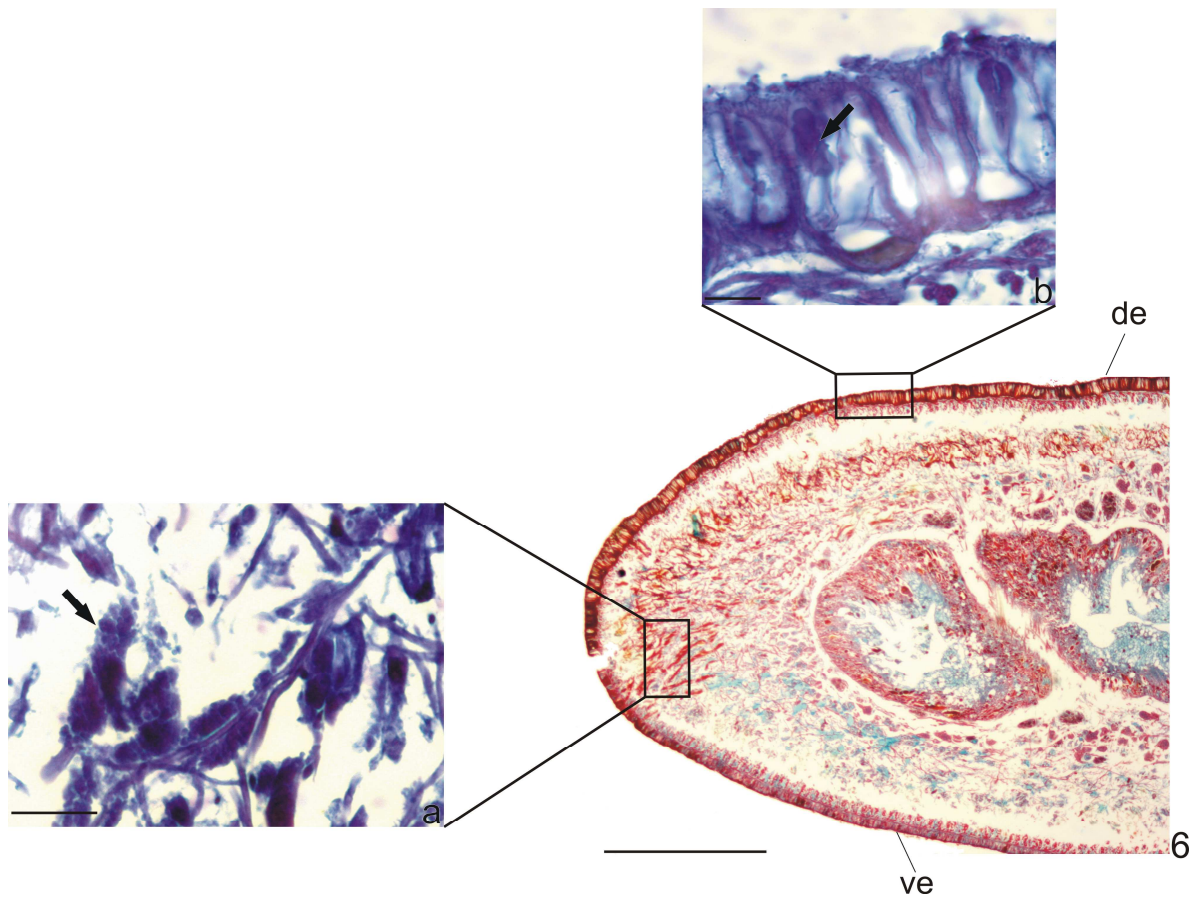


Figura 6. *G. ladislavii*: Corte transversal da região pré-faríngea do exemplar 2213. (a) células secretoras do tipo D2; (b) células do tipo BG1. De: epiderme dorsal; ve: epiderme ventral. As setas indicam os grânulos de secreção. Coloração: azul de Bromofenol. Barras: (5): 0,5 mm; (a) e (b): 0,01 mm.

Tabela VI: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da região pré-faringea de *Geoplana ladislavii*.--: secreção amorfa; *: comprimento e largura das células rabditógenas; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
D1	1,1 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho-alaranjado	+++	+ PAS	-	+	Eritrófila/xantofila	Glicoproteína
D2	30 x 4*	Vermelho	Vermelho-alaranjado	+++	-	+++	+	Eritrófila/xantofila	Proteína básica
D3	--	Azul claro	Verde claro	-	-	-	-	Cianófila	-
D4	0,7 (\pm 0,2)	Laranja	Alaranjado	+	-	-	-	Xantófila	Proteína básica
V1	18 x 7*	Alaranjado	Vermelho	++	+ PAS	-	+++	Xantófila	Glicoproteína
V2	0,6 (\pm 0,09)	Vermelho	Alaranjado	++	-	+	-	Xantófila	Proteína básica
V3	--	Verde claro	Azul claro	-	++ AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
BG1	1,2 (\pm 0,3)	Vermelho	Vermelho-alaranjado	+++	-	+	-	Eritrófila/xantofila	Proteína básica
BG2	--	Azul claro	Verde claro	-	++ AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas

Faringe (figura 7, tabela VII)

Na faringe observam-se quatro tipos de células secretoras, todas com corpos celulares localizados no mesênquima, posteriormente à faringe. O primeiro tipo de célula (tipo F1) produz secreção cianófila amorfa, composta por proteína básica, reagindo fortemente ao azul de Bromofenol (tabela VII, figura 7a). As células secretoras do tipo F2 são eritrófilas/xantófilas com secreção granular fina. Essas células reagem moderadamente ao PAS, indicando presença de glicoconjugados neutros (tabela VII). O terceiro tipo de célula secretora (tipo F3) é eritrófila com secreção glicoprotéica, reagindo fortemente ao DMAB, moderadamente a Ninhydrin-Schiff e fracamente ao PAS (tabela VII, figura 7b). As células do tipo F4 também são cianófilas, porém com secreção granular fina. Essas células reagem fortemente ao Bromofenol (tabela VII), indicando secreção protéica.

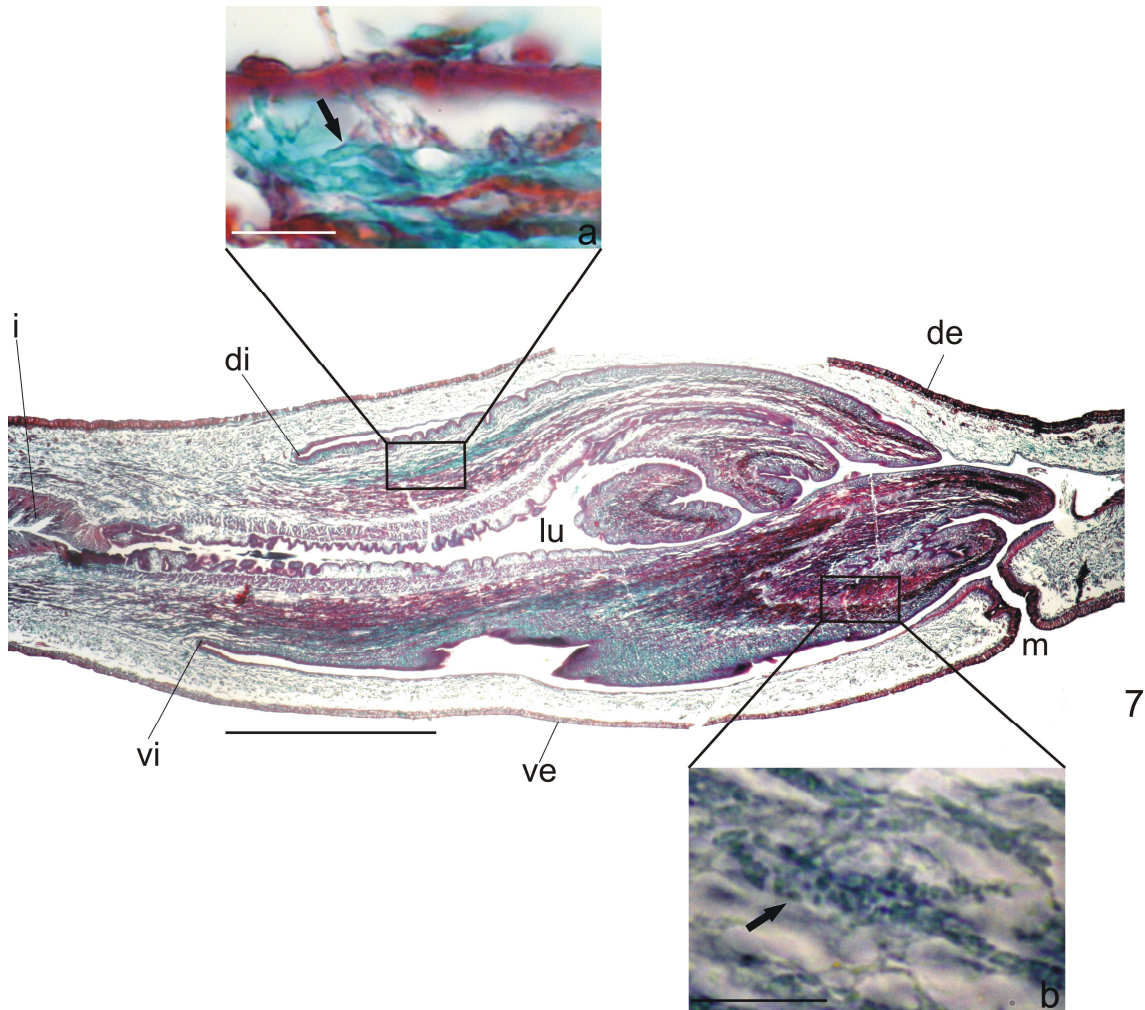


Figura 7. *G. ladislavii*: Corte sagital da faringe do exemplar 2213. (a) células secretoras do tipo F1; (b) células do tipo F3. De: epiderme dorsal; di: inserção dorsal; i: intestino; lu: lúmen faringeal; m: boca; vi: inserção ventral; ve: epiderme ventral. As setas indicam os grânulos de secreção. Coloração: (a) Masson/Goldner; (b) DMAB. Barras: (5): 0,5 mm; (a) e (b): 0,01 mm.

Tabela VII: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras da faringe de *Geoplana ladislavii*. --: secreção amorfa; -: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

	Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
F1	--	Azul claro	Verde	+++	-	-	-	Cianófila	Proteína básica
F2	0,8 (\pm 0,2)	Vermelho claro	Laranja	-	+ PAS	-	-	Eritrófila/Xantófila	Glicoconjugados neutros
F3	0,8 (\pm 0,3)	Vermelho	Vermelho	-	+ PAS	+++	++	Eritrófila	Glicoproteína
FIV	0,9 (\pm 0,1)	-	Lilás	+++	-	-	-	Cianófila	Proteína básica

Aparelho copulador (figura 8, tabela VIII)

Geoplana ladislavii apresenta dois tipos de células secretoras (VE1 e VE2) desembocando na vesícula prostática. As células secretoras do tipo VE1 são eritrófilas com granulação grossa são moderadamente positivas ao Bromofenol e ao DMAB indicando um tipo de proteína básica. O segundo tipo de célula secretora (tipo VE2) é cianófila com secreção amorfa. Essa célula não reagiu a nenhuma reação histoquímica. Os corpos celulares de ambas as células estão localizados no mesênquima, próximos à vesícula.

A papila penial recebe a desembocadura de células secretoras eritrófilas de granulação fina (tipo PP1) e células cianófilas de secreção amorfa (tipo PP2), ambas com corpos celulares externos à capa muscular comum. As células secretoras do tipo PP1 reagem moderadamente ao Bromofenol e a Ninhydrin-Schiff e fracamente ao DMAB, indicando presença de secreção protéica (tabela VIII). As células do tipo PP2 reagem fracamente ao Alcian-Blue, contendo glicosaminoglicanas (tabela VIII). No ducto ejaculatório desemboca um tipo de célula cromófoba (tipo DE1), que não reagiu às reações utilizadas (tabela VIII).

Três tipos de células secretoras, com corpos celulares internos à capa muscular desembocam através do epitélio de revestimento do átrio masculino: células eritrófilas com secreção granular fina (tipo AM1), células cianófilas com secreção amorfa (tipo AM2) e células eritrófilas/xantófilas com secreção granular grossa (tipo AM3). O primeiro tipo de célula secretora reage fortemente ao DMAB, indicando secreção protéica (tabela VIII). As células secretoras AM2 são fracamente positivas ao Alcian-Blue indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela VIII). As células do terceiro tipo reagem moderadamente ao DMAB, indicando presença de proteína básica (tabela VIII).

O átrio feminino recebe a desembocadura de dois tipos abundantes de células secretoras: células eritrófilas de granulação grossa (AF1) e células secretoras cianófilas com secreção amorfa (AF2). As células eritrófilas são fortemente positivas ao Bromofenol, indicando secreção protéica; as células cianófilas são moderadamente positivas ao Alcian-Blue, indicando presença de glicosaminoglicanas (tabela VIII). Os corpos celulares de ambas as células são externos e próximos da capa muscular.

Na vagina desembocam dois tipos de células secretoras (VA1 e VA2). O primeiro tipo (VA1) libera secreção eritrófila que reage moderadamente ao DMAB, indicando presença de proteína básica (tabela VIII). As células secretoras do segundo tipo (VA2)

são cianófilas com secreção granular amorfa. Essa secreção é moderadamente positiva ao Alcian Blue, indicando a presença de glicosaminoglicanas (tabela VIII). Ambas as células apresentam corpos celulares externos à capa muscular. As glândulas da casca (tipo GC1), desembocando nas porções terminais dos ovoviteloductos e no ovoviteloducto glandular comum, produzem secreção eritrófila, fracamente positiva ao PAS e fortemente positiva a Ninhydrin-Schiff, indicando presença de glicoproteína (tabela VIII).

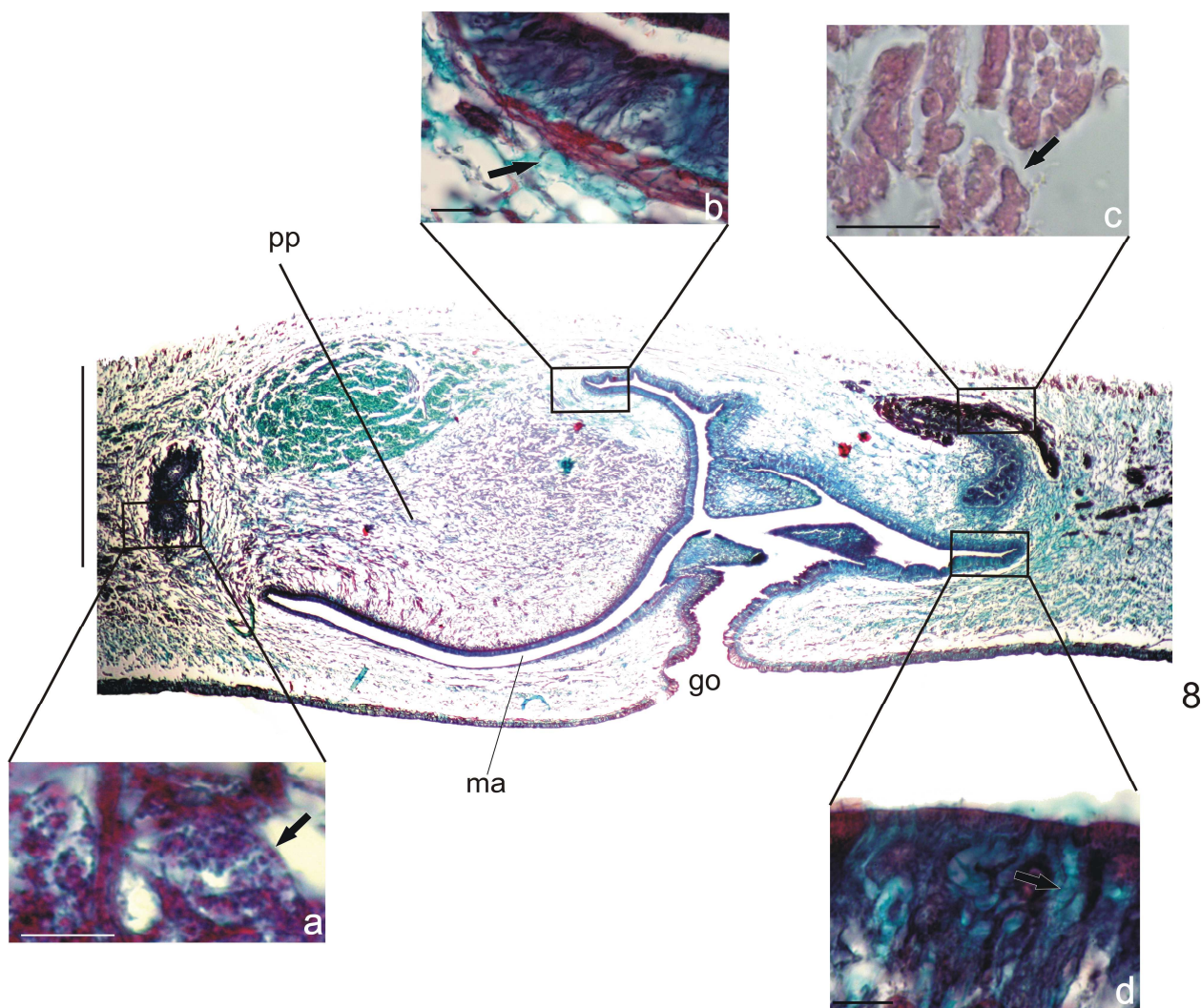


Figura 8. *Geoplana ladislavii*: Corte sagital do aparelho copulador do exemplar 2213. (a) células secretoras do tipo PV1; (b) células do tipo MA2; (c) células do tipo GC1; (d) células do tipo FA2. go: gonóporo; ma: átrio masculino; pp: papila penial. As setas indicam os grânulos de secreção. Coloração: a: azul de Bromofenol; b e d: Masson/Goldner; c: Ninhydrin- Schiff. Barras: (8): 1 mm; (a), (b), (c) e (d): 0,01 mm.

Tabela VIII: Coloração, diâmetro médio (μm) e desvio padrão dos grânulos secretores e tipo de secreção das células secretoras do aparelho copulador de *Geoplana ladislavii*. --: secreção amorfa-: reação negativa; +: fracamente positivo; ++: moderadamente positivo; +++: fortemente positivo.

		Diâmetro e desvio padrão (μm)	Azan/Heidenhain	Masson/Goldner	Azul de Bromofenol	AB/PAS	DMAB	Ninhydrin	Tricrômico	Natureza da secreção
Vesícula prostática	VE1	1,4 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	++	-	++	-	Eritrófila	Proteína básica
	VE2	--	Azul claro	Verde	-	-	-	-	Cianófila	-
Papila penial	PP1	0,7 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	++	-	+	++	Eritrófila	Proteína básica
	PP2	--	Azul claro/lilás	verde	-	+AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Átrio masculino	MA1	0,8 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	-	-	+++	-	Eritrófila	Proteína básica
	MA2	--	Azul claro/lilás	Verde	-	+AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
	MA3	2,4 (\pm 0,2)	Vermelho/alaranjado	Verde	-	-	++	-	Eritrófila/xantofila	Proteína básica
Átrio feminino	FA1	2,6 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	-	-	+++	-	Eritrófila	Proteína básica
	FA2	--	Azul claro/lilás	Verde	-	++AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Vagina	VA1	2,2 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	-	-	++	-	Eritrófila	Proteína básica
	VA2	--	Azul claro/lilás	Verde	-	++AB	-	-	Cianófila	Glicosaminoglicanas
Ovoviteloducto glandular comum	GC1	0,8 (\pm 0,2)	Vermelho	Vermelho	-	+PAS	-	+++	Eritrófila	Glicoproteína
Ducto ejaculatório	DE1	--	Cromófoba	Cromófoba	-	-	-	-	Cianófila	-

Em conclusão, as duas espécies crípticas analisadas no presente estudo apresentam muitas características morfológicas semelhantes, mas os resultados histoquímicos confirmam a diferenciação entre essas espécies. Quanto às células que desembocam na epiderme da região anterior e da região pré-faríngea, as espécies analisadas diferem quanto ao tipo de secreção. *Geoplana* sp. apresenta secreções protéicas, glicoprotéicas e com glicoconjugados neutros, enquanto em *G. ladislavii* não ocorrem células com glicoconjugados neutros, apenas com glicosaminoglicanas. Em relação ao bordo glandular, além de haver um tipo de célula secretora adicional em *Geoplana* sp. em relação a *G. ladislavii*, a composição química das secreções difere entre as duas espécies. Além de secreções protéicas, em *G. ladislavii*, há secreções compostas por glicosaminoglicanas, enquanto em *Geoplana* sp. ocorrem glicoconjugados neutros. Quanto às glândulas faríngeas, há um tipo celular adicional em *G. ladislavii* em relação a *Geoplana* sp., mas os tipos de secreção identificados nessas glândulas (protéica e glicoprotéica) são similares nas duas espécies. Quanto à composição de células secretoras do aparelho copulador, as espécies se diferenciam. Em relação às células secretoras da vesícula prostática, ambas as espécies apresentam os mesmos tipos, eritrófilas e cianófilas. As células eritrófilas possuem secreção protéica. Porém, em *G. ladislavii* as células cianófilas não reagiram as colorações utilizadas. Na papila penial de *Geoplana* sp. desembocam três tipos de células secretoras (eritrófilas, xantófilas e cianófilas) com secreção protéica, glicoprotéica e com glicosaminoglicanas. *G. ladislavii* não apresenta células xantófilas e as células cianófilas desembocam em grande quantidade na inserção ventral da papila penial. As células secretoras da papila penial apresentam composição química semelhante às de *Geoplana* sp. No útero feminino, *Geoplana ladislavii* apresenta secreções contendo proteína básica e glicosaminoglicanas; *Geoplana* sp. apresenta secreções glicoprotéicas e não protéicas. Ambas as espécies apresentam células eritrófilas e cianófilas desembocando na vagina. Porém, em *G. ladislavii* há células com glicosaminoglicanas e proteína básica.

DISCUSSÃO

Similarmente ao observado nas duas espécies estudadas, células secretoras rabditógenas, eritrófilas, xantófilas e cianófilas ocorrem desembocando na epiderme dorsal e/ou ventral de outros tricládidos terrestres (Graff, 1899, Froehlich, 1955a Winsor, 1998a). Em determinadas espécies, um número variável de células secretoras se agrupam nas margens do corpo constituindo o bordo glandular. Nas duas espécies analisadas, essa estrutura é mais conspícua em *Geoplana* sp. do que em *G. ladislavii*.

As células rabditógenas são características dos Rhabditophora, produzindo secreções protéicas em forma de bastão chamadas rabditos (Rieger *et al.* 1991). Essa secreção é classificada de acordo com a sua localização, sendo chamados de rabditos dermais, quando estão localizados na epiderme ou rabditos adenais, quando se localizam no mesênquima (Hyman, 1951). Os rabditos adenais são considerados verdadeiros e os rabditos dermais, pseudo-rabditos (Smith *et al.*, 1982). Ambas as espécies analisadas apresentam rabditos adenais, constituídos por secreção proteica. Esse resultado é similar ao obtido para a espécie *Choeradoplana iheringi* (Souza & Leal-Zanchet, 2004), bem como para os Dugesiidae *Girardia tigrina*, *Polycelis nigra* e *Phagocata vitta* (Smith *et al.*, 1982). Os ramnitos, os quais são adenais, são um tipo muito comum de rabditos (Hyman, 1951). Eles estão distribuídos dorsolateralmente, são longos e sinuosos, podendo ultrapassar a altura do epitélio (Hyman, 1951, Winsor, 1998a). Nas espécies estudadas, observa-se a presença de ramnitos, sendo mais abundantes em *G. ladislavii*. Winsor (1998a) sugere que os rabditos podem ter três funções: repugnatória, formando uma camada viscosa sobre o dorso que apresenta sabor desagradável; produção de uma capa protetora (proteica) que previne a dessecação do verme e servir como meio de excreção de metabólitos.

As glândulas faríngeas de ambas as espécies analisadas desembocam próximas ao epitélio externo da faringe. A localização das glândulas faríngeas é similar em *Ch. Iheringi* (Souza & Leal-Zanchet, 2004). Quanto à função dessas células, Bresslau (1928) e Hyman (1951) sugerem que elas auxiliam na imobilização e digestão da presa. Segundo Jennings (1974), as glândulas eritrófilas que desembocam na faringe contêm endopeptidases, que auxiliam na ruptura do corpo da presa no momento da captura, antes do seu conteúdo ser sugado através da faringe para o intestino.

A vesícula prostática de *Geoplana* sp. e de *G. ladislavii* apresentam os mesmos tipos de células secretoras, eritrófilas e cianófilas. Em ambas as espécies as secreções são protéicas, similarmente a *Choeradoplana iheringi* e *Ch. marthae* (Souza

& Leal-Zanchet, 2004, Froehlich, 1955a). Nesta região do aparelho copulador, os espermatozoides são associados a secreções nutritivas para serem transferidos, durante a cópula, através do ducto ejaculatório para o átrio feminino do parceiro. Nos tricládidos, a cavidade atrial se divide em átrio masculino e átrio feminino. Não há critérios anatômicos que os diferenciem. Essa diferenciação pode ocorrer através do tipo de epitélio e das secreções que desembocam nos átrios (Winsor, 1998a). De acordo com esse autor, os átrios são responsáveis pela cópula e podem apresentar as funções de contribuir na formação e reabsorção do casulo além de funcionar como uma bursa, recebendo e possivelmente nutrindo o ejaculado, além de reabsorver espermatozoides excedentes. Nas espécies analisadas, o átrio masculino é ocupado por uma papila penial assimétrica, a qual se projeta a partir do dorso do átrio masculino. Os ovos são conduzidos pelos ovoviteloductos até a vagina, que se comunica com o átrio feminino. Este é ovalado, revestido por epitélio de aparência estratificada nas espécies analisadas. Na região em que os dois ovoviteloductos se encontram, recebem grande quantidade das glândulas da casca, que auxiliam na formação da parede externa do casulo (Winsor, 1998a). *Geoplana* sp. apresenta glândulas da casca com secreção protéica, similarmente ao observado por Winsor (1998a) para *P. manokwari*, enquanto que em *G. ladislavii* as mesmas produzem secreção glicoprotéica.

Nas duas espécies analisadas, as glândulas cianófilas foram encontradas em todas as regiões do corpo analisadas. Na epiderme da região anterior do corpo de *G. ladislavii* encontram-se células de granulação grossa; na epiderme da pré-faringe e no bordo glandular, células com secreção amorfa. A faringe possui dois tipos de células cianófilas, um tipo com secreção amorfa e outro de granulação fina. *Geoplana* sp. se diferencia por apresentar na epiderme da região anterior do corpo e na pré-faringe células cianófilas de granulação fina e amorfa; no bordo glandular e na faringe somente do tipo amorfa. No aparelho copulador das duas espécies, encontram-se células cianófilas somente com secreção amorfa na vesícula prostática, papila penial, e na vagina. Adicionalmente, em *G. ladislavii*, esse tipo de secreção ocorre nos átrios masculino e feminino. Já nos átrios masculino e feminino de *Geoplana* sp., ocorrem dois tipos de células cianófilas (com secreção amorfa e com secreção granular). As glândulas cianófilas são consideradas glândulas mucosas (Graff, 1899). O autor observou nos exemplares analisados que estas glândulas desembocam em maior quantidade na epiderme ventral dos Terrícola. A distribuição das secreções cianófilas da epiderme das duas espécies de *Geoplana* analisadas é similar às observações de Graff (1899) e de Froehlich (1955a) na espécie-tipo do gênero, *Geoplana vaginuloides*

Darwin, 1844. Winsor (1998a) descreve dois tipos de células secretoras cianófilas para a epiderme dos Terricola, uma constituída por glicosaminoglicanas e outra constituída por glicoconjugados neutros. Em ambas as espécies analisadas no presente estudo, as secreções cianófilas da epiderme são constituídas por glicoconjugados neutros. *Platydemus manokwari*, *P. monticola* e *Ch. Iheringi* também apresentam a mesma distribuição de células cianófilas (Winsor, 1983, 1990, 1998a; Souza & Leal-Zanchet, 2004), porém em *Ch. Iheringi*, estas células secretam glicosaminoglicanas (Souza & Leal-Zanchet, 2004). Segundo Winsor (1998a), o muco produzido por essas células é acumulado na superfície ventral do corpo das planárias terrestres, auxiliando o deslizamento do animal através da sola rastejadora. Já as células secretoras cianófilas do átrio masculino, papila penial e do átrio feminino que reagiram positivamente ao Alcian Blue podem estar associadas com a lubrificação dos órgãos masculinos durante a cópula (Winsor, 1998a).

Quanto à presença de glândulas eritrófilas, *G. ladislavii* apresenta um tipo de célula com granulação fina e outro com granulação grossa na epiderme dorsal e ventral. *Geoplana* sp. apresenta apenas um tipo de célula eritrófila com granulação fina na epiderme dorsal. O bordo glandular de ambas as espécies é constituído por apenas um tipo de célula eritrófila com secreção grossa. Na faringe de *G. ladislavii* desembocam dois tipos de células eritrófilas de granulação fina, enquanto em *Geoplana* sp. a faringe apresenta apenas um tipo com secreção grossa. Quanto ao aparelho copulador, *G. ladislavii* apresenta na vesícula prostática, no átrio feminino na vagina e no ovoviteloducto glandular comum células eritrófilas com granulação grossa. *Geoplana* sp. se diferencia por apresentar um tipo com secreção fina desembocando na vagina e um tipo de secreção grossa desembocando no ovoviteloducto glandular comum. Na papila penial e no átrio masculino, ambas as espécies apresentam um tipo de célula eritrófila de granulação fina.

Assim, a distribuição das células eritrófilas é similar em *Geoplana* sp. e em *G. ladislavii*, bem como em relação a *G. vaginuloides*, conforme descrito por Froehlich (1955a). Winsor (1983, 1998a) afirma que nos Terricola, de maneira geral, esse tipo de glândula desemboca em toda a superfície do corpo, concentrando-se na zona adesiva marginal. O autor descreveu dois tipos de células secretoras eritrófilas desembocando na epiderme dos Terricola. O tipo I é caracterizado por apresentar grânulos finos e o tipo II por apresentar grânulos grossos. As células do tipo I, conforme Winsor (1998a), estão associadas à função de evitar a perda de umidade corporal ou a uma função adesiva. Algumas células eritrófilas podem conter proteínas que podem ser enzimas proteolíticas ou precursores de enzimas, por isso são também

encontradas na faringe (Winsor, 1998a). No aparelho copulador, essas células estão associadas com a degradação dos produtos copulatórios. As análises histoquímicas de ambas as espécies demonstraram que as secreções produzidas pelas células eritrófilas são de natureza protéica (proteína básica), similarmente às de *Bipalium kewense* (Winsor, 1983, 1998a) e de *Choeradoplana iheringi* (Souza & Leal-Zanchet, 2004).

Células xantófilas foram observadas na epiderme da região anterior do corpo de *G. ladislavii* e de *Geoplana* sp. Adicionalmente, esse tipo de célula secretora ocorre no bordo glandular, na faringe, na papila penial e nos átrios masculino e feminino. Segundo Winsor (1998a) essas células possuem função adesiva e também estão associadas com a degradação dos produtos copulatórios. Na epiderme de ambas as espécies essas células são compostas por proteína básica, glicoproteína ou não apresentaram resultado positivo às reações utilizadas. As células eritrófilas apresentam a mesma composição. Na região da faringe e nos órgãos copulatórios, as células xantófilas são compostas por proteína básica e glicoproteína, similarmente às eritrófilas.

Assim, os resultados obtidos indicam diferenças em relação aos tipos de glândulas e à composição das secreções da epiderme, da faringe e dos órgãos copuladores de *G. ladislavii* e de *Geoplana* sp. Dessa forma, pode-se concluir que a análise histoquímica das células secretoras pode ser utilizada na caracterização de espécies de tricládidos, em especial quando se tratam de espécies crípticas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de produtividade em pesquisa e pós-graduação concedidas respectivamente à Ana Maria Leal-Zanchet e Silvana Vargas do Amaral. Às laboratoristas Letícia Guterres e Rafaela Canello pelo auxílio no processamento histológico. Ao biólogo Piter Boll pelo auxílio na coleta dos espécimes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, S.V.; OLIVEIRA, S.M.; LEAL-ZANCHET, A.M., 2012. Three new species of *Geoplana* Stimpson, 1857 and considerations about the complex of species "Geoplana rufiventris Graff, 1899" **Zootaxa**, **3338**: 1-32.
- BRESSLAU, E. 1928-33. **Turbellaria**. In W. Kükenthal and T. Krumbach (eds.). *Handbuch der Zoologie*, Vol. II, Part I. Berlin: Walter de Gruyter. 52-304.
- CARBAYO, F. & LEAL-ZANCHET, A. M. 2003. Two new genera of geoplanid land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) of Brazil in the light of cephalic specialisations. **Invertebrate Systematics** **17**(3): 449-468.
- FERNANDES, M. C.; ALVARES, E. P.; GAMA, P.; SILVEIRA, B. 2003. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*.
- FROEHLICH, C.G. 1955a. Sobre morfologia e taxonomia das Geoplanidae. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, Série Zoologia, 19: 195-279.
- FROEHLICH, C.G. 1955b. Notas sobre geoplanas brasileiras (Turbellaria Tricladida). *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, 12(7): 189–198.
- FROEHLICH, C.G. 1959. On geoplanids from Brazil. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, série Zoologia, **22**: 201-265.
- GRAFF, L. 1899. **Monographie der Turbellarien**: II. Tricladida Terricola. Leipzig, Engelmann. 574 p.
- HYMAN, L. H. **The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria**. New York: McGraw-Hill, 1951.

- JENNINGS, J. B., 1974, **Digestive physiology of the Turbellaria**, pp. 173-197. *In*: N. W. Riser & M. P. Morse (eds.), *Biology of the Turbellaria*. McGraw-Hill, New York, 530p.
- MARCUS, E., 1951. Turbellaria brasileiros. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, série Zoologia, **16**: 51-214
- PEARSE, A. G. E. 1968. **Histochemistry theoretical and applied**. 3.Ed., Vol I, London: J. & A. Churchill Ltd. 756p.
- RIEGER, R. M.; TYLER, S.; SMITH III, J. P. S. & RIEGER, G. 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. *In*: HARRISON, F. W.; BOGITSH, B. J., eds. **Microscopic anatomy of invertebrates**. Vol. 3. Platyhelminthes and Nemertinea. New York: Wiley-Liss, Inc. p. 47-68.
- ROMEIS, B., 1989. **Mikroskopische Technik**. München, Urban und Schwarzenberg. 697 p.
- SMITH, J. III; TYLER, S.; THOMAS, M. B. & RIEGER, R. M. 1982. The morphology of Turbellarian Rhabdites: Phylogenetic Implications. **Transactions of the American Microscopical Society** **101** (3): 209-228.
- SOUZA, S. A. & LEAL-ZANCHET, A. M., 2004. Histological and histochemical characterization of the secretory cells of *Choeradoplana iheringi* graff, 1899 (platyhelminthes: tricladida: terricola). **Brazilian Journal of Biology**, **64**(2): 511-522.
- WINSOR, L. 1983. A revision of the cosmopolitan land planarian *Bipalium kewense* Moseley, 1878 (Turbellaria: Tricladida: Terricola). **Zoological Journal of the Linnean Society**, **79**: 61-100.
- WINSOR, L. 1990. **Taxonomic studies on free-living flatworms (Turbellaria: Platyhelminthes) of the Australasian zoogeographic region**. Master of Science Thesis, unpublished, Faculty of Science of the James Cook University of North Queensland, Townsville, 175p.

WINSOR, L. 1998a. Aspects of taxonomy and functional histology in terrestrial flatworms (Tricladida: Terricola). **Pedobiologia**. **42**: 412-431.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* Graff, 1899 se diferenciam por características anatômicas, histoquímicas e histológicas, tais como coloração do dorso e do ventre, distribuição dos olhos, tipos de células secretoras do bordo glandular e do átrio masculino e posição da vesícula prostática.
2. A análise molecular corrobora o resultado da comparação dos dados morfológicos, indicando que *Geoplana* sp. e *G. ladislavii* Graff, 1899 são espécies distintas.
3. *Geoplana* sp. apresenta um conjunto de características que a diferencia das demais espécies do gênero, representando uma espécie nova para a ciência.
4. Análises histoquímicas das células secretoras podem ser utilizadas na caracterização de espécies, principalmente quando se trata de espécies crípticas
5. As análises moleculares em conjunto com as análises morfológicas demonstraram ser uma importante ferramenta na identificação taxonômica de espécies crípticas de planárias terrestres.
6. Verifica-se a necessidade de ampliação das análises moleculares em diferentes espécies e gêneros de planárias terrestres visando determinações taxonômicas mais acuradas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-PRESAS, M., BAGUÑÀ, J. & RITOURT, M. 2008. Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): from freshwater to land and back. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **47**: 555-568.
- ALVAREZ-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**: 1-10.
- AMARAL, S.V.; OLIVEIRA, S.M.; LEAL-ZANCHET, A.M., 2012. Three new species of *Geoplana* Stimpson, 1857 and considerations about the complex of species "Geoplana rufiventris Graff, 1899" **Zootaxa**, **3338**: 1-32.
- ANTUNES, M. B.; MARQUES, D. I. L. & LEAL-ZANCHET, A. M. 2008. Composição das comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terrícola) em duas áreas de floresta estacional decidual do sul do Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, **31**:34-38
- BAGUÑÀ, J., CARRANZA, S., PAPS, J., RUIZ-TRILLO, I., & RITOURT, M. 2001. Molecular taxonomy and phylogeny of the Tricladida. In: Interrelationships of the Platyhelminthes (Littlewood, D.T.J. and Bray, R., Eds.). 6: 49-56.
- BAPTISTA, V. A.; MATOS, L. B.; FICK, I.A. & LEAL-ZANCHET, A. M. 2006. Composição de comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terrícola) do Parque Nacional dos Aparados da Serra, Brasil. **Iheringia**, **96**: 293-297.

- CARBAYO, F.; LEAL-ZANCHET, A. M. & VIEIRA, E. M. 2002. Flatworms (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) diversity versus man-induced disturbance in ombrophilous rainforest from Southern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, **11**: 1091-1104.
- CARBAYO, F. 2010. A new genus for seven Brazilian land planarian species, split off from *Notogynaphallia* (Platyhelminthes, Tricladida). **Belgian Journal of Zoology**, **140**: 91-101.
- CARRANZA, S.; RUIZ-TRILLO, I.; LITTLEWOOD, D. T. J.; RIUTORT, M. & BAGUÑÀ, J. 1998. A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences. **Pedobiologia**. **42**: 443-440.
- CASTRO, R. A. & LEAL-ZANCHET, A. M. 2005. Composição de comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes) em áreas de floresta estacional decidual e de campo na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **27**(3): 147-150.
- FICK, I. A.; LEAL-ZANCHET, A. M. & VIEIRA, E. M. 2006. Community structure of land flatworms (Platyhelminthes, Terricola): comparisons between Araucaria and Atlantic forest in Southern Brazil. **Invertebrate Biology**, **125**(4): 306–313.
- FROEHLICH, C.G. 1955a. Sobre morfologia e taxonomia das Geoplanidae. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Série Zoologia**, **19**: 195-279.
- FROEHLICH, E. M. 1955a. Sobre espécies brasileiras do gênero *Geoplana*. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, série Zoologia, **9**: 289-369.
- FROEHLICH, C. G. 1967. A contribution to the zoogeography of neotropical land planarians. **Acta Zoologica Lilloana**, **23**: 153-162.
- FROEHLICH, C.G. 1959. ON GEOPLANIDS FROM BRAZIL. **BOLETIM DA FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, SÉRIE ZOOLOGIA**, **22**: 201-265.

- GRAFF, L. 1899. **MONOGRAPHIE DER TURBELLARIEN: II. TRICLADIDA TERRICOLA**. LEIPZIG, ENGELMANN. 574 P.
- GRAU, J. H. 2010. **Relações filogenéticas entre os gêneros de Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida) inferidas de caracteres morfológicos**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 156 pp.
- JINBO, U.; KATO, T. & ITO, M. 2011. Current progress in DNA Barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**, **14**: 107-124.
- LEAL-ZANCHET, A. M. & BAPTISTA, V.A. 2009. Planárias terrestres (Platyhelminthes:Tricladida) em remanescentes de Floresta com Araucária. **Floresta com Araucária: Ecologia, Conservação e Desenvolvimento Sustentável**. **19**: 199-207.
- LEAL-ZANCHET, A. M. & MATOS, L. B. 2011. *Geoplana multicolor* Graff (Platyhelminthes: Tricladida): new records and taxonomic re-interpretation of morphological characters. **Zootaxa**, **2804**: 41–55
- OGREN, R. E.; KAWAKATSU, M. & FROEHLICH, E. M. 1997. Additions and corrections of the previous Isnd planarian indices of the world (Turbellaria, Seriata, Tricladida, Terricola), **Bulletin Fuji Women's College**, **35** (2): 55-61.
- OGREN, R. E.; KAWAKATSU, M. & FROEHLICH, E. M. 1997. Additions and corrections of the previous Isnd planarian indices of the world (Turbellaria, Seriata, Tricladida, Terricola), **Bulletin Fuji Women's College**, **35** (2): 55-61.
- SEITENFUS, A. L. R. & LEAL-ZANCHET, A. M. 2004. Uma introdução à morfologia e taxonomia de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terrícola). **Acta Biologica Leopoldensia**, **26**: 187-202.
- SLUYS, R.; KAWAKATSU, M.; RIUTORT, M. & BAGUÑA, J. 2009. A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida). **Journal of Natural History**, **43** (29-30): 11763-1777.