

SUELLEN APARECIDA ZATTI

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PARASITOS DO FILO MYXOZOA
EM PEIXES *Prochilodus costatus* E *Prochilodus argenteus* DO RIO SÃO FRANCISCO,
MG E *Prochilodus lineatus* DO RIO MOGI GUAÇU, SP

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Campus de Diadema, UNIFESP, para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Evolução.

DIADEMA - SP

2013

ALUNA: SUELLEN APARECIDA ZATTI
ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON APARECIDO ADRIANO

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PARASITOS DO FILO MYXOZOA
EM PEIXES *Prochilodus costatus* E *Prochilodus argenteus* DO RIO SÃO FRANCISCO,
MG E *Prochilodus lineatus* DO RIO MOGI GUAÇU, SP

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Campus de Diadema, UNIFESP, para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Evolução.

DIADEMA - SP

2013

Ficha catalográfica

Dados de Catalogação na Publicação
Serviço de Biblioteca da Universidade Federal de São Paulo

Zatti, Suellen Aparecida.

Descrição morfológica e molecular de parasitos do filo Myxozoa em peixes *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus* do rio São Francisco, MG e *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, SP. Zatti, Suellen Aparecida. - Diadema, 2013.
xi, 59f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Campus de Diadema. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução.

Título em inglês: Morphological and molecular description of phylum Myxozoa parasites in fishes *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* from the São Francisco River, MG and *Prochilodus lineatus* from the Mogi Guaçu River, SP.

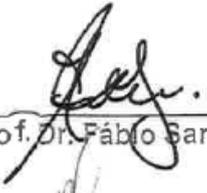
1. Myxozoa. 2. Prochilodontidae 3. 18S rDNA. 4. Ultraestrutura. 5. Filogenia.

Termo de aprovação

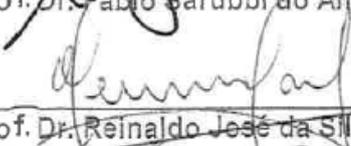
Descrição morfológica e molecular de parasitos do filo Myxozoa em peixes *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus* do rio São Francisco, MG e *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, SP

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera a **Sra. Suellen Aparecida Zatti** APROVADA (Aprovada/Reprovada) a receber o título de MESTRE EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E por estarem de acordo. Assinam a presente ata.

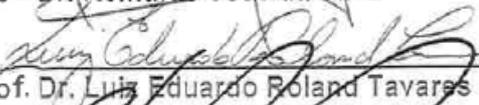
Diadema, 11 de julho de 2013.



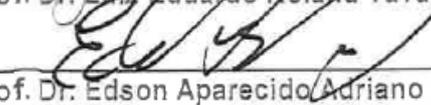
Prof. Dr. Fábio Sarubbi do Amaral



Prof. Dr. Reinaldo José da Silva



Prof. Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares



Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano

São Paulo, 27 de abril de 2012
CEP Nº: 0128/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Suellen Aparecida Zatti

Disciplina/Departamento: Ecologia e Evolução

Pesquisadores associados: Edson Aparecido Adriano; Antônio Augusto Mendes Maia

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Taxonomia morfológica e molecular de parasitos do filo Myxozoa em *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus costatus* e *Prochilodus vimboides* do rio São Francisco, MG e *Prochilodus lineatus* do rio Mogi-Guaçu, SP. :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Pesquisa de parasitas em peixes

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Este projeto tem como objetivo estudar, utilizando a taxonomia morfológica e molecular, a fauna de parasitas do Filo Myxozoa encontrada parasitando *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides* do rio São Francisco e *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu.

RESUMO: Este projeto será realizado em parceria do laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Federal de São Paulo, campus de Diadema e o Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, campus de Pirassununga. Serão realizadas duas coletas, uma no período quente e outra no período frio. As coletas serão realizadas no rio São Francisco, no município de Piraporinha, Minas Gerais e no rio Mogi-Guaçu, no município de Pirassununga, São Paulo. As coletas serão realizadas com o auxílio de redes de espera, redes de arrasto, tarrafas e anzol. Serão coletados 10 indivíduos de cada espécie. Os peixes coletados serão transportados vivos para o laboratório de campo montado nas proximidades do local de coleta, onde serão sacrificados mediante a eutanásia com overdose de anestésico, para em seguida ser realizada a biometria. Inicialmente será feita a análise externa dos peixes em busca de cistos de parasitos, para em seguida, ser realizada a necropsia, com exposição das brânquias e da cavidade visceral com a finalidade de detectar eventuais alterações nas características dos órgãos e avaliar a presença de parasitos ou cistos. O material coletado será preparado e fixado conforme cada técnica a ser empregada para os estudos posteriores (microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e sequenciamento do gene 18S rDNA), como descritos em itens subsequentes.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Os parasitas são os principais causadores de patologias e mortes de peixes em ambientes naturais e de criação. Dentre a grande variedade de ictioparasitas conhecidos, destacam-se aqueles pertencentes ao Filo Myxozoa, que compreende cerca de 2.300 espécies conhecidas, representando um grupo importante que interfere principalmente na produção aquática de interesse econômico, onde tem causado grande mortalidade. O objetivo deste trabalho é estudar, utilizando a taxonomia morfológica e molecular, a fauna de parasitas do Filo Myxozoa encontrada parasitando *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides* do rio São Francisco e *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais que serão realizados

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 22/4/2013 e 17/4/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.



Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Dedicatória

À minha família.

Epígrafe

“A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência”.

Charles Darwin

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, por me dar força para seguir sempre em frente e por permitir a realização de grandes sonhos;

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano, pela confiança depositada em mim desde o processo seletivo, pela valiosa orientação e dedicação a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, pela co-orientação informal, amizade em todos os momentos dessa pesquisa e por fornecer espaço no laboratório de parasitologia da FZEA/USP para o desenvolvimento de parte deste trabalho;

Aos pesquisadores do laboratório de parasitologia da USP campus de Pirassununga (Mateus Carriero e Gabriel Moreira), em especial à Dra. Márcia R. M. Silva, Elayna Maciel, Juliana Naldoni, Kássia Capodifoglio e Tiago Milanin. Obrigada por tudo que me ensinaram e pela amizade em todos os momentos do meu mestrado, devo muito dele a vocês;

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas, MG, pela formação acadêmica e pessoal;

Aos professores e amigos do laboratório de Genética Evolutiva da Unifesp (Lab. 23), Profa. Dra. Kátia Pellegrino, Profa. Dra. Samantha Köehler, Profa. Dra. Marielle Schneider, Prof. Dr. João Alexandrino, Prof. Dr. Fábio Raposo, Guilherme Lima, Luiza Sisdelli, Rafael Lomazi, pelos ensinamentos diários, ajuda, descontração, amizade e café de todos os dias;

À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução;

Aos alunos do curso de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, pela amizade, discussões de textos e por comparecerem as inúmeras prévias das apresentações desse trabalho, em especial à Valéria Braga, Carina Ulian, Camilla Uzam, Camila Passos, Tatiana Souza e Thabata Soares, minha família em SP;

Aos meus amigos biólogos da Universidade Federal de Alfenas, “Biologia é Barra um”, pelo apoio, torcida e por acreditarem que um dia eu conseguiria chegar até aqui, em especial à Ana Carol, Taninha Batista, Mari Pires, Sarah Carvalho, Mara Rúbia e à Juliana Jordão, que me apresentou “São Paulo”, pela amizade, apoio, prévias, por fazer tudo mais fácil e pelas discussões de biologia molecular. Obrigada Ju!

À Elciane, Laila e Nilza, amigas de república de Alfenas, 2008-2009, pelo incentivo nos estudos para o processo seletivo do mestrado, por sempre dizer “você vai passar” e por fazerem parte de umas das épocas mais felizes da minha vida;

À minha família, por compreender minhas ausências, pela comemoração das minhas vitórias, em especial a minha mãe Nice, por sonhar comigo, por me incentivar e não me deixar desistir nunca;

Ao CEPTA / IBAMA - Pirassununga, SP, pelo auxílio nas coletas no rio Mogi Guaçu;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro (Capes Demanda Social).

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	4
1.1 BACIAS HIDROGRÁFICAS BRASILEIRAS	4
1.2 DIVERSIDADE DE PEIXES NEOTROPICAIS	5
1.3 GÊNERO <i>PROCHILODUS</i>	5
1.4 DOENÇAS E MORTALIDADE DE PEIXES	7
1.5 FILO MYXOZOA GRASSÉ, 1960.....	8
1.5.1 Taxonomia e Sistemática.....	10
1.5.2 Patogenicidade	11
1.6 TAXONOMIA MOLECULAR E FILOGENIA	12
2 OBJETIVOS	15
OBJETIVO GERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
5 RESULTADOS.....	24
CAPÍTULO I.....	25
MORFOLOGIA, ULTRAESTRUTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE <i>MYXOBOLUS</i> SP. 1, PARASITO DAS BRÂNQUIAS DE <i>PROCHILODUS COSTATUS</i> DO RIO SÃO FRANCISCO, BRASIL.....	25
RESUMO	26
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO II.....	43
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>MYXOBOLUS POROFILUS</i> E <i>MYXOBOLUS</i> CF. <i>FRANCISCOI</i> PARASITOS DE PEIXES DO GÊNERO <i>PROCHILODUS</i> NOS RIOS MOGI GUAÇU, SP E SÃO FRANCISCO, MG.....	43
RESUMO	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46

MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO	55
AGRADECIMENTOS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

Resumo

O filo Myxozoa compreende organismos metazoários, endoparasitos e altamente especializados, tanto em relação aos hospedeiros quanto em relação ao tecido que infectam. No mundo são conhecidas aproximadamente 2.300 espécies e na América do Sul foram descritas até aqui pouco mais de 80 espécies. O avanço nos estudos desses parasitos no Brasil é muito recente, sendo que algumas espécies consideradas patogênicas tem sido descritas. Os estudos taxonômicos clássicos desses organismos tem abordado apenas os caracteres morfológicos. Contudo, atualmente, o sequenciamento do gene 18S rDNA tem sido empregado com sucesso na discriminação de novas espécies. Esse trabalho teve por objetivo estudar mixosporídeos parasitos de peixes da família Prochilodontidae nas bacias dos rios São Francisco, MG e Mogi Guaçu, SP. Foram analisados exemplares de *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 e *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 do rio São Francisco e *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1829 do rio Mogi Guaçu. Análises morfológicas (microscopia de luz, análise ultraestrutural) e das sequências do gene 18S rDNA, com subsequentes inferências filogenéticas, foram os procedimentos utilizados. Esta dissertação foi organizada na forma de capítulos, sendo que no primeiro é apresentado o estudo de uma espécie do gênero *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992 encontrada infectando brânquias de *P. costatus*, a qual foi considerada como uma espécie ainda não descrita. Os dados morfológicos, ultraestruturais e moleculares desta espécie são aqui apresentados. O segundo capítulo trata de um estudo que tem como base o sequenciamento do gene 18S rDNA de duas espécies de *Myxobolus* já conhecidas e que infectam peixes do gênero *Prochilodus*: *Myxobolus porofilus* Adriano et al. 2002 parasito de *P. lineatus* e *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010 encontrada infectando *P. costatus*. As análises moleculares mostram que *M. porofilus* e *M. cf. franciscoi*, mesmo apresentando características morfológicas muito semelhantes e infectando hospedeiros filogeneticamente muito próximos (mesmo gênero), são duas espécies geneticamente distintas. As análises filogenéticas aqui realizadas mostram o agrupamento parafilético entre as espécies dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* Thélohan, 1892 e que as espécies de mixosporídeos se agruparam principalmente de acordo com as famílias dos peixes hospedeiros.

Palavras-chave: Myxozoa - Prochilodontidae - 18S rDNA - ultraestrutura - filogenia

Abstract

The phylum Myxozoa comprises metazoan organisms and endoparasites. It is highly specialized both in relation to hosts and in the tissue it infects. Approximately 2300 species have been identified worldwide, yet in South America little more than 80 species have been described. The growth of studies of these parasites in Brazil is a very recent phenomenon, and some species considered pathogenic have been described. Classic taxonomic studies of these organisms use only morphological characteristics for identification; however, 18S rDNA gene sequencing has recently been successfully used to identify new species. The aim of the present study was to identify myxosporean parasites of fish of the family Prochilodontidae taken from the basins of the São Francisco (MG) and Mogi Guaçu (SP) Rivers. Specimens of *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 and *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 from the São Francisco River and *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1829 from the Mogi Guaçu River were analyzed. Morphological analysis (light microscopy, ultrastructural analysis) and 18S rDNA gene sequencing, with subsequent phylogenetic inference, were used. This monograph is organized into chapters, the first of which describes the study of a species of the genus *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992 found infecting gills of *P. costatus*, considered to be a previously undescribed species. The morphological, ultrastructural and molecular characteristics of this species are presented here. The second chapter deals with a study of the 18S rDNA gene sequencing of two previously known species of *Myxobolus* infecting fish of the genus *Prochilodus*: *Myxobolus porofilus* Adriano et al. 2002 a parasite of *P. lineatus* fish, and *Myxobolus* cf. *franciscoi* Eiras et al. 2010 found infecting *P. costatus*. Molecular analysis showed that *M. porofilus* and *M. franciscoi*, although presenting very similar morphological characteristics and infecting hosts that were phylogenetically very close (of the same genus), are genetically distinct species. The phylogenetic analysis performed here shows paraphyletic grouping among species of the genera *Myxobolus* and *Henneguya* Thélohan, 1892, while myxosporean species were grouped mainly according to the families of fish hosts.

Keywords: Myxozoa - Prochilodontidae - 18S rDNA - ultrastructure - phylogeny

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Bacias hidrográficas brasileiras

A drenagem dos aproximadamente 8.512,000 Km² do território brasileiro é feita por cinco grandes bacias hidrográficas: Amazônica, Tocantins, Prata, Uruguai e São Francisco, que incluem em sua estruturação milhares de rios, riachos e ribeirões. No território brasileiro, há ainda outras bacias hidrográficas menores que se localizam na região costeira do país e deságuam diretamente no oceano Atlântico. A vazão total desse conjunto hidrográfico corresponde a aproximadamente 182.170 m³/s (Agostinho et al. 2007).

Do conjunto hidrográfico brasileiro, a bacia do rio São Francisco se destaca por abranger uma área total de 645.067,2 Km² o que corresponde a aproximadamente 7.5% do território nacional. É a terceira maior bacia hidrográfica brasileira, abrangendo 509 municípios de sete unidades federativas: Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Goiás e Distrito Federal. A bacia hidrográfica do rio São Francisco é subdividida em três regiões fisiográficas: Alto, Médio e Baixo São Francisco (Brasil & ANA, 2004) que percorrem aproximadamente 3.160 km sentido Norte do país (Koehler, 2003).

O Alto rio São Francisco corresponde ao trecho a partir da nascente do rio, na Serra da Canastra, até o encontro com o rio Jequitaiá, Minas Gerais. A região correspondente ao Médio São Francisco se entende do rio Jequitaiá até a barragem de Sobradinho BA/PE. Por último, a região correspondente ao Baixo rio São Francisco abrange a área de Belo Monte (AL) até à foz do rio, no Estado de Alagoas (Brasil, 2003). Ao longo do seu percurso, o rio São Francisco percorre importantes biomas brasileiros: Mata Atlântica, passando por áreas de Cerrado, Caatinga e também por ecossistemas costeiros (ANA/GEF/PNUMA/OEA, 2004).

O rio São Francisco, como citado anteriormente, brota na Serra da Canastra com o nome de rio Samburá, região que corresponde ao Sudoeste do estado de Minas Gerais e, somente após receber as águas que vertem no Parque Nacional da Serra da Canastra, recebe o nome de São Francisco (Welcomme, 1985). Considerado o terceiro maior rio brasileiro, a ictiofauna do rio São Francisco é composta por cerca de 150 espécies, sendo que deste total, 8% realizam migrações a longas distâncias, com destaque para *Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829, *Salminus franciscanus* Lima & Britski, 2007, *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829, *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1829 e *Prochilodus vimboides* Kner, 1859 (Sato & Godinho, 1999).

A sub-bacia do rio Mogi Guaçu pertence à bacia hidrográfica do Alto rio Paraná, localizada a sudoeste do Estado de Minas Gerais (2.650 km² de extensão neste estado) e a nordeste do Estado de São Paulo (14.653 km² de extensão neste Estado) (Brigante et al. 2002). Sua nascente localiza-se a uma altitude de 1.600 m, no município de Bom Repouso, sul do Estado de Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira. A partir da sua nascente, o rio sofre uma queda de altitude em 996 m até chegar ao município de Pirassununga, SP (Brigante & Espíndola, 2003). Sua foz situa-se a 470 m de altitude no rio Pardo, afluente do rio Grande, no município de Pontal, Estado de São Paulo (Capeleti & Petrere, 2006).

A fauna de peixes do rio Mogi Guaçu é uma das mais estudadas dentre todos os rios brasileiros (Meschiatti & Arcifa, 2009). Este rio apresenta uma grande diversidade de peixes, com cerca de 310 espécies relatadas pertencentes a 38 famílias. Esta bacia é bastante impactada pelas atividades humanas, como o desflorestamento (retirada da mata ciliar original) e a construção de hidrelétricas, que causam enormes impactos à ictiofauna local (Castro & Menezes, 1998).

1.2 Diversidade de peixes neotropicais

Os peixes se distribuem em 27.977 espécies descritas, o que representa mais de 50% de todas as espécies de vertebrados descritas no planeta (Nelson, 2006). Só na região Neotropical, região mais rica em espécies de peixes dulcícolas do mundo, são reconhecidas aproximadamente 4.400 espécies distribuídas em 71 famílias (Reis et al. 2003).

O Brasil é o país mais rico em se tratando da fauna ictiológica de água doce, com aproximadamente 2.587 espécies descritas e com muitas outras espécies desconhecidas, o que aumenta as estimativas da diversidade desse grupo no país. Toda essa diversidade ictiológica ocorre em somente em 0,03% de toda a água do planeta (Buckup et al. 2007). Por essa diversidade, o Brasil é reconhecidamente um grande potencial para o cultivo e comércio de peixes de diversas espécies.

1.3 Gênero *Prochilodus*

Peixes da família Prochilodontidae (Ordem Characiformes) ocorrem na maioria das bacias hidrográficas sul-americanas. Essa família é constituída por 21 espécies distribuídas em três gêneros (*Ichthyoelephas*, *Semaprochilodus* e *Prochilodus*) (Castro & Vari, 2004). O gênero *Prochilodus* é o mais especioso com 13 espécies descritas, sendo três delas endêmicas

da bacia do rio São Francisco: *P. costatus*, *P. argenteus* e *P. vimboides* (Castro & Vari, 2003) e, uma que ocorre na bacia do Prata: *P. lineatus* (Castro, 1990). Todas as espécies dessa família possuem tamanho de médio a grande porte, hábito alimentar iliófago, realizam migrações a longas distâncias e são classificados como reofílicos (peixes de piracema) (De Paula, 2006).

A variação morfológica entre as espécies do gênero *Prochilodus* spp. é bastante reduzida e as grandes áreas de distribuição de cada espécie não têm sido caracterizadas adequadamente no sentido de avaliar o grau de variação intraespecífica, o que faz com que a taxonomia deste grupo tenha sido bastante problemática (Renno et al. 2005).

Prochilodus costatus Valenciennes, 1850, conhecido popularmente como curimba ou curimbatá, é uma das espécies do gênero *Prochilodus* endêmicas do rio São Francisco. É caracterizada por possuir hábito migratório, realizando migração a longas distâncias para a reprodução durante o período de piracema e pode atingir até 6 kg de massa corpórea. Tem um importante papel ecológico no ecossistema local, sendo também economicamente importante para as populações locais (Carvalho-Costa et al. 2008) (Figura 1).



Figura 1: *Prochilodus costatus* coletado no rio São Francisco, Pirapora, Minas Gerais. Foto da autora.

Prochilodus argenteus Agassiz, 1829, regionalmente denominado curimatã-pacu, é possivelmente a maior espécie dessa família. Espécie também endêmica do rio São Francisco é amplamente capturado, principalmente na porção entre o Alto e Médio São Francisco, representando 50% do pescado local (Sato & Godinho, 2004) (Figura 2).

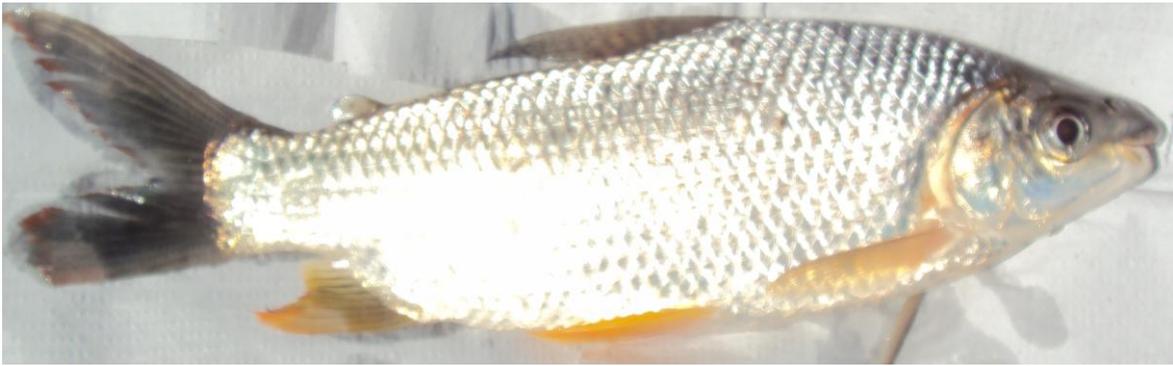


Figura 2: *Prochilodus argenteus* coletado no rio São Francisco, Pirapora, Minas Gerais. Foto da autora.

Prochilodus lineatus Valenciennes, 1829, também conhecido como curimba ou curimbatá, é certamente a espécie do gênero mais estudada pela sua reconhecida importância em programas de piscicultura. Peixe endêmico da bacia Platina realiza migrações tróficas à jusante e reprodutivas à montante do rio. A região do Alto rio Mogi Guaçu é local de reprodução de *P. lineatus* e a região do Médio rio Grande é o sítio de alimentação (Silva, 2006). Devido ao seu crescimento rápido, elevada taxa reprodutiva e aceitação no mercado é uma das espécies mais consumidas, o que eleva o interesse comercial nessa espécie (Castro, 1993) (Figura 3).



Figura 3: *Prochilodus lineatus* coletado no rio Mogi Guaçu, Pirassununga, São Paulo. Foto da autora.

1.4 Doenças e mortalidade de peixes

Entre os principais causadores de doenças e mortes de peixes em sistemas naturais destacam-se a poluição ambiental, a decomposição da matéria orgânica na água e a infecção por agentes patogênicos (Eiras, 1994). Nos últimos anos, tem aumentado consideravelmente

os estudos relacionados aos parasitos e patógenos de organismos aquáticos, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e para a comercialização, face ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo (Luque, 2004).

Como principais parasitos de peixes citam-se: protozoários, como por exemplo, *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, agente responsável pela doença conhecida como “íctio”, que causa mortalidade de peixes em sistemas naturais e de criação; Monogenea e Digenea, Cestoda, Nematoda e crustáceos (Copepoda, Branchiura e Isopoda) que são considerados importantes ectoparasitos, como por exemplo, *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758, espécie introduzida no Brasil que infecta principalmente alevinos e os parasitos do filo Myxozoa que atualmente é um dos grupos de parasitos de peixes mais estudados, e que também causa mortalidade em peixes de cultivo e de sistemas naturais (Luque, 2004).

1.5 Filo Myxozoa Grassé, 1960

Mixosporídeos são organismos multicelulares, altamente especializados, tanto em relação aos hospedeiros quanto em relação aos tecidos que infectam, porém, uma única espécie de hospedeiro pode abrigar várias espécies desse parasito (Békési et al. 2002). São parasitos obrigatórios e infectam principalmente peixes, tanto de água doce quanto salgada, mas também anfíbios (Jirku et al. 2006), répteis (Roberts et al. 2008), aves (Bartholomew et al. 2008) e mamíferos (Dyková et al. 2007). São caracterizados por possuírem esporos multicelulares, contendo cápsulas polares com filamentos polares extrudáveis, responsáveis pela fixação do parasito no hospedeiro (Lom & Arthur, 1989).

Os mixosporídeos possuem ciclo biológico complexo e para a grande maioria das espécies descritas, o ciclo ainda não é conhecido. Atualmente é aceito que esses organismos possuem dois tipos de hospedeiros: invertebrados (Anellida, principalmente oligoquetas) e vertebrados principalmente peixes (Feist et al. 2006). A forma do parasito quando em desenvolvimento no hospedeiro intermediário é designada actinosporo. Os mixosporos livres na água são ingeridos pelas oligoquetas e, em contato com o epitélio intestinal do hospedeiro, liberam o filamento polar, ancorando-se no mesmo. Uma fase de várias divisões celulares é processada e novos parasitos são formados (actinosporos maduros) e liberados na água via defecação ou morte dos hospedeiros. Os actinosporos maduros, por fim, entram em contato com os hospedeiros definitivos, ancorando-se nos tecidos também pelo filamento polar, onde novos ciclos de divisão celular são realizados, originando plasmódios onde serão formados os esporos. Os esporos maduros, após o rompimento dos plasmódios, quando em tecido que

permite o escape dos esporos ou após a morte e desintegração dos tecidos do hospedeiro, são liberados na água e o ciclo se reinicia (Feist et al. 2006).

Em relação à diversidade do grupo, atualmente são conhecidas aproximadamente 2.300 espécies (Azevedo et al. 2009) pertencentes ao filo Myxozoa, distribuídas em 52 gêneros, a maioria parasito de peixes de água doce (Kent et al. 2001). O gênero *Myxobolus* apresenta o maior número de espécies descritas, aproximadamente 790 em todo o mundo (Lom & Dyková, 1995). Na América do Sul, são conhecidas 73 espécies de Myxozoa, sendo 30 espécies do gênero *Myxobolus* (Azevedo et al. 2010).

Os primeiros estudos desses parasitos no Brasil nos remetem aos trabalhos de Splendore (1910), que fez as primeiras descrições de mixosporídeos em peixes do nosso país. Gióia e Cordeiro (1996) publicaram uma lista em que relataram 52 espécies de mixosporídeos infectando peixes brasileiros, distribuídas em 11 gêneros, na qual os gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* foram os mais especiosos. Desde então, cada vez mais pesquisadores vem demonstrando interesse no estudo desses organismos, utilizando de ferramentas de microscopia eletrônica (Adriano et al. 2005; 2006; 2009a) e mais recentemente incluindo análises moleculares (Adriano et al. 2009b; Milanin et al. 2010; Naldoni et al. 2009; 2011).

Naldoni et al. (2009) encontraram uma nova espécie, *Henneguya pseudoplatystoma*, nas brânquias de híbridos de *Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829 e *Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann, 1889. Os autores consideram essa espécie de alta capacidade patogênica uma vez que a mesma causou importante redução na área das brânquias dos peixes infectados, o que causa, provavelmente, trocas gasosas deficientes. Em outro estudo, Adriano et al. (2009b) descreveram uma nova espécie, *Myxobolus salminus*, cujos plasmódios se desenvolvem no endotélio dos vasos dos filamentos das brânquias de dourados *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816. Adriano et al. (2009a) estudando peixes da família Pimelodidae, *Zungaro jahu* Ihering, 1898 encontraram plasmódios de mixosporídeos *Myxobolus cordeiroi* Adriano et al. 2009 nas córneas e bexiga urinária dos hospedeiros que, histopatologicamente, causavam estreitamento do epitélio desses órgãos. Outra espécie de mixosporídeo recentemente descrita parasitando peixes nas bacias hidrográficas brasileiras é *Myxobolus brycon* Azevedo et al. 2011. Esse organismo foi descrito em peixes *Brycon hilarii* Valenciennes, 1850 nos quais cistos causaram deformações e redução do epitélio das brânquias, causando sérios danos aos seus hospedeiros (Azevedo et al. 2011).

1.5.1 Taxonomia e Sistemática

Os organismos do filo Myxozoa, até 1990, foram agrupados dentro do reino Protista (classe Myxosporea Butschli, 1881) (Kent et al. 2001). Porém a confirmação da multicelularidade e os estudos moleculares (sequenciamento do gene 18S rDNA) permitiram a classificação do grupo como metazoários e o posicionamento do mesmo dentro do reino Animal. Outra característica do grupo, discutida por Anderson et al. (1998), é a presença, nos organismos do filo Myxozoa, dos *Hox genes*, genes típicos dos organismos bilaterais, o que confirmou o posicionamento do grupo dentro do reino Animal.

Mesmo com tantos avanços nos estudos desses organismos, ainda há controvérsias acerca do posicionamento do filo Myxozoa dentro do reino Animal, devido à baixa pautacidade dos caracteres morfológicos e a descoberta de clados altamente divergentes (Evans et al. 2010). Alguns autores sugerem o posicionamento filogenético dos mixosporídeos dentro de cnidária (Jiménez-Guri et al. 2007). Para esses autores, o filamento polar, estrutura responsável pela fixação do parasito no hospedeiro, seria uma homologia morfológica aos nematocistos dos cnidários. Porém, análises filogenéticas moleculares através do sequenciamento do gene 18S rDNA, posicionam o filo como um grupo irmão de todos os Bilateria, não dentro de cnidária como propõe a hipótese anterior (Evans et al. 2010). Além disso, as análises ultraestruturais também suportam a natureza bilateral do grupo (Canning et al. 2002; Okamura et al. 2002).

Atualmente, o filo Myxozoa é formado por duas classes: Myxosporea e Malacosporea. A classe Myxosporea é dividida em duas ordens: Bivalvulida (esporos com duas valvas e de uma a quatro cápsulas polares) e a Multivalvulida (esporos com três a sete valvas e de duas a sete cápsulas polares). A classe Malacosporea é formada por apenas uma ordem: Malacovalvulida composta por espécies que parasitam briozoários.

Segue a classificação do filo Myxozoa, originalmente proposto por Grassé (1970 apud Feist et al. 2006) e alterado por Canning et al. (2000):

Filo Myxozoa Grassé (1960)

Classe Myxosporea Buetschli (1881)

Ordem Bivalvulida Schulman (1959)

Subordem Platysporina Kudo (1919)

Família Myxobolidae Thélohan (1892)

Subordem Sphaeromyxina Lom & Noble (1984)

Família Sphaeromyxidae Lom & Noble (1984)

Subordem Variisporina Lom & Noble (1984)

Família Alatosporidae Shulman et al. (1979)

Família Auerbachiiidae Evdokimova (1973)

Família Ceratomyxidae Doflein (1899)

Família Chloromyxidae Thélohan (1892)

Família Fabesporidae Naidenova & Zaika (1969)

Família Myxidiidae Thélohan (1892)

Família Ortholineidae Lom & Noble (1984)

Família Parvicapsulidae Shulman (1953)

Família Sinuolineidae Shulman (1959)

Família Sphaerosporidae Davis (1917)

Ordem Multivalvulida Shulman (1959)

Família Kudoidae Meglitsch (1947)

Família Trilosporidae Shulman (1959)

Classe Malacosporea Canning et al. (2000)

Ordem Malacovalvulida Canning et al. (2000)

Família Saccosporidae Canning et al. (1996)

1.5.2 Patogenicidade

A importância dos mixosporídeos não consiste apenas na letalidade das doenças causadas pelos mesmos, mas também pelos danos que esses organismos causam aos tecidos dos hospedeiros infectados (Barassa & Cordeiro, 2003). Uma revisão dos estudos desses organismos mostra que as brânquias estão entre os órgãos mais acometidos por infecções de mixosporídeos, o que pode causar um déficit nas trocas gasosas e iônicas, comprometendo consideravelmente a saúde do animal (Roberts, 2001).

De todas as espécies descritas, 15 gêneros são reconhecidos por incluir espécies patogênicas (Lom & Dyková, 1995). *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 é uma das espécies de

mixosporídeos mais conhecidas e estudadas. Essa espécie, parasito de salmonídeos da América do Norte e Europa, pode causar declínio nas populações dos peixes, inclusive em ambiente natural (Feist et al. 2006). Os plasmódios, presentes principalmente em indivíduos jovens, quando alojados na cápsula auditiva dos peixes, fazem com que os hospedeiros apresentem distúrbios natatórios característicos, que torna a doença conhecida como doença do rodopio (*whirling disease*) (Pavanelli et al. 2002). Outro exemplo é o processo infeccioso grave causado pela presença de plasmódios de *Henneguya* spp. nas brânquias dos peixes, que podem levar ao maior contato entre as lamelas secundárias ou até mesmo a fusão das mesmas e dificultar a troca dos gases respiratórios (Eiras, 2002; Naldoni et al. 2011). *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950 infecta o trato digestivo de peixes salmonídeos da América do Norte, causando danos severos em populações de peixes de pisciculturas e ambientes naturais (Lom & Dyková, 1995).

1.6 Taxonomia molecular e filogenia

Os estudos taxonômicos tradicionais dos mixosporídeos baseiam-se principalmente na descrição morfológica dos parasitos, que corresponde desde as características dos plasmódios e esporos (medidas e formato) quanto ao tipo de tecido e hospedeiro infectados. O problema do uso de apenas este tipo de abordagem dá-se principalmente pela baixa variabilidade morfológica interespecífica contida nos esporos (Ferguson et al. 2008).

Nos últimos anos, tem-se sugerido o sequenciamento do gene 18S rDNA como ferramenta para a caracterização das espécies de mixosporídeos (Andree et al. 1999; Bahri et al. 2003). O uso de métodos baseados na descrição de caracteres morfológicos é difícil para diferenciar espécies de mixosporídeos similares, com a mesma afinidade tecidual e parasitando espécies de hospedeiros taxonomicamente próximos, tornando o uso de técnicas de biologia molecular imprescindível (Molnár et al. 2002). Segundo Bahri et al. (2003), em estudos taxonômicos de mixosporídeos, além das características morfológicas, o sequenciamento do gene 18S rDNA deve ser aplicado para garantir a caracterização segura das espécies.

A taxa de evolução é um aspecto importante para se definir qual gene deve ser usado para estudos taxonômicos, filogenéticos e de genética de populações. Para o grupo de organismos pertencentes ao filo Myxozoa, o gene 18S rDNA é o marcador mais usado em estudos de taxonomia molecular e filogenia. Esse gene é particularmente importante para elucidar as relações desse grupo pela sua alta variabilidade em espécies muito próximas (Kent

et al. 2001). Recentemente, um estudo realizado por Fiala & Bartosová (2010), envolvendo três marcadores moleculares diferentes: 28S rDNA, 18S rDNA e um gene codificador de proteínas EF-2, acrescentados por dados morfológicos, demonstrou que as filogenias baseadas apenas no marcador nuclear 18S rDNA representam dados consistentes para inferir a história evolutiva do grupo bem como o grau de relacionamento entre os organismos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo identificar, com base em caracteres morfológicos e moleculares (sequenciamento do 18S rDNA), a fauna de parasitos do filo Myxozoa encontrada parasitando os peixes *P. costatus* e *P. argenteus* do rio São Francisco, MG e *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu, SP, de forma a contribuir para o conhecimento da fauna de mixosporídeos parasita de peixes neotropicais.

Objetivos Específicos

- Identificar e descrever os parasitos do filo Myxozoa presentes em cada uma das três espécies do gênero *Prochilodus* acima citadas;
- Comparar a fauna de mixosporídeos encontrada infectando os peixes do gênero *Prochilodus* nas duas bacias hidrográficas;
- Avaliar, mediante sequenciamento do gene 18S rDNA, a posição filogenética dos mixosporídeos parasitos das três espécies de peixes do gênero *Prochilodus*, quando comparada com espécies parasitos de outros hospedeiros e de outras regiões/continentes.

MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos referentes a este trabalho estão inseridos nos capítulos apresentados a seguir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS 2005. Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* n. sp. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 177-181.
- Adriano EA, Arana S, Cordeiro, NS 2006. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructural. *Parasite* 13: 137-142.
- Adriano EA, Arana S, Carriero MM, Naldoni J, Ceccarelli PS, Maia AAM 2009a. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. *Vet Parasitol* 165: 25-29.
- Adriano E, Arana S, Alves AL, Silva MRM, Ceccarelli PS, Henrique-Silva F, Maia AAM 2009b. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny and histopathology. *Vet Parasitol* 162: 221-229.
- Agência Nacional das Águas (ANA/GEF/PNUMA/OEA) 2004. Projeto de gerenciamento integrado das atividades desenvolvidas em terra na bacia do rio São Francisco. Subprojeto 4.5C-Plano Decenal de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco-PBHSF (2004-2013), 133p.
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM 2007. *Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil*. Maringá: Editora da UEM, 501p.
- Anderson CL, Canning EU, Okamura B 1998. A triploblast origin for Myxozoa? *Nature* 392: 346-347.
- Andree KB, Szekely C, Molnar K, Gresoviac SJ, Hedrick RP 1999. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 85: 68-74.
- Azevedo C, Casal G, Marques D, Silva E, Matos E 2011. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the Piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). *J Eukaryot Microbiol* 58: 88-93.
- Azevedo C, Casal G, Mendonça I, Carvalho E, Matos P, Matos E 2010. Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 203-207.
- Bahri S, Andree KB, Hedrick RP 2003. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *J Eukaryotic Microbiol* 50: 463-470.
- Barassa B, Cordeiro NS 2003. Myxozoa em *Astyanax altiparanae* e *Serrasalmus spilopleura* (Pisces: Characidae) oriundos de ambiente natural. *Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, SP. Instituto de Biologia*. 73p.

- Békési L, Székely C, Molnár K 2002. Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39: 271-276.
- Brasil, Agência Nacional da Água (ANA) 2004. *Estudo técnico de apoio ao PBHSF – nº 10: controle de cheias*. Brasília, Abr. 55p.
- Brasil, Agência Nacional da Água (ANA) 2003. *Diagnóstico analítico da bacia do rio São Francisco e da zona Costeira*. Brasília. Relatório final. 64p.
- Bartholomew JL, Atkinson SD, Hallett SL, Lowenstine LJ, Garner MM, Gardiner CH, Keel MK, Brown JD 2008. Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int J Parasitol* 38: 1199-1207.
- Brigante J, Espíndola ELG 2003. *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. São Carlos: Rima, 255p.
- Brigante J, Espíndola ELG, Povinelli J, Eler MN, Silva MRC, Dornfeld CB, Nogueira AM 2002. *Avaliação ambiental do rio Mogi-Guaçu*. Resultados de uma pesquisa de abordagem ecossistêmica. São Carlos: RiMA Editora. 58p.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS 2007. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Canning EU, Curry A, Feist SW, Longshaw M, Okamura B 2000. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J Eukaryot Microbiol* 47: 456-468.
- Canning EU, Tops S, Curry A, Wood TS, Okamura B 2002. Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *J Eukaryot Microbiol* 49: 280-295.
- Capeleti AR, Petreire Jr. M 2006. Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu river - São Paulo, Brazil. *Braz J Biol* 66: 651-659.
- Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Galetti Jr, PM 2008. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Gen Mol Biol* 31: 377-380.
- Castro RCM 1990. *Revisão Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Castro RCM, Menezes NA 1998. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo; p. 1-13 In: CASTRO, R. M. C. (ed.). *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*. v.6. São Paulo: Winner Graph.
- Castro RCM, Vari PP 2004. *Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study*. Smithsonian Books, Washington, DC, n.622, 189p.

- Castro RCM, Vari PP 2003. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a Phylogenetic and Revisionary Study. Washington: *Smithsonian Books*, 2004. 189p. (Smithsonian Contributions and Studies Series, 622).
- De Paula FM. 2006. *Diversidade genética de Prochilodus lineatus (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas-rio Paranapanema*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR.
- Dyková I, Tyml T, Fiala I, Lom J 2007. New data on *Soricimyxum fegati* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence. *Folia Parasitol* 54: 272-276.
- Eiras JC 2002. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 52: 43-54.
- Eiras JC 1994. *Elementos de ictioparasitologia*. 1ª ed. Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida. 339p.
- Evans NM, Holder MT, Barbeitos MS, Okamura B, Cartwright P 2010. The Phylogenetic Position of Myxozoa: Exploring Conflicting Signals in Phylogenomic and Ribosomal Data Sets. *Mol Biol Evol* 12: 2733-2746.
- Feist SW, Langdom JS, Longshaw, M 2006. Phylum Myxozoa. In: Woo PTK (ed.). *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Vol. 1, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire, p. 230-296.
- Ferguson JA, Atkinson SD, Whipps CM, Kent ML 2008. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J Parasitol* 94: 1322-1334.
- Fiala I, Bartosová P 2010. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evol Biol* 10: 1-13.
- Gióia I, Cordeiro NS. 1996. Brazilian Myxosporidians Check list (Myxozoa). *Acta Protozool* 35: 137-149.
- Grassé PP 1970. Embranchement des Myxozoaires. *Précis de Zoologie* (Grassé, Poisson, R.a. und Tuzet, O., eds.) Vol. 1, Invertébrés, Paris, Masson.
- Jiménez-Guri EH, Philippe B, Okamura Holland PWH. 2007. *Buddenbrockia* is a cnidaria or not? *Science* 317: 116-118.
- Jirku M, Bolek, MG, Whippis CM, Janovy J, Kent ML, Modry D. 2006. A new species of *Myxidium* (Myxosporidia: Myxiidae), from the western chorus frog, *Pseudacris triseriata triseriata*, and Blanchard's chicket frog, *Acris crepitans blanchardi* Hylidae, from eastern Nebraska: Morphology, Phylogeny, and critical comments on amphibian *Myxidium* taxonomy. *J Parasitology* 92: 611-619.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew, JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin, RH, Feist SW, Hedrich RP, Hoffmann RW, Khattra 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48: 395-413.

- Kohler HC 2003. Aspectos geocológicos da bacia hidrográfica do São Francisco (primeira aproximação na escala 1:1.000000), p. 25-35. In: Godinho HP, Godinho AL. (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas. 468p.
- Lom J, Dyková L 1995. Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Woo PKT. *Fish Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections*, Vol. 1, CAB International, p. 87-147.
- Luque JL 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Rev Bras Parasitol Vet* 13: 161-164.
- Meschiatti AJ, Arcifa MS 2009. A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies. *A Limnol Brasil* 21: 135-159.
- Milanin T, Eiras JC, Arana S, Maia AAM, Alves AL, Silva MRM, Carriero M, Ceccarelli PS, Adriano EA 2010. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* n. sp., parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 762-769.
- Naldoni J, Arana S, Maia AAM, Ceccarelli PS, Tavares LER, Borges FA, Pozo CF, Adriano EA 2009. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure. *Vet Parasitol* 166: 52-59.
- Naldoni J, Arana S, Maia AAM, Silva MRM, Carriero MM, Ceccarelli PS, Tavares LER, Adriano EA 2011. Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Vet Parasitol* 177: 247-255.
- Nelson JS 2006. *Fishes of the World*. 4rd ed. New York: John Wiley & Sons. 622p.
- Okamura B, Curry A, Wood TS, Canning EU 2002. Ultrastructure of *Buddenbrockia* sp. identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. *Parasitol* 124: 215-223.
- Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM 2002. *Doenças de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Editora Universidade Estadual de Maringá, 305p.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris JR 2003. *Check list of the Freshwater Fishes of South América*. Porto Alegre: Edipucrs, 729p.
- Renno JF, García C, Duponchelle F, Nunez J 2005. Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. *Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica*. Iquitos, Perú.
- Roberts RJ 2001. *Fish Pathology*. 3rd ed. Eds. RJ. Roberts WB. Saunders. London 472p.
- Roberts JF, Whipps CM, Bartholomew JL, Schneider L, Jacobson ER 2008. *Myxidium scripta* n. sp. identified in urinary and biliary tract of Louisiana-farmed red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans*. *Dis Aquat Organ* 80: 199-209.

- Sato Y, Godinho HP 1999. Peixes da bacia do rio São Francisco, p. 401-413. In: Lowe-McConnell, RH. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp, 534p.
- Sato Y, Godinho HP 2004. Migratory fishes of the São Francisco River. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A. (eds). *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. Victoria: IDRC. p.195-232.
- Silva RG 2006. Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do rio Grande, SP. Dissertação (Mestrado). *Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo*. 100p.
- Splendore A 1910. *Trypanosomes Des Poissons Brésiliens*. Bul. Soc. Pathol. Exot. Paris 524.
- Welcomme RL 1985. *River fisheries*. FAO Fish. Tech. Pap 262: 1-330.

RESULTADOS

Capítulo I

Morfologia, ultraestrutura e análise molecular de *Myxobolus* sp. 1, parasito das brânquias de *Prochilodus costatus* do rio São Francisco, Brasil.

Resumo

Myxobolus sp. 1 foi encontrado infectando as brânquias de *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850, um peixe da família Prochilodontidae, coletado no rio São Francisco, MG, com prevalência de 12,5%. Os esporos do parasito apresentaram $13,36 \pm 0,77$ μm de comprimento, $10,77 \pm 0,44$ μm de largura e $9,2 \pm 0,1$ μm de espessura. As cápsulas polares apresentaram tamanhos iguais e mediram $5,23 \pm 0,65$ μm de comprimento e $3,08 \pm 0,36$ μm de largura, contendo filamentos polares variando de 9 a 10 voltas. As análises ultraestruturais revelaram que a esporogênese de *Myxobolus* sp. 1 seguiu o padrão observado para as espécies do gênero *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992. Foi observada que a parede do plasmódio continha numerosas invaginações e protrusões, bem como um número reduzido de canais de pinocitose. Numerosas mitocôndrias, células germinativas e pansporoblastos jovens foram observados na região periférica do plasmódio, enquanto esporos maduros foram observados nas camadas mais profundas. Uma camada de fibrilas de colágeno circundou todo o plasmódio. As análises filogenéticas baseadas no sequenciamento parcial do gene 18S rDNA mostraram que as espécies de *Myxobolus* tenderam a se agrupar de acordo com a família dos hospedeiros, mas, *Myxobolus* sp. 1, que é a primeira espécie de myxosporídeo parasito de peixes da família Prochilodontidae cujo gene 18S rDNA foi sequenciado, aparece de maneira não clara agrupado com duas espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes pangasídeos e carangídeos.

Palavras-chave: Myxosporia - curimba - ultraestrutura - 18S rDNA - filogenia

Abstract

Myxobolus sp. 1 has been found to infecting the gills of *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850, a fish from the Prochilodontidae family, found in the São Francisco River, Minas Gerais, with a prevalence of 12.5%. The parasite spores had a length of 13.36 ± 0.77 μm , a width of 10.77 ± 0.44 μm and a thickness of 9.2 ± 0.1 μm . The polar capsules were of equal size with a length of 5.23 ± 0.65 μm and a width of 3.08 ± 0.36 μm , with polar filaments with (9-10) turns. Ultrastructural analysis revealed that sporogenesis in *Myxobolus* sp. 1 followed the pattern of the other *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992 species. Ultrastructural analysis revealed the plasmodia wall had numerous invaginations and protrusions, and few pinocytic channels. Numerous mitochondria, generative cells and young pansporoblasts were observed in the peripheral area of the plasmodia, and mature spores were observed in the deeper layer. A layer of collagenic fibrils surrounded the plasmodia. Phylogenetic analysis based on partial 18S rDNA sequencing shows that *Myxobolus* spp. grouped together according to host family, but *Myxobolus* sp. 1, the first myxosporean parasite of fish of the Prochilodontidae family whose 18S rDNA gene has been sequenced, shows unclear clustering, grouping with two species of *Myxobolus* parasites of pangasid and carangid fishes.

Keywords: Myxosporea - curimba - ultrastructure - 18S rDNA - phylogeny

Introdução

O filo Myxozoa é composto por aproximadamente 2.300 espécies descritas em todo o mundo (Azevedo et al. 2009). Sua diversidade ainda é subestimada comparada com a diversidade da ictiofauna, especialmente da região Neotropical (Naldoni et al. 2011). Na América do Sul são conhecidas aproximadamente 63 espécies de *Myxobolus* e *Henneguya*, sendo 30 do gênero *Myxobolus* (Azevedo et al. 2010). Novas espécies de myxosporídeos estão sendo descritas frequentemente, especialmente no Brasil (Azevedo et al. 2009).

Myxozoa é um grupo muito complexo e, embora seja atualmente um dos grupos de parasitos de peixes mais estudados, existem alguns desafios a respeito do conhecimento de aspectos do ciclo de vida, evolução e diversidade desses organismos (Morris, 2010; Naldoni et al. 2011; Nesnidal et al. 2013).

Entre os gêneros da classe Myxosporea, *Myxobolus* é o mais especioso, composto por cerca de 800 espécies (Lom & Dyková, 2006; Cech et al. 2012). No passado, a identificação de mixosporídeos e/ou descrição de novas espécies eram baseadas principalmente na morfologia dos esporos, e também nas características dos plasmódios, sítio de infecção e espécie de hospedeiro (Lom & Arthur, 1989). De acordo com Molnár et al. (2002), o uso desse método de classificação clássico é muito difícil para validar espécies morfológicamente muito similares, com afinidade para o mesmo tecido e cujo desenvolvimento ocorre em hospedeiros taxonomicamente próximos, tornando o uso das técnicas de biologia molecular substancialmente importante.

Desta forma, Bahri et al. (2003) sugeriram que em descrições de espécies de *Myxobolus*, além de uma cuidadosa descrição das características dos esporos, o emprego do sequenciamento do gene 18S rDNA pode ser útil em situações em que as características morfológicas são confusas ou não garantem a caracterização de novas espécies. Atualmente, o sequenciamento do gene 18S rDNA além de ajudar na discriminação de espécies de mixosporídeos morfológicamente muito similares (Adriano et al. 2012; Cech et al. 2012), também tem sido empregado em estudos filogenéticos desses parasitos (Fiala, 2006; Ferguson et al. 2008; Milanin et al. 2010; Adriano et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*).

A espécie de peixe *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 conhecida popularmente como curimba ou curimbatá é endêmica da bacia hidrográfica do rio São Francisco. É um peixe grande, podendo pesar até 6 kg, realiza migrações a longas distâncias e tem hábito alimentar iliófago. Além disso, o curimbatá tem grande valor econômico para as populações



Figura 2: Fotografias do local de coleta: **A:** rio São Francisco, Pirapora, Minas Gerais. **B:** tanque rede, no rio, para armazenar os peixes após a coleta. Fotos da autora.

Imediatamente após a captura, os peixes ainda vivos, foram transportados para o laboratório de campo, onde foram eutanasiados por dosagem excessiva de benzocaína, em seguida medidos e necropsiados. Esta metodologia foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP: 0128/12) e está de acordo com as leis brasileiras (Lei Federal nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008 e Decreto Federal nº 6899 de 15 de Julho de 2009).

Os esporos foram fotografados e medidos a partir de preparações a fresco, sem contraste em microscópio de luz Leica DM 1000 equipado com *software* Leica Application Suite versão 1.6.1. As medidas de 28 esporos foram expressas como a média \pm o desvio padrão (DP) de acordo com os padrões estabelecidos por Lom & Arthur (1989).

Para a microscopia eletrônica de transmissão (análises ultraestruturais), as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2.5% diluído em 0.1M Cacodilato de sódio (pH 7.4) por 12 horas, lavadas em solução glucose-salina por 2 horas e pós-fixadas em OsO₄. Todas as etapas foram processadas em uma temperatura fixa de 4°C. Por fim, as amostras foram desidratadas em concentrações aumentadas de acetona e embebidas em ensina Embed 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em um microscópio de transmissão LEO 906 (Adriano et al. 2006).

Para as análises moleculares, os cistos foram fixados em etanol absoluto Merck®. Para a extração do DNA dos esporos foi utilizado “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen, Califórnia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O produto foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, NSW, Austrália) a 260 nm.

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com o uso dos seguintes pares de *primers* (Tabela 1):

Tabela 1: Lista dos *primers* utilizados na amplificação e no sequenciamento do gene 18S rDNA para a espécie estudada.

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
Erib 1 (<i>forward</i>)	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Barta et al. (1997)
Act1r (<i>reverse</i>)	5'-AATTTACCTCTCGCTGCCA-3'	Hallett & Diamant (2001)
Myxgen4f (<i>forward</i>)	5'-GTGCCTTGAATAAATCAGAG-3'	Diamant et al. (2004)
Erib10 (<i>forward</i>)	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'	Barta et al. (1997)
MC5 (<i>forward</i>)	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Molnár et al. (2002)
MC3 (<i>reverse</i>)	5'-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA-3'	Molnár et al. (2002)

A PCR foi processada em uma reação com volume final de 25 µL: 2 µl do DNA extraído (10-50ng/µL), 0,25 µl de Taq DNA Polimerase 5U/µl (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA), 0,50 µl de dNTPs (10mM) (Invitrogen By Life Technologies, MD, USA), 0,50 µl de cada *primer* (10pmol), 2,5 µl de 10x Taq DNA Polimerase *buffer* (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA), 1,25 µL de MgCl₂ (1.5mM) (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA) e 17,5 µl de água ultrapura MilliQ[®].

A reação de PCR foi processada em um aparelho termociclador “AG 22331 Hamburg” (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Uma etapa inicial de denaturação a 95°C por 5 minutos foi processada para então serem realizados 35 ciclos de denaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 58°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Uma reação de controle foi processada de forma a checar uma possível contaminação. Os fragmentos obtidos foram analisados via gel de agarose 1% Tris-Borato-EDTA (0.045M Tris-Borato, 0.001M EDTA, pH 8.0) corado com brometo de etídio e analisado em um transluminador FLA-30000 (Fuji Photo Film, Tóquio, Japão). Os tamanhos dos fragmentos obtidos foram estimados pela comparação com o padrão “1kp Plus DNA Ladder” (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA). Os produtos da PCR foram purificados com “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN, CA, EUA) conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando o BigDye[®] 102 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) em um

ABI3730 DNA 103 Analyzer (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) usando os mesmos *primers*.

A confirmação de que a sequência obtida correspondia ao grupo de interesse foi feita utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997). A sequência parcial do gene 18S rDNA obtida da espécie *Myxobolus* sp. 1 mais as demais sequências de *Myxobolus* em que a mesma foi comparada foram visualizadas, editadas e alinhadas no software BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999), usando o algoritmo ClustalW (Thompson, 1994) inserido nesse programa e as configurações padrão. Para sequências curtas, os nucleotídeos indisponíveis foram tratados como *missing data* e os *gaps* tratados como um quinto caracter estado.

A sequência da espécie de *Myxobolus* alvo do presente estudo foi comparada com sequências de todas as espécies do gênero *Myxobolus* disponíveis no banco de dados GenBank, de modo a verificar o seu posicionamento filogenético perante as demais espécies do gênero disponíveis nesse banco de dados. Para as espécies de parasitos cujos hospedeiros pertencem à região da Eurásia, foram usadas somente as sequências de espécies de *Myxobolus* consideradas válidas pelo autor (Molnár, 2011).

Para a análise de Máxima Verossimilhança o melhor ajuste evolutivo de substituição dos nucleotídeos foi determinado usando o *software* jModeltest 0.1 (Posada, 2008), que selecionou o modelo *general time reversible* (GTR+I+G). As frequências de nucleotídeos estimadas a partir dos dados foram: (A = 0,2377, C = 0,1903, G = 0,2794, T = 0,2927); as taxas de substituição dos nucleotídeos [AC] = 1,1785, [AG] = 3,3027, [AT] = 1,6337, [CG] = 0,5766, [CT] = 4,1914, [GT] = 1,0000; proporção dos sítios invariáveis = 0,1450 e a distribuição gama = 0,5310.

A análise de Máxima M foi processada no *software* PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) com os valores de *bootstrap* calculados usando 1000 réplicas. O grupo interno foi composto por 97 espécies. *Ceratomyxa shasta* (AF001579) e *Ceratomyxa seriolae* (AB530265) foram usadas como grupo externo desta análise. As árvores obtidas foram visualizadas usando FigTree 1.3.1 (Rambout, 2008) e editadas no Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Califórnia, EUA). Os dados das famílias dos peixes hospedeiros usados nas análises filogenéticas foram obtidos no site *FishBase* (Froese & Pauly, 2013).

Resultados

Dos 16 espécimes de *P. costatus* examinados, dois (12,5%) apresentaram, nas brânquias, plasmódios de uma espécie de parasito do gênero *Myxobolus* ainda não descrita.

Descrição - Plasmódios brancos com formato arredondado a oval e medindo no máximo 1 mm. Os esporos maduros apresentaram formato arredondado a oval na visão frontal e biconvexo, na visão lateral e foram compostos por duas valvas similares (Figuras 3A e B).

Os esporos mediram $13,36 \pm 0,77$ μm de comprimento, $10,77 \pm 0,44$ μm de largura e $9,2 \pm 0,1$ μm de espessura. Valvas lisas e as cápsulas polares alongadas e de tamanho igual, medindo $5,23 \pm 0,65$ μm de comprimento e $3,08 \pm 0,36$ μm de largura com filamentos polares com 9 a 10 voltas arranjados perpendicularmente ao eixo longitudinal das cápsulas. Os esporos apresentam dois pequenos esporoplasmas binucleados (Figura 3B).

As análises ultraestruturais de *Myxobolus* sp. 1 revelaram que a parede do plasmódio apresentava contorno irregular, contendo numerosas invaginações, protruções e poucos canais de pinocitose. Uma camada de fibrilas de colágeno com cerca de 4 μm de largura circundou todo o plasmódio (Figuras 4 e 5).

Abaixo da camada do ectoplasma pode-se observar a ocorrência de numerosas mitocôndrias, células generativas, pansporoblastos em diferentes estágios de desenvolvimento e esporos imaturos. Esporos maduros foram observados nas camadas mais profundas do plasmódio (Figura 6).

O sequenciamento do gene 18S rDNA dos esporos de *Myxobolus* sp. 1 resultou em uma sequência parcial de 1240pb. Esta sequência não correspondeu a nenhuma outra sequência de Myxozoa disponível no site GenBank de acordo com um levantamento realizado no BLASTn.

Análise filogenética usando o método de Máxima Verossimilhança mostrou que as espécies de *Myxobolus* se agruparam em duas linhagens distintas. Um clado menor composto por *M. omari*, *M. acanthogobii* e *Myxobolus* sp. 1. O clado maior, que está subdividido em vários subclados, é composto pelas outras espécies de *Myxobolus* (Figura 7).

Hospedeiro tipo - *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850, Actinopterygii: Characiformes: Prochilodontidae, popularmente conhecido como curimba ou curimatá.

Sítio de infecção - Plasmódios foram encontrados nos filamentos branquiais.

Prevalência da infecção - dois dos 16 *P. costatus* examinados estavam infectados (12,5%).

Localidade tipo - rio São Francisco (17°12'75"S, 44°50'95"W), Minas Gerais, Brasil.

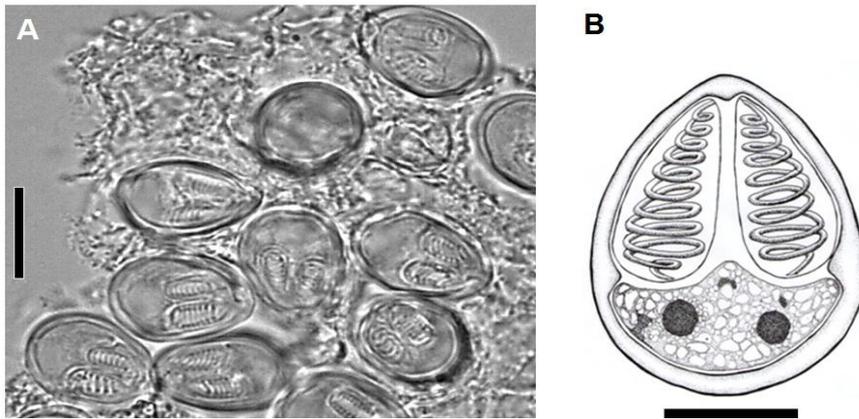


Figura 3: A: Fotomicrografia de luz (1.000 vezes) de esporos de *Myxobolus* sp. 1, encontrado nas brânquias de *Prochilodus costatus*. Barra de escala: 10 μ m. B: desenho esquemático de um esporo de *Myxobolus* sp. 1. Barra de escala: 5 μ m.

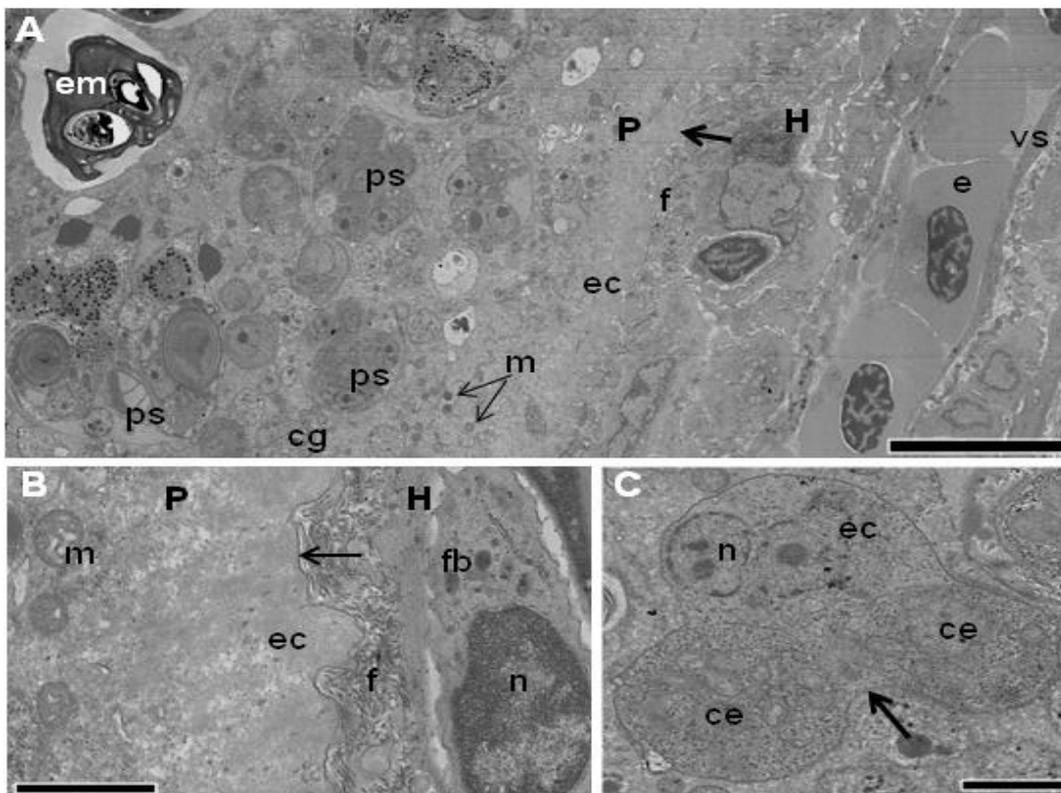


Figura 4: Fotomicrografia eletrônica de *Myxobolus* sp. 1, encontrado nas brânquias de *Prochilodus costatus*. A: interface parasito-hospedeiro (seta preta) mostrando: no plasmódio (P), o ectoplasma (ec), mitocôndrias (m), células germinativas (cg), pansporoblastos (ps) em diferentes estágios de desenvolvimento e esporos maduros (em). No hospedeiro (H), observa-se uma fina camada de fibrilas de colágeno (f) circundando o plasmódio e vasos sanguíneos da lamela branquial (vs) com eritrócitos (e). Barra de escala: 10 μ m. B: visão ampliada da interface parasito-hospedeiro mostrando a periferia do plasmódio (P) com mitocôndrias (m) abaixo da camada do ectoplasma (ec), parede do plasmódio com uma única membrana (seta preta) em contato com as fibrilas de colágeno (f) do hospedeiro, fibroblasto (fb) e núcleos dos fibroblastos (n). Escala: 5 μ m. C: detalhe de um processo de mitose (seta preta) de uma célula esporogônica (ce) dentro do envelope celular (ec), n: núcleos. Barra de escala: 2 μ m.

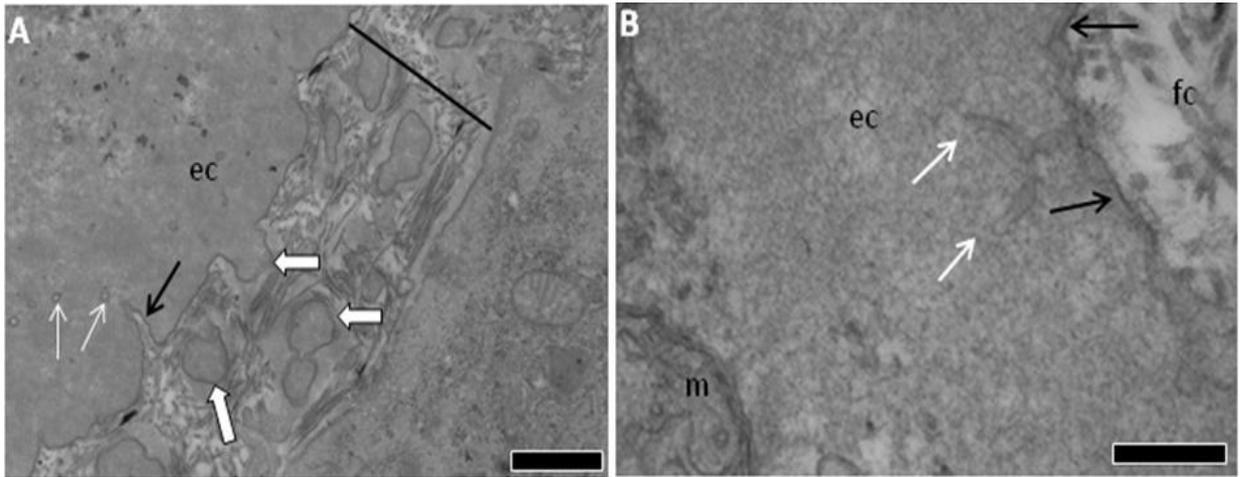


Figura 5: Fotomicrografia eletrônica da interface parasito-hospedeiro de *Myxobolus* sp. 1 encontrado nas brânquias de *Prochilodus costatus*. **A:** secção transversal dos canais de pinocitose (setas brancas) no ectoplasma do plasmódio (ec), invaginações da parede plasmodial para o ectoplasma (seta preta) e projeções (setas largas) para a camada das fibrilas de colágeno (linha preta). Barra de escala: 2 μ m. **B:** observam-se canais de pinocitose (setas brancas) no ectoplasma plasmodial (ec), membrana do plasmódio formada por uma única membrana (setas pretas), fibrilas de colágeno (fc) e parte de uma mitocôndria (m). Barra de escala: 2,5 μ m.

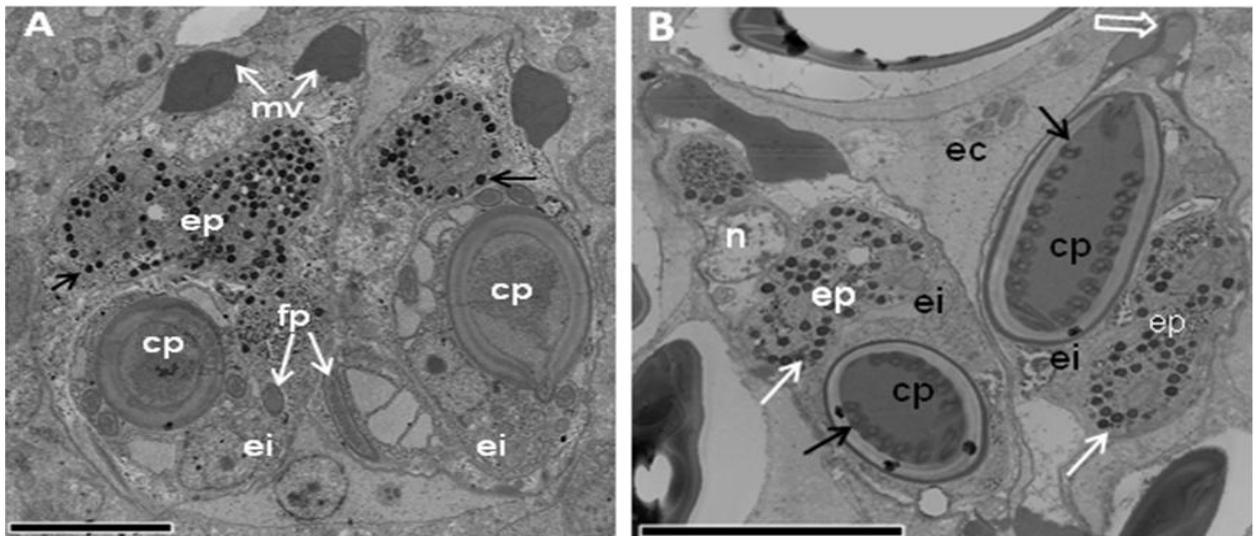


Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de *Myxobolus* sp. 1 encontrado nas brânquias de *Prochilodus costatus*. **A:** pansporoblasto com dois esporos imaturos (ei). Observe as cápsulas polares (cp), filamentos polares (fp), cortes das cápsulas polares e esporoplama (ep) com numerosos esporoplasmosomos escuros (setas pretas) e material formador da valva (mv). Barra de escala: 5 μ m. **B:** pansporoblasto em avançado estágio de desenvolvimento mostrando dois esporos imaturos (ei). Observe as cápsulas polares (cp) com os filamentos polares já interiorizados (setas pretas), esporoplasmosomos (setas brancas) e o ponto de junção das valvas (seta branca vazia). Barra de escala: 5 μ m.

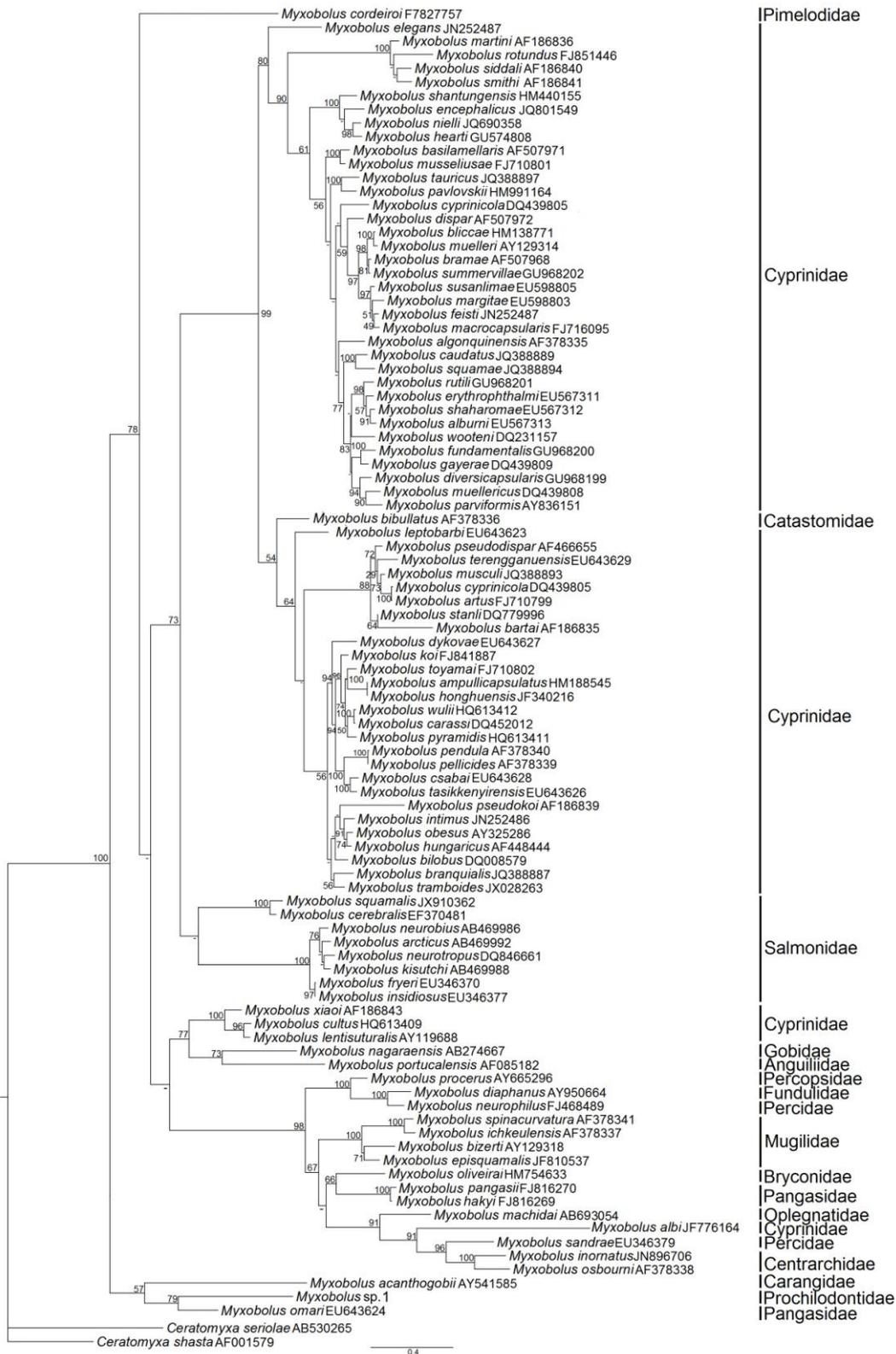


Figura 7: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) mostrando a relação entre *Myxobolus* sp. 1 e outras espécies de *Myxobolus* baseada na sequência do gene 18S rDNA. Os números de acesso no GenBank são dados após os nomes das espécies. Números acima dos nodos indicam o valor de confiança de *bootstrap* a 1.000 réplicas. Os traços indicam valores de *bootstrap* inferiores a 50%.

Discussão

Myxobolus sp. 1 foi comparada morfológicamente com todas as outras espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes da América do Sul (Azevedo et al. 2009; 2010; 2011; 2012; Eiras et al. 2010; Milanin et al. 2010). Das 33 espécies de *Myxobolus* conhecidas para este continente, duas já foram descritas infectando peixes do gênero *Prochilodus*: *Myxobolus porofilus* Adriano et al. 2002, encontrado infectando a cavidade visceral de exemplares de *P. lineatus* oriundos de pisciculturas do Estado de São Paulo e o arco branquial, nadadeiras e parede intestinal da mesma espécie de peixe em ambiente natural no Pantanal Matogrossense (Adriano et al. 2004), ambos relatados na bacia do Prata e *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010 encontrado infectando nadadeiras de exemplares de *P. argenteus* coletados no rio São Francisco. Entretanto, estas duas espécies de *Myxobolus* diferem da espécie deste estudo em relação ao sítio de infecção e, principalmente, pelos distintos tamanhos dos esporos, tendo *M. porofilus* 5,7 x 4,8 µm and *M. franciscoi* 6,4 x 6,0 µm enquanto *Myxobolus* sp. 1 tem 13,36 x 10,77 µm.

Em relação às espécies de *Myxobolus* parasitos de outros peixes sul americanos, *Myxobolus insignis* Eiras et al. 2005, parasito das brânquias do peixe amazônico *Semaprochilodus insignis* Jardine & Schomburgk, 1941, também da família Prochilodontidae, foi a espécie morfológicamente mais similar a *Myxobolus* sp. 1. Ambas infectam as brânquias, tem esporos arredondados e com medidas similares a espécie deste estudo. Porém, os esporos de *Myxobolus* sp. 1 diferem em relação à espessura (9,2 µm) e número de voltas dos filamentos polares (9-10 voltas), enquanto em *M. insignis* a espessura é de 7,8 µm e apenas 6 voltas. Apesar das duas espécies de parasitas ocorrerem em peixes da família Prochilodontidae, o fato de infectarem peixes de bacias hidrográficas distintas e relativamente distantes também, além da diferença morfométrica dos esporos, é um indício forte para afirmarmos que, embora sejam morfológicamente similares, correspondem a espécies distintas.

As análises ultraestruturais de *Myxobolus* sp. 1 mostraram que a esporogênese da espécie descrita neste trabalho segue o padrão geral de outras espécies de *Myxobolus* (Casal et al. 2002; Adriano et al. 2006), em que os estágios iniciais do desenvolvimento dos esporos ocorrem próximo a periferia do plasmódio, próximo a parede plasmodial, e os esporos maduros e esporoblastos ocorrem mais ao centro dessa estrutura (Hallet & Diamant, 2001).

A parede do plasmódio apresenta sistemas de transporte que os suprem com os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos esporos (Hallett & Diamant, 2001; El-Mansy & Bashtar, 2002). No plasmódio de *Myxobolus* sp. 1 foi observada a ocorrência de poucos canais de pinocitose. Contudo, além dos canais de pinocitose, o plasmódio tem numerosas invaginações e projeções na sua parede, que podem ser compreendidas como um mecanismo de expansão da área de contato do parasito com o tecido do hospedeiro, aumentando a capacidade de absorver nutrientes.

Na última década do século 20, os estudos taxonômicos de mixosporídeos eram principalmente baseados nas características dos esporos e plasmódios, sítio de infecção e espécie do hospedeiro (Ferguson et al. 2008). Contudo, nos recentes anos tem sido intensificado o uso do sequenciamento do gene 18S rDNA como um dado adicional na caracterização, bem como nas análises filogenéticas destes parasitos (Kent et al. 2001; Bahri et al. 2003; Fiala, 2006; Naldoni et al. 2011; Ye et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*). Tentativas de estudos moleculares e filogenéticos de mixosporídeos sul americanos são muito recentes (Adriano et al. 2009; Milanin et al. 2010; Naldoni et al. 2011; Azevedo et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*), com poucos dados moleculares disponíveis para as espécies dessa região.

Vários estudos filogenéticos tem apontado para a tendência dos mixosporídeos de agruparem de acordo com a família e/ou ordem dos hospedeiros, mostrando ser este um forte sinal de coevolução (Fiala, 2006; Ferguson et al. 2008; Naldoni et al. 2011; Adriano et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*). Isto foi igualmente evidenciado neste estudo, que focou apenas nas espécies do gênero *Myxobolus*. Nossa árvore filogenética mostrou um grande clado composto basicamente por espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes ciprinídeos, um clado menor agrupando parasitos de peixes salmonídeos e um clado agrupando *Myxobolus* parasitos de diferentes famílias de hospedeiros. Neste clado, ainda que se observem números restritos de espécies parasitos de cada uma das famílias de hospedeiro, (em muitos casos há apenas uma espécie de *Myxobolus* para uma determinada família de peixe), há influência do hospedeiro na formação de subclados, como visto no clado composto por espécies parasitos de mugilídeos, pangasídeos e centrachídeos.

O fato de *Myxobolus* sp. 1 se agrupar juntamente com *Myxobolus omari* (Szekely et al. 2009), parasito de um hospedeiro pangasídeo e *Myxobolus acanthogobii* (Yokoyama et al. 2004), parasito de um peixe carangídeo, pode ser justificado por ser esta a primeira sequência de um mixosporídeo parasito de peixes da família Prochilodontidae.

Agradecimentos

Agradecemos aos pesquisadores e estudantes dos laboratórios de Parasitologia (FZEA/Universidade de São Paulo) e de Genética Evolutiva (Universidade Federal de São Paulo). Somos gratos também à bióloga Tatiana Souza (Universidade Federal de São Paulo) pelo desenho dos esporos.

Referências Bibliográficas

- Adriano EA, Arana S, Ceccarelli PS, Cordeiro NS 2002. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes: Prochilodontidae) cultured in Brazil. *Folia Parasitol* 49: 259-262.
- Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS 2006. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructural. *Parasite* 13: 137-142.
- Adriano EA, Arana S, Alves AL, Silva MRM, Ceccarelli PS, Henrique-Silva F, Maia AAM 2009. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. *Vet Parasitol* 162: 221-229.
- Adriano EA, Carreiro MM, Maia AAM, Silva MRM, Naldoni J, Ceccarelli PS, Arana S 2012. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* ssp. in Brazilian Pantanal wetland. *Vet Parasitol* 185: 110-120.
- Adriano EA, Rego RF, Ceccarelli PS 2004. Parasitos do filo Myxozoa em curimbatá, (*Prochilodus lineatus*) (Osteichthyes: Prochilodontidae) do Pantanal Matogrossense, Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, SP* 17: 31-40.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Azevedo C, Casal G, Matos P, Ferreira I, Matos E 2009. Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei: Auchenipteridae). *J Eukaryot Microbiol* 56: 589-593.
- Azevedo C, Casal G, Mendonça I, Carvalho E, Matos P, Matos E 2010. Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 203-207.
- Azevedo C, Casal G, Marques D, Silva E, Matos E 2011. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the Piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). *J Eukaryot Microbiol* 58: 88-93.

- Azevedo C, Clemente SCS, Casal G, Matos P, Alves A, Al-Quraishy S, Matos E 2012. *Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae): morphology and pathology. *Syst Parasitol* 82: 241-247.
- Bahri S, Andree KB, Hedrick RP 2003. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *J Eukaryot Microbiol* 50: 463-470.
- Barta JR, Martin DS, Liberato PA, Dashkevich M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkinsbarrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 83: 262-271.
- Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PS, Maia AAM *no prelo*. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PloS One* (Prevision Screen 2013).
- Casal G, Matos E, Azevedo C 2002. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). *Dis Aquat Organ* 51: 107-112.
- Cech G, Molnár K, Székely C 2012. Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjae* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitol* 57: 354-366.
- Diamant A, Whipps CM, Kent ML 2004. A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: morphology, ultrastructural and phylogeny. *J Parasitol* 90: 1434-1442.
- Eiras JC, Monteiro CM, Brasil-Sato MC 2010. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* ssp. from South America. *Zoologia* 1: 131-137.
- El-Mansy A, Bashtar AR 2002. Histopathological and ultrastructural studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg 1987 (Myxosporea; Myxobolidae) parasitizing the suprabranchial organ of the freshwater catfish *Clarias gariepinus* Burchell 1822 in Egypt. *Parasitol Res* 88: 617-626.
- Ferguson JA, Atkinson SD, Whipps CM, Kent ML 2008. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J Parasitol* 94: 1322-1334.
- Feist SW 2008. *Myxozoan Diseases*. p: 613-682. In: Eiras JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG (Eds). *Fish Diseases*. Enfield, Science Publishers, 1308 pp.
- Fiala I 2006. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *J Parasitol* 36: 1521-1534.
- Froese R; Pauly D 2013. FishBase. Word Wide Web electronic publication. Disponível em: www.fishbase.org, versão (04/2013). Acesso em 16/03/2013.

- Guindon S, Gascuel O 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Hall TA 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hallett SL, Diamant A 2001. Ultrastructural and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Dis Aquat Organ* 46: 197-212.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devilin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48: 395-413.
- Lom J, Arthur JR 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Diseases* 12: 151-156.
- Lom J, Dyková I 2006. Myxozoa genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53: 1-36.
- Milanin T, Eiras JC, Arana S, Maia AAM, Alves AL, Silva MRM, Carriero MM, Ceccarelli PS, Adriano EA 2010. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 762-769.
- Molnár K, Eszterbauer E, Szekely C, Dan A, Harrach B 2002. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *J Fish Dis* 25: 643-652.
- Molnár K 2011. Remarks to the validity of GenBank sequences of *Myxobolus* ssp. (Myxozoa, Myxosporidae) infecting Eurasian fishes. *Acta Parasitol* 56: 263-269.
- Morris DJ 2010. Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. *Proc Biol Sci* 277: 2565-2570.
- Naldoni J, Arana S, Maia AAM, Silva MRM, Carriero MM, Ceccarelli PS, Tavares LER, Adriano EA 2011. Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analysis of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* ssp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Vet Parasitol* 177: 247-255.
- Nesnidal MP, Helmkampf M, Bruchhaus I, El-Matbouli M, Hausdorf B 2013. Agent of Whirling Disease Meets Orphan Worm: Phylogenomic Analyses Firmly Place Myxozoa in Cnidaria. *PLoS One* 8: 1-6.
- Posada D 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
- Rambaut A 2008. FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Sato Y, Godinho HP 2004. Migratory fishes of the São Francisco River. In Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A. (eds). *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. IDCRC, Victoria, p. 195-232.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Ye LT, Li W X, Wu SG, Wang GT 2012. Supplementary studies on *Henneguya doneci* Schulman, 1962 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gill filaments of *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China: histologic, ultrastructural, and molecular data. *Parasitol Res* 110:1509-1516.

Capítulo II

Caracterização molecular de *Myxobolus porofilus* e *Myxobolus* cf. *franciscoi* parasitos de peixes do gênero *Prochilodus* nos rios Mogi Guaçu, SP e São Francisco, MG.

Resumo

Myxobolus porofilus Adriano et al. 2002 foi descrito infectando a cavidade visceral do peixe *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1829 no rio Mogi Guaçu, SP. Posteriormente, *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010, uma espécie morfológicamente muito similar a *M. porofilus*, foi descrita infectando as nadadeiras de *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 no rio São Francisco, MG. Como em ambos os estudos apenas a descrição morfológica foi realizada, decidimos sequenciar o gene 18S rDNA e avaliar a validade destas duas espécies. Para este estudo, foram examinados exemplares de *Prochilodus* spp. oriundos dos rios São Francisco, MG e Mogi Guaçu, SP. Plasmódios contendo esporos característicos do gênero *Myxobolus* foram encontrados no ceco gástrico e nadadeiras de exemplares de *P. costatus* oriundos do rio São Francisco e nas nadadeiras de *P. lineatus* do rio Mogi Guaçu. As análises morfológicas permitiram identificar como sendo de *M. cf. franciscoi* e *M. porofilus* os plasmódios encontrados nestes respectivos hospedeiros. A análise de similaridade processada no programa MEGA 5.0 mostrou que as sequências das duas espécies apresentaram 5% de diferença, com um total de 57pb diferentes. A análise filogenética de Máxima Verossimilhança utilizando sequências parciais do gene 18S rDNA para espécies de *Myxobolus* spp. e *Henneguya* spp., mostrou um agrupamento parafilético em que as espécies de parasitos se agrupam de acordo com a família de hospedeiros. *M. porofilus* e *M. cf. franciscoi* formaram, junto com *Myxobolus* sp. 1, um clado formado apenas por parasitos de peixes prochilodontídeos. Este estudo corrobora o estudo de Eiras et al. (2010), que *M. cf. franciscoi* e *M. porofilus* são espécies distintas.

Palavras-chave: Myxozoa - *Myxobolus* - 18S rDNA - Prochilodontidae - filogenia

Abstract

Myxobolus porofilus Adriano et al. 2002 was described infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1829 fish from the Mogi Guaçu River (SP). Subsequently, *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010 a species morphologically very similar to *M. porofilus* was described infecting the fins of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 from the São Francisco River, Brazil. In both studies only a morphological description was performed. Therefore, it was decided to perform 18S rDNA gene sequencing to evaluate these two species. In the present study, specimens of *Prochilodus* spp. taken from the São Francisco (MG) and Mogi Guaçu (SP) Rivers were examined. Plasmodia containing spores characteristic of the *Myxobolus* genus were found in the cecum gastric and fins of specimens of *P. costatus* taken from the São Francisco River and the fins of *P. lineatus* from the Mogi Guaçu River. Morphological analysis identified the plasmodia found in these respective hosts as *M. cf. franciscoi* and *M. porofilus*. Similarity analysis performed using MEGA 5.0 showed that the sequences of the two species are 5% different, with a difference total of 57pb. Maximum likelihood phylogenetic analysis using the 18S rDNA gene for species of *Myxobolus* spp. and *Henneguya* spp. showed paraphyletic clustering in which parasite species are grouped according to host family. *M. porofilus* and *M. cf. franciscoi* formed, together with *Myxobolus* sp. 1, a clade comprised solely of parasites of Prochilodontidae. The present study corroborates the study by Eiras et al. (2010), which found that *M. cf. franciscoi* and *M. porofilus* are distinct species.

Keywords: Myxozoa - *Myxobolus* - 18S rDNA - Prochilodontidae - phylogeny

Introdução

Mixosporídeos são endoparasitos obrigatórios de animais vertebrados e invertebrados (Békési et al. 2002). Nas poucas espécies em que o ciclo de vida já foi elucidado, pode-se observar dois estágios, o estágio mixosporo, que infecta os hospedeiros vertebrados (anfíbios, répteis, aves, mamíferos e principalmente peixes) (Bartholomew et al. 2008) e o estágio actinosporo, que ocorre nos anelídeos, hospedeiros invertebrados (Békési et al. 2002).

Myxobolus Butschli, 1882 é o gênero mais especioso dentro da classe Myxosporea, com ampla distribuição geográfica, infectando peixes nas diferentes regiões do planeta (Eiras et al. 2007). São reconhecidas aproximadamente 800 espécies em todo o mundo, com muitas outras sendo descritas constantemente, inclusive na América do Sul (Eiras et al. 2005; Lom & Dyková, 2006).

Os esporos de *Myxobolus* spp. tem características muito similares, o que torna complexa a descrição das espécies baseada somente na morfologia (Molnár et al. 2002; Bahri et al. 2003; Zhao et al. 2008; 2009). Atualmente, a combinação de dados genéticos, morfológicos e ecológicos (como localização geográfica, especificidade parasito-hospedeiro), tem sido empregada para uma discriminação taxonômica mais acurada dos organismos desse grupo (Adlard & Gleeson, 2011).

Dados moleculares tem permitido o avanço de nossa compreensão sobre mixosporídeos (Adlard & Gleeson, 2011) e atualmente um grande esforço tem sido realizado para o sequenciamento das espécies recentemente descritas. As técnicas de sistemática molecular também tem se tornado uma ferramenta importante em estudos taxonômicos e filogenéticos destes parasitos (Zhao et al. 2008).

Para o filo Myxozoa, o gene 18S rDNA tem sido o marcador mais empregado para a identificação dos organismos e recentes estudos mostram que este gene também é efetivo para inferir as relações filogenéticas do grupo e entre os indivíduos (Fiala & Bartosová, 2010). Este marcador é particularmente útil pela sua alta variação entre espécies próximas (Kent et al. 2001).

Eiras et al. (2010) descreveram *Myxobolus franciscoi* infectando o tecido conjuntivo das nadadeiras de exemplares de *Prochilodus argenteus* Valenciennes, 1850 coletados na bacia do rio São Francisco, MG. Neste mesmo estudo, os autores compararam esta espécie com *Myxobolus porofilus* Adriano et al. 2002 na cavidade visceral de *Prochilodus lineatus*

Valenciennes, 1836 em viveiros de piscicultura do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP.

Apesar da grande semelhança morfológica entre os esporos de *M. franciscoi* e *M. porofilus* e por infectarem peixes filogeneticamente muito próximos, ambos do gênero *Prochilodus*, Eiras et al. (2010) propuseram a criação do novo táxon. Para tanto, estes autores basearam-se na pequena diferença observada no tamanho dos esporos e das cápsulas polares, no fato de infectarem órgãos distintos e por ocorrerem em bacias hidrográficas diferentes.

Este estudo teve por objetivo realizar o sequenciamento do gene 18S rDNA de *M. franciscoi* e *M. porofilus* de maneira a avaliar a validade das duas espécies.

Material e Métodos

Foram coletados 16 espécimes adultos de *P. costatus* e 30 de *P. argenteus* no rio São Francisco, município de Pirapora, Minas Gerais, Brasil (17°12'75"S, 44°50'95"W) em dezembro de 2011 e 2012 e 26 exemplares adultos de *P. lineatus* no rio Mogi Guaçu, município de Pirassununga, São Paulo, Brasil (21°55'37"S, 47°22'03"W) em agosto de 2012 e fevereiro de 2013.

Os peixes capturados foram eutanasiados por dose excessiva de cloridrato de lidocaína, em seguida medidos e necropsiados (metodologia aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - CEP: 0128/12). Tecidos e órgãos contendo cistos dos parasitos foram preservados em etanol absoluto Merck® para as futuras análises moleculares. No laboratório, os esporos frescos foram fotografados e as medidas de 28 esporos foram feitas conforme estabelecido por Lom & Arthur (1989), em um microscópio de luz Leica DM 1000, equipado com um *software* de captura e medida de imagens Leica Application Suite version 1.6.0.

Para as análises moleculares, "DNeasy Blood & Tissue Kit" (QIAGEN, CA, EUA) foi utilizado para a extração do DNA das espécies estudadas, segundo as instruções do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose 2% pela comparação com o padrão de quantificação de bandas "Low Mass" (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi processada com o uso dos iniciadores (*primers*) descritos na Tabela 1, de maneira a amplificar fragmentos de aproximadamente 2.100pb. A PCR foi realizada com um volume final de 25 µL: 2 µl do DNA extraído (10-

50ng/μL), 0,25 μl de Taq DNA Polimerase 5U/μl (Invitrogen By Life Technologies, MD, USA), 0,50 μl de dNTPs (10mM) (Invitrogen By Life Technologies, MD, USA), 0,50 μl de cada iniciador (10pmol), 2,5 μl of 10x Taq DNA Polimerase buffer (Invitrogen By Life Technologies, MD, USA), 1,25 μL de MgCl₂ (1.5mM) (Invitrogen By Life Technologies, MD, USA) e 17,5 μl de água ultra pura MilliQ®.

A reação foi processada em um termociclador “ABI Veriti® Thermal Cycler” (Applied Biosystems, CA, EUA). Uma etapa inicial de denaturação foi realizada a 95°C por 60 s, anelamento a 58°C por 60 s e extensão a 72°C por 120 s, seguido por uma etapa final de extensão a 72°C for 5 min. Os fragmentos obtidos foram comparados com o padrão “1kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen By Life Technologies, MD, EUA) em eletroforese de gel de agarose com o tampão Tris-Borato-EDTA (0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA, pH 8.0) corados com GelRed®, analisados em um transluminador “DNR - MiniBis Pro”. Os produtos da PCR foram purificados em “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado usando BigDye® 102 Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, EUA) em “ABI 3730 DNA 103 Analyzer” (Applied Biosystems, CA, EUA) usando os mesmos *primers*.

Tabela 1: Lista dos *primers* utilizados na amplificação e no sequenciamento do gene 18S rDNA das espécies estudadas.

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
Erib 1 (<i>forward</i>)	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Barta et al. (1997)
Act1r (<i>reverse</i>)	5'-AATTTACCTCTCGCTGCCA-3'	Hallett & Diamant (2001)
Myxgen4f (<i>forward</i>)	5'-GTGCCTTGAATAAATCAGAG-3'	Diamant et al. (2004)
Erib10 (<i>forward</i>)	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'	Barta et al. (1997)
MC5 (<i>forward</i>)	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Molnár et al. (2002)
MC3 (<i>reverse</i>)	5'-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA-3'	Molnár et al. (2002)

A confirmação de que as sequências obtidas correspondem ao grupo de interesse foi feita utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997). As sequências parciais do gene 18S rDNA de *M. franciscoi* e *M. porofilus*, mais as demais sequências de *Myxobolus* spp. e *Henneguya* spp. utilizadas nas análises filogenéticas

foram visualizadas, editadas e alinhadas usando o algoritmo ClustalW (Thompson, 1994) inserido no programa BioEdit 7.1.3.0, utilizando as configurações padrão (Hall, 1999).

A posição filogenética das duas espécies desse estudo foi comparada com 64 sequências de *Myxobolus* spp. e *Henneguya* spp. disponíveis no site GenBank, mais a sequência da espécie *Myxobolus* sp. 1, descrita no capítulo I. Para a análise de Máxima Verossimilhança o melhor ajuste evolutivo de substituição dos nucleotídeos foi determinado usando o software jModeltest 0.1 (Posada, 2008), que selecionou o modelo *general time reversible* (GTR+I+G), sendo que as frequências dos nucleotídeos foram (A= 0,2389, T= 0,2906, G= 0,2797, C= 0,1908). As taxas dos diferentes tipos de frequências de nucleotídeos estimadas foram (AC= 1,4444, CT= 3,8912, CG= 0,6669, AT= 1,6126, AG= 3,1424, GT= 1,0000) e a distribuição gamma obtida foi de 0,400. A proporção dos sítios invariáveis obtida foi 0,0000.

A análise de Máxima Verossimilhança (MV) foi processada no programa PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) com os valores de *bootstrap* calculados usando 500 réplicas. *Ceratomyxa shasta* (AF001579) e *Ceratomyxa seriolae* (AB530265) foram usadas como grupo externo. As árvores obtidas foram visualizadas no programa Figtree 1.3.1 (Rambaut, 2008) e editadas usando Adobe Photoshop®.

De forma a obtermos o grau de similaridade molecular entre as espécies alvo deste estudo as sequências foram alinhadas usando o programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011) com possíveis *gaps* tratados com *missing data*.

Resultados

Dos 16 exemplares de *P. costatus* examinados, 6 (37,5%) tinham no ceco gástrico e nas nadadeiras, plasmódios contendo esporos morfologicamente correspondentes àqueles de *M. franciscoi* (Figura 1A, B). Dos 26 espécimes de *P. lineatus*, 2 (7,69%) apresentaram plasmódios de *M. porofilus* parasitando as nadadeiras (Figura 2A, B). Nenhum dos 30 exemplares de *P. argenteus* examinados apresentou infecção por *M. franciscoi*. Como *M. franciscoi* foi originalmente descrita a partir de *P. argenteus* e não de *P. costatus*, nos resultados aqui apresentados deu-se preferência por identificar esta espécie como *Myxobolus* cf. *franciscoi*, até que se possa realizar o sequenciamento de amostras oriundas de *P. argenteus* e confirmar tratar-se da mesma espécie.

Dados morfológicos (Figuras 1 e 2)

Myxobolus porofilus Adriano, Arana, Ceccarelli & Cordeiro, 2002.

Plasmódios brancos e arredondados medindo em média 3 mm encontrados na cavidade visceral e também nadadeiras. Os esporos mediam $6,3 \pm 0,4$ μm de comprimento, $6,1 \pm 0,3$ μm de largura. As cápsulas polares mediam $1,9 \pm 0,3$ μm de comprimento, $1,4 \pm 1,1$ μm de largura, contendo filamentos polares com 4 voltas.

Myxobolus cf. franciscoi Eiras, Monteiro & Brasil-Sato, 2010.

Plasmódios brancos e arredondados medindo em média 2 mm encontrados no ceco gástrico e na nadadeira. Os esporos apresentaram $6,9 \pm 1,1$ μm de comprimento, $5,9 \pm 0,5$ μm de largura e $4,3 \pm 0,8$ de espessura. As cápsulas polares tinham tamanhos iguais e mediram $2,1 \pm 0,2$ μm de comprimento e $1,4 \pm 0,1$ μm de largura e apresentaram filamentos polares com 4 voltas.

Na Tabela 2 são apresentados os dados comparativos considerando também as medidas das descrições originais de ambas as espécies.

Em relação ao sequenciamento do gene 18S do rDNA, foi obtido um fragmento parcial de 1.182pb para *M. cf. franciscoi* e de 1.403pb para *M. porofilus*. A análise de similaridade mostrou que as sequências das duas espécies apresentaram 5% de diferença, com um total de 57pb distintas.

A análise filogenética, utilizando sequências de espécies de *Myxobolus/Henneguya* disponíveis no GenBank, mais as duas sequências obtidas neste estudo e aquela de *Myxobolus* sp. 1 resultante do capítulo I, mostrou uma divisão em dois clados principais (A-B), sendo que o agrupamento das espécies ocorreu de acordo com a família dos hospedeiros (Figura 3). O clado A, apresentou uma subdivisão onde em um subclado agrupou duas espécies de *Henneguya* parasitos de um Siluriformes da família Bagridae e, no outro, *M. porofilus*, *M. cf. franciscoi* e *Myxobolus* sp. 1, todos parasitos de prochilodontídeos. O clado B apareceu subdividido em dois grandes subclados (B1 e B2). O clado B1 subdividiu-se ainda em dois outros subclados, sendo um, composto por espécies de *Myxobolus e Henneguya* parasitos de hospedeiros de cinco diferentes famílias, e o outro abrangendo as espécies parasitos de Siluriformes de três famílias e *Myxobolus oliveirai* Milanin et al. 2010 parasito de Characiformes. O clado B2 agrupou espécies parasitos de Cypriniformes e Salmoniformes.

Tabela 2: Medidas dos esporos das espécies *M. cf. franciscoi* e *M. porofilus*, obtidas neste estudo, mais as medidas das descrições originais, incluindo o sítio de infecção, hospedeiro e localidade. CE: comprimento do esporo, LE: largura do esporo, E: espessura do esporo, CCP: comprimento das cápsulas polares, LCP: largura das cápsulas polares, F: número de voltas dos filamentos polares, S/H: sítio de infecção e hospedeiro, L: local da coleta (rio).

Espécie	CE	LE	E	CCP	LCP	F	S/H	L
<i>M. cf. franciscoi</i> (neste estudo)	6,9 ± 1,1	5,9 ± 0,5	4,3 ± 0,8	2,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	4	Ceco e nadadeira de <i>P. costatus</i>	Rio São Francisco, MG.
<i>M. franciscoi</i> (Eiras et al. 2010)	6,4	6,0	3,2	2,0	1,5	3	Nadadeira de <i>P. argenteus</i>	Rio São Francisco, MG.
<i>M. porofilus</i> (neste estudo)	6,3 ± 0,4	6,1 ± 0,3	-	1,9 ± 0,3	1,4 ± 1,1	4	Nadadeira de <i>P. lineatus</i>	Rio Mogi Guaçu, SP.
<i>M. porofilus</i> (Adriano et al. 2002)	5,7 ± 0,3	4,8 ± 0,2	-	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3	Cavidade e nadadeira de <i>P. lineatus</i>	Rio Mogi Guaçu, SP.

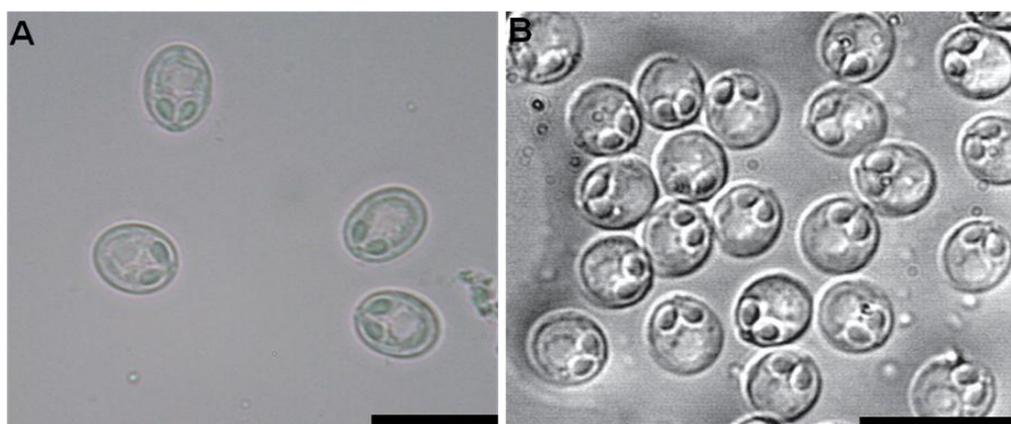


Figura 1: **A:** *Myxobolus cf. franciscoi* coletado no ceco gástrico de *Prochilodus costatus* no rio São Francisco, MG. **B:** *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010. Escala: 10 µm.

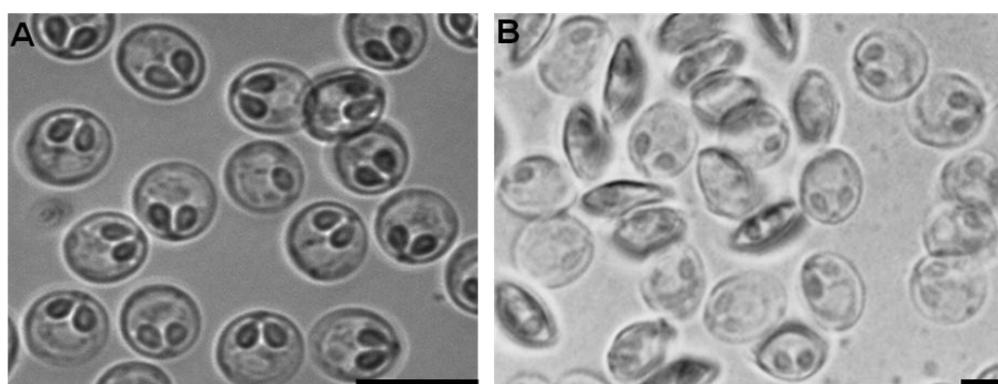


Figura 2: **A:** *Myxobolus porofilus* coletado das nadadeiras de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, SP. Escala: 10 µm. **B:** *Myxobolus porofilus* Adriano et al. 2002. Escala: 5 µm.



Figura 3: Inferência filogenética com o método de Máxima Verossimilhança (GTR+I+G) para o gene 18S rDNA, de *Myxobolus* spp. e *Henneguya* spp., processada no software PhyML 3.0. O suporte de *bootstrap* realizado com 500 réplicas está indicado próximo dos nodos. Os números do acesso no site GenBank estão em seguida do nome das espécies. Os nomes dos taxa dos hospedeiros (famílias e ordens) estão após os clados. Nodos não bem suportados (menores que 50% de bootstrap estão marcados por hífen).

Discussão

Estudos taxonômicos de mixosporídeos feitos exclusivamente com o uso de caracteres morfológicos podem gerar resultados enganosos devido à baixa variabilidade intraespecífica contida nos esporos das espécies (Lom & Arthur, 1989; Andree et al. 1999; Ferguson et al. 2008; Zhao et al. 2008; Adriano et al. 2012; Cech et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*). Uma maneira de se minimizar os erros na identificação/descrição de mixosporídeos tem sido a combinação de dados morfológicos/ecológicos (dimensões e morfologia de esporos e plasmódios e a especificidade de hospedeiro e de tecido e/ou órgão de infecção) (Lom & Artur, 1989) com dados moleculares (sequenciamento do gene 18S rDNA) (Andree et al. 1999; Cech et al. 2012).

As espécies *M. porofilus* e *M. franciscoi* são morfológicamente muito semelhantes e foram descritos a partir de hospedeiros do mesmo gênero (*P. lineatus* e *P. argenteus*), mas em bacias hidrográficas distintas (Adriano et al. 2002; Eiras et al. 2010). Na descrição original, Eiras et al. (2010) utilizaram como critério de separação das espécies o fato de que em *M. porofilus* os esporos (5,7 µm) e as cápsulas polares (1,6 µm) apresentam tamanhos levemente menores que em *M. franciscoi* (6,4 µm e 2 µm, respectivamente), e ainda, por infectarem órgãos distintos (*M. porofilus* - cavidade visceral e *M. franciscoi* - nadadeira). Entretanto, neste estudo, como visto em *M. franciscoi* (Eiras et al. 2010), *M. porofilus* foi também encontrada infectando nadadeiras, sugerindo que para estas espécies não há especificidade de órgão.

Embora tenham sido examinados 30 exemplares de *P. argenteus*, nenhum apresentou infecção por *M. franciscoi*. Contudo, dos exemplares de *P. costatus* examinados, 37,5% apresentaram no ceco gástrico e nas nadadeiras, plasmódios contendo esporos morfológicamente similares aos de *M. franciscoi*. Tem sido registrado que várias espécies de mixosporídeos apresentam capacidade de infectar hospedeiros filogeneticamente próximos (Molnár et al. 1998; Adriano et al. 2012; Carriero et al. *no prelo*). Apesar da espécie de *Myxobolus* encontrada em *P. costatus* ter esporos similares a *M. franciscoi*, e de terem sido encontrados em um hospedeiro do mesmo gênero e na mesma bacia hidrográfica, esta espécie foi aqui identificada com *M. cf. franciscoi*.

A análise filogenética resultou em dois clados principais (clados A e B), havendo uma clara tendência para o agrupamento de acordo com a família de hospedeiro (Figura 3), sugerindo ser este um forte sinal evolutivo entre os espécies de *Myxobolus/Henneguya*, como

já indicaram Ferguson et al. (2008); Adriano et al. (2012) e Carriero et al. (*no prelo*). A subdivisão do clado A resultou em um subclado composto por duas espécies de *Henneguya* parasitos de um Siluriformes da família Bagridae e outro subclado comportando *M. porofilus*, *M. cf. franciscoi* e *Myxobolus* sp. 1, todos parasitos prochilodontídeos. O grande clado B, apresentou subdivisões, originando os subclados B1 e B2. O B1 subdividiu ainda em dois outros subclados, sendo um composto por espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* parasitos de hospedeiros de cinco diferentes famílias, e o outro abrigando as espécies parasitos de Siluriformes de três famílias. Neste subclado, porém, aparece também, e de forma ainda incompreensível, *M. oliveirai*, que é o único parasito de peixes da família Bryconidae com sequência no GenBank. Já no clado B2 agruparam espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* parasitos de peixes Salmoniformes e de Cyprinidae.

Apesar dos agrupamentos ocorrerem seguindo a família de hospedeiro, no caso das espécies parasitos de prochilodontídeos, *M. porofilus* apresentou maior afinidade filogenética com *M. cf. franciscoi*, que é parasito de *P. costatus*, que em relação à *Myxobolus* sp. 1, que infecta a mesma espécie de peixe na mesma bacia hidrográfica. Este registro, somado às semelhanças morfológicas observadas entre *M. porofilus* e *M. cf. franciscoi*, podem permitir inferir que o ancestral comum destas duas espécies de mixosporídeos estava presente no ancestral comum de *P. lineatus* e *P. costatus*, sendo a especiação recente e relacionada com a especiação dos hospedeiros, provavelmente relacionada com as barreiras geográficas (distintas bacias hidrográficas).

Este estudo novamente demonstrou que os gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* não são monofiléticos, como já afirmado por Kent et al. (2001), Liu et al. (2010), Carriero et al. (*no prelo*). A clássica distinção entre *Myxobolus* e *Henneguya* é baseada em apenas um caracter morfológico, a presença do processo caudal em *Henneguya* spp. (Lom & Dyková, 1992). Mas as análises moleculares do gene 18S rDNA não suportam a separação filogenética de *Henneguya* e *Myxobolus*.

Fiala (2006) afirmou que o processo caudal, presente em todas as espécies do gênero *Henneguya*, não representa um caracter válido para a separação dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*. Liu et al. (2010), por exemplo, descreveu uma nova espécie, *Myxobolus turpisrotundus*, em que se observa pela primeira vez a presença de um apêndice caudal em espécies do gênero *Myxobolus*, enfatizando que o processo caudal não é um caracter válido na separação dos gêneros em questão.

Conclusão

Este estudo permitiu concluir, a partir de informações baseadas nas análises moleculares em conjunto com os dados morfológicos, que duas espécies morfológicamente muito similares, *M. cf. franciscoi* e *M. porofilus*, encontradas infectando hospedeiros filogeneticamente muito próximos são espécies distintas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / ICMBIO-IBAMA, Pirassununga, SP, pela ajuda nas coletas no rio Mogi Guaçu.

Referências Bibliográficas

- Adlard RD, Gleeson RJ 2011. Phylogenetic relationships amongst *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxozoa: Myxosporea), and the description of six novel species from Australian elasmobranchs. *Parasitol Int* 31: 267-274.
- Adriano EA, Arana S, Ceccarelli PS, Cordeiro NS 2002. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes: Prochilodontidae) cultivated in Brazil. *F Parasitol* 49: 259-262.
- Adriano EA, Carreiro MM, Maia AAM, Silva MRM, Naldoni J, Ceccarelli PS, Arana S 2012. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplamodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. *Vet Parasitol* 185: 110-120.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Andree KB, El-Matbouli M, Hoffman RW, Hedrick RP 1999. Comparison of 18S and ITS-1 rDNA sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis*. *Int J Parasitol* 29: 771-775.
- Bahri S, Andree KB, Hedrick RP 2003. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *J Eukaryot Microbiol* 50: 463-470.
- Barta JR, Martin DS, Liberato PA, Dashkevich M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkinsbarrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 83: 262-271.

- Bartholomew JL, Atkinson SD, Hallett SL, Lowenstine LJ, Garner MM, Gardiner CH, Keel MK, Brown JD 2008. Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int J Parasitol* 38: 1199-1207.
- Békési L; Székely C; Molnár K. 2002. Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39: 271-276.
- Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PS, Maia AAM *no prelo*. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *Plos one* (Previsão de Publicação: 2013).
- Cech G, Molnár K, Székely C 2012. Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjae* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitol* 57: 354-366.
- Diamant A, Whipps CM, Kent ML 2004. A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: morphology, ultrastructural and phylogeny. *J Parasitol* 90: 1434-1442.
- Eiras JC, Molnár K, Lu YS 2005. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitol* 61: 1-46.
- Eiras JC, Abreu PC, Robaldo R, Pereira Junior J 2007. *Myxobolus platanus* n. sp. (Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) from Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59: 895-898.
- Eiras JC, Monteiro CM, Brasil-Sato MC. 2010. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. from South America. *Zoologia* 27: 131-137.
- Ferguson JA, Atkinson SD, Whipps CM, Kent ML 2008. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J Parasitol* 94: 1322-1334.
- Fiala I 2006. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *J Parasitol* 36: 1521-1534.
- Fiala I, Bartosová P 2010. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology* 228: 1-13.
- Guindon S, Gascuel O 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biology* 52: 696-704.
- Gunter NL, Adlard RD 2009. Seven new species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxozoa) from the gall-bladders of serranid fishes from the Great Barrier Reef, Australia. *Syst Parasitol* 73: 1-11.
- Hall TA 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

- Hallet SL, Diamant A 2001. Ultrastructural and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Dis Aquat Organ* 46: 197-212.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew, JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin, RH, Feist SW, Hedrich RP, Hoffmann RW, Khattra 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 395-413.
- Liu Y, Whipps CM, Gu ZM, Zeng LB 2010. *Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence. *Parasitol Res* 107: 699-706.
- Lom J, Arthur JR 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Diseases* 12: 151-156.
- Lom J, Dyková I 2006. Myxozoan genera: definition and notes of taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53: 1-36.
- Molnár K, Eszterbauer E, Szekely C, Dan A, Harrach B 2002. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *J Fish Diseases* 25: 643-652.
- Molnár K, Ranzani-Paiva MJ, Eiras JC, Rodrigues EL 1998. *Myxobolus macropylasmoidal* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus*, in Brazil. *Acta Protozool* 37: 241-245.
- Molnár K, Székely C, Hallett SL, Atkinson SD 2009. Some remarks on the occurrence, host-specificity and validity of *Myxobolus rotundus* Nemeček, 1911 (Myxozoa: Myxosporea). *Syst Parasitol* 72: 71-79.
- Posada D 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
- Rambaut A 2008. FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Zhao Y, Sun C, Kent ML, Deng J, Whipps CM 2008. Description of a new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data. *J Parasitol* 94: 737-742.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Myxobolus* sp. 1, encontrado infectando as brânquias de *P. costatus* no rio São Francisco, MG, de acordo com as análises morfológicas, ultraestruturais e moleculares, é uma espécie ainda não descrita;
- *Myxobolus* cf. *franciscoi* e *Myxobolus porofilus*, embora morfológicamente muito similares, são espécies geneticamente distintas;
- As espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes da família Prochilodontidae, cujo gene 18S rDNA foi sequenciado, formaram um clado bem suportado, em que *M. cf. franciscoi* e *M. porofilus* são mais próximas do que *Myxobolus* sp. 1, que parasita a mesma espécie de peixe que *M. cf. franciscoi*;
- Foi observada a tendência das espécies de parasitas do filo Myxozoa de se agruparem principalmente pela família dos hospedeiros, mostrando um forte sinal de coevolução.