

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANUEL LUIS RAZZOLINI

**Ecologia Histórica de espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea, Platyhelminthes)
compartilhadas por *Corydoras* spp. do Alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil**

CURITIBA

2015

EMANUEL LUIS RAZZOLINI

Ecologia Histórica de espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea, Platyhelminthes)
compartilhadas por *Corydoras* spp. do Alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração Ecologia.

Orientador: Prof. Walter Antonio Pereira Boeger, Ph.D.

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



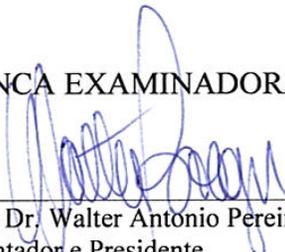
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu EMANUEL LUIZ RAZZOLINI para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

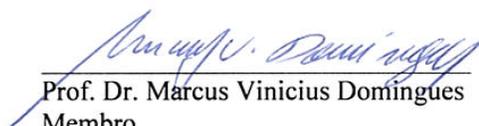
Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2015.

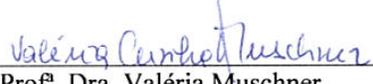
BANCA EXAMINADORA:



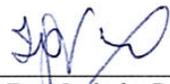
Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger
Orientador e Presidente



Prof. Dr. Marcus Vinicius Domingues
Membro



Prof.ª Dra. Valéria Muschner
Membro



Visto: Prof.ª Dra. Isabela Galarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO



Agradecimentos

Primeiramente me sinto no dever de agradecer ao Prof. Walter Boeger, mestre e pesquisador como poucos que encontrei em todo meu caminho acadêmico. Primeiramente, pela oportunidade de estagiar sob sua orientação, e também permitir o ingresso no mestrado, um sonho pessoal meu, agradeço por todo suporte, apoio e críticas que contribuíram para meu crescimento nesse período. Nos vários anos de laboratório aprendi muito mais do que imaginei e acredito que o crescimento acadêmico e pessoal foi enorme. Fica aqui meu muito obrigado.

Agradeço também aos colegas de laboratório Lu, Taisa e Alíni que em porções grandes ou pequenas me acompanharam e auxiliaram nesse período e, assim como eu, sofrem com esses bichos complicados que resolvem funcionar em períodos curtos. A Lu em especial por todo aprendizado que tive em tudo no laboratório, sem isso não teria sido possível concluir essa dissertação.

Também não posso esquecer do Baggio, Marcel, Flávio, Day, Letícia, Carol e Sabrina que ajudaram de diferentes maneiras, desde problemas com escalas, até almoços com boas risadas. Agradeço também ao professor Rogério Vianna por enviar material que foi de grande auxílio neste trabalho.

À minha turma de mestrado, que me acompanhou nesse período, em especial à minha amiga Bianca Possamai que, mesmo acreditando que falta metade dela, me ajudou nos momentos complicados, rendeu boas conversas e bons brigadeiros.

Agradeço mais que tudo meus pais e minha irmã, e porque não meu cachorro, que me acompanham desde que me conheço por gente e, à duras penas em alguns momentos possibilitaram que continuasse meus estudos e, se estou aqui hoje, é por causa deles e dos seus esforços. Esse momento sem vocês não seria o mesmo.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Ingrid Giacomeli que, como ela mesmo diz, participou de $\frac{1}{4}$ desse período mas foi de extrema importância. Obrigado pelo companheirismo, apoio, carinho, por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava e também por me aguentar nos momentos em que nem eu mesmo aguentava. Fico muito feliz que você tenha participado comigo desse $\frac{1}{4}$ do período.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	13
2. Materiais e Métodos	18
2.1 Desenho experimental e teste de hipóteses	18
2.2 Coleta dos hospedeiros e identificação dos parasitos	22
2.3 Processamento morfológico dos parasitos	22
2.3.1 <i>Gyrodactylus corydori</i> vs <i>G. anisopharynx</i>	23
2.4 Processamento molecular	23
2.4.1 Extração do DNA	23
2.4.2 Amplificação do DNA	23
2.5 Análise filogenética	24
2.6 Morfometria Geométrica	25
2.7 Genética populacional	27
2.8 Reconstrução do hospedeiro ancestral	27
2.9 Demografia populacional	27
3. Resultados	28
3.1 Amostragens	28
3.2 Distribuição geográfica dos sistemas hospedeiros parasitos	28
3.3 Relações Filogenéticas entre as espécies de <i>Gyrodactylus</i>	29
3.4 <i>Gyrodactylus corydori</i> vs <i>G. anisopharynx</i>	30
3.4.1 Código de barras genético	34
3.4.2 Morfometria geométrica	34
3.5 Genética populacional e filogeografia	36
3.5.1 Haplótipos	36
3.6 Genética populacional	42

3.6.1 <i>Gyrodactylus anisopharynx</i>	42
3.6.2 <i>Gyrodactylus corydori</i>	42
3.6.3 <i>Gyrodactylus superbus</i>	43
3.7 Reconstrução dos hospedeiros ancestrais	43
3.7.1 <i>Gyrodactylus anisopharynx</i>	43
3.7.2 <i>Gyrodactylus corydori</i>	46
3.7.3 <i>Gyrodactylus superbus</i>	48
3.8 História demográfica	50
3.8.1 <i>Gyrodactylus anisopharynx</i>	50
3.8.2 <i>Gyrodactylus corydori</i>	50
3.8.3 <i>Gyrodactylus superbus</i>	51
3.9 Teste de Predições	55
4. Discussão	59
4.1 Taxonomia Integrativa: testando a validade de <i>G. anisopharynx</i> e <i>G. corydori</i> .	59
4.2 Associação histórica	60
4.3 O uso dos hospedeiros	63
4.4 Testando protocolo de detecção de trocas de hospedeiros	65
Referências	67
Anexo 1	72
Anexo 2	74

Lista de Figuras

- Figura 1:** Disposição dos cinco *landmarks* utilizados na análise em um gancho de *G. corydori*. Para as duas espécies foram utilizados os mesmos *landmarks* (Fotos de M. Bueno-Silva). 26
- Figura 2:** Distribuição dos hospedeiros na região de acordo com Reis et al. (2003). Em cinza, a distribuição de *C. paleatus* e em preto *C. ehrhardti*. Nos pontos vermelhos estão indicados os locais de coletas, especificados no Anexo 1. (Mapa adaptado de: <http://www.mapcruzin.com/free-world-maps/free-south-america-map.htm>). 29
- Figura 3:** Filogenia bayesiana baseada no fragmento ribossomal 18S. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. 30
- Figura 4:** Filograma enraizado de Neighbor-Joining (NJ) baseado no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II. O suporte de ramo foi obtido através de 1000 repetições de bootstrap. 32
- Figura 5:** Cladograma enraizado das análises Bayesianas baseado no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) das três espécies citadas. Valores de probabilidade superiores a 0,80 são representados nos ramos. Barras representam a probabilidade de 95% dos valores de densidade para cada evento de divergência. Espécies com posições contraditórias estão representados com asterisco. 33
- Figura 6:** Análise de Variável Canônica dos espécimes de *G. anisopharynx* (em preto) e *G. corydori* (em cinza). Os círculos coloridos indicam os espécimes que apresentam morfologia ambígua (diferenciados pela coloração), apresentando simultaneamente ganchos que agrupam com aqueles das duas espécies estudadas. 34
- Figura 7:** Fotos utilizadas nas análises morfométricas dos espécimes que apresentam formas dos ganchos característicos de *G. anisopharynx* e *G. corydori*. Esses espécimes são aqueles indicados na Fig. 4. Assim, 1a e 1b correspondem ao espécimen identificado como GE232; 2a e 2b correspondem ao espécimen indicado como GE269; 3a e 3b correspondem ao espécimen indicado como GP1064; e 4a e 4b correspondem ao espécimen identificado como GE1139. 35
- Figura 8:** Filogenia enraizado da análise Bayesiana baseado nos haplótipos encontrados das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) das três espécies citadas. HA = haplótipos de *G. anisopharynx*, HC = haplótipos de *G. corydori* e HS = haplótipos de *G. superbus*. Haplótipos pretos indicam parasitos relacionados com *C. ehrhardti*, enquanto que haplótipos cinza representam parasitos relacionados com *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Apenas valores superiores a 0,79 são representados. Barras representam a probabilidade de 95% dos valores de densidade para cada evento de divergência. Nos balões estão indicados o tempo de diversificação de cada linhagem. Os gráficos indicam a distribuição dos haplótipos nos hospedeiros. 38

- Figura 9:** Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. anisopharynx*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos. 39
- Figura 10:** Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. corydori*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos. Linhas pontilhadas estão indicando haplótipos com alto número de mutações que os separam. 40
- Figura 11:** Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. superbus*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos. Linhas pontilhadas estão indicando haplótipos com alto número de mutações que os separam. 41
- Figura 12:** Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. anisopharynx*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros. 44
- Figura 13:** Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. anisopharynx*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Pode-se inferir que o hospedeiro ancestral desse grupo seria *C. paleatus*. 45
- Figura 14:** Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. corydori*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros. 46
- Figura 15:** Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. corydori*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Não foi possível inferir o hospedeiro ancestral desse grupo, sendo que as duas hipóteses apresentam suporte. 47
- Figura 16:** Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. superbus*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros. 48
- Figura 17:** Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. superbus*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior 49

estão representados nos ramos. Não foi possível inferir o hospedeiro ancestral desse grupo, sendo que as duas hipóteses apresentam suporte.

Figura 18: Reconstrução da história demográfica de *G. anisopharynx*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

52

Figura 19: Reconstrução da história demográfica de *G. corydori*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

53

Figura 20: Reconstrução da história demográfica de *G. superbus*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

54

Figura 21: Cenário hipotético do que ocorre/ocorreu na região do estudo incluindo informações de organismos encontrados na Argentina. Na região da Argentina não há simpatria dos hospedeiros, ocorrendo apenas *C. paleatus*. As informações de *C. nattereri* e *G. samirae* não são conhecidas e podem ser de fundamental importância para o entendimento do relacionamento do grupo. O tempo de divergência de cada linhagem baseado nas análises Bayesianas para o marcador mitocondrial *COII* estão representados nos balões.

63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Previsões referentes ao status do relacionamento entre hospedeiro e parasitos (Associação histórica) e a dinâmica de especialização de linhagens de parasitos aos seus hospedeiros conforme análises realizadas nesse estudo.	21
Tabela 2: Parâmetros gerados com o <i>plugin</i> Species Delimitation sobre um dendograma de NJ criado em Geneious. A Probabilidade de Distinção (P) indica a probabilidade de realizar uma identificação correta de um espécimen desconhecido da espécie foco usando sua posição na árvore e o critério de que ela deve se alocar dentro do clado mas não como grupo irmão. *Análise realizada após remover indivíduos híbridos indicados na Fig. 3.	31
Tabela 3: Distância de procrustes dos ganchos das duas espécies utilizadas. Valores de distância entre os grupos menores que 0,05 indicam proximidade entre os grupos indicados na Fig. 4.	35
Tabela 4: Número de Indivíduos sequenciados nas três espécies, Número de Haplótipos, Diversidade de Haplótipos (Hd), Diversidade nucleotídica (π) e Número médio de diferenças de nucleotídeos (k).	36
Tabela 5: Resultados para análises populacionais de <i>G. anisopharynx</i> ($P > 0,05$ indica que o resultado não é significativo).	42
Tabela 6: Resultados para análises populacionais de <i>G. corydori</i> ($P > 0,05$ indica que o resultado não é significativo).	43
Tabela 7: Resultados para análises populacionais de <i>G. superbus</i> ($P > 0,05$ indica que o resultado não é significativo).	45
Tabela 8: Resultados observados para <i>G. anisopharynx</i> .	56
Tabela 9: Resultados observados para <i>G. corydori</i> .	57
Tabela 9: Resultados observados para <i>G. superbus</i> .	58

Resumo

Os Gyrodactylidae vivíparos pertencem ao clado com maior número de espécies dentro da família (Boeger e Kritsky, 1997; Boeger et al. 2003; Bueno-Silva et al. 2011). De acordo com Boeger et al. (2003), uma característica com fundamental importância na diversificação dos girodactilídeos vivíparos é a capacidade de transmissão quando adultos. Essa inovação chave é responsabilizada pela alta proporção de especiações adaptativas no grupo, incluindo troca de hospedeiros e dispersão geográfica. O modelo de estudo utilizado nesse trabalho é composto por espécies de *Corydoras* do alto rio Iguaçu e seus parasitos *Gyrodactylus*. Cerca de 4 espécies de *Gyrodactylus* são compartilhadas por esses hospedeiros e a origem dos componentes da comunidade desses monogenóides deve envolver processos de dispersão e históricos. Bueno-Silva et al. (2011) sugerem, por exemplo, uma associação histórica de *Gyrodactylus corydori* com espécies de *C. ehrhardti* e uma colonização secundária dessa espécie em *C. paleatus*. Resultados obtidos nesse estudo sugerem que a utilização de pequenos fragmentos de mtDNA para identificação de espécies pode levar a erros quando existem organismos híbridos na população, questionando a eficiência do DNA *barcoding*. Ainda, sugerem que *G. anisopharynx* e *G. superbis* estão ancestralmente relacionados à *C. paleatus* com populações estruturadas nos dois hospedeiros, enquanto que *G. corydori* está associado historicamente à *C. ehrhardti* não apresentando populações estruturadas. A atual distribuição desse sistema de hospedeiros e parasitos indica que os parasitos apresentam características que os permitem utilizar de forma indiscriminada ou não, recursos (hospedeiros) semelhantes. Esperava-se que houvesse redução no tamanho efetivo das populações que pudessem indicar troca de hospedeiro, entretanto no presente trabalho não foi encontrado expansão populacional em nenhuma das três espécies analisadas, mas sim um declínio há aproximadamente 13 mil anos associado a eventos climáticos do Quaternário. Finalmente, com os resultados obtidos é possível propor um cenário onde a especiação simpátrica foi de fundamental importância para diversificação da linhagem hoje composta por *G. anisopharynx* e *G. corydori* quando esta linhagem ancestral encontrou disponibilidade de novo recurso após colonização de *C. paleatus* na bacia do Rio Iguaçu.

Palavras-chave: Monogenoidea, Gyrodactylidae, Coevolução, Associação Histórica.

Abstract

The viviparous Gyrodactylidae belong to the clade with the highest number of species in the family (Boeger and Kritsky, 1997; Boeger et al. 2003; Bueno-Silva et al. 2011). According Boeger et al. (2003), a feature with fundamental importance in diversification of viviparous Gyrodactylidae is the transmission capacity as adults. This key innovation is held responsible for the high proportion of adaptive speciation in the group, including exchange of hosts and geographic dispersion. The study model used in this work consists of species of *Corydoras* and their parasites from the upper Iguazu River. About 4 species of *Gyrodactylus* are shared by these hosts and the origin of the components from the Monogenoidea community must involve dispersion and historical process. Bueno-Silva et al. (2011) suggest, for example, a historical association between *G. corydori* and *C. ehrhardti* with a secondary colonization of the *C. paleatus*. Results of this study suggest that use of small mtDNA fragments for species identification can lead to errors when there are hybrid organisms in population, questioning the efficiency of DNA barcoding. Also suggests that *G. anispharynx* and *G. superbus* are ancestrally related to *C. paleatus* with structured populations in both hosts, while *G. corydori* has a historical association with *C. ehrhardti* and don't present structured populations. The current distribution of hosts and parasites system indicates that the parasites have characteristics that allow the use indiscriminate or not, of resources (hosts) similar. It was expected that there would be a reduction in the effective population size that could indicate host switch, however in this study was not found population growth in any of the three species analyzed, but a decline for about 13,000 years associated with Quaternary climatic events. Finally, the results obtained can propose a scenario where sympatric speciation was of fundamental importance to diversity the lineage today consist of *G. anispharynx* and *G. corydori* when this ancestral lineage found availability of new resource after *C. paleatus* colonization in the Iguazu river basin.

Key word: Monogenoidea, Gyrodactylidae, Coevolution, Historical Association.

1. Introdução

Os girodactilídeos vivíparos compõem o clado mais rico de Gyrodactylidae (Boeger e Kritsky, 1997; Boeger et al. 2003; Bueno-Silva et al. 2011) com mais de 400 espécies descritas, a maioria vivendo na superfície corporal e brânquias de peixes ósseos marinhos e de água doce (Bakke et al. 2002, 2007; Boeger et al. 2003; Bueno-Silva et al. 2011). Esses organismos apresentam ciclo de vida monoxênico, com transmissão no estágio de vida pré-adulto/adulto, não apresentando um estágio oncomiracídio, a larva ciliada, característica da maioria dos monogenóides (Boeger et al. 2003).

Brooks e McLennan (1993) sugerem que eventos de especiação adaptativa ocorrem de forma mais freqüente em girodactilídeos do que em outros grupos de parasitos. Boeger et al. (2003) realizaram testes e encontraram suporte para a hipótese de que esse clado apresenta radiação evolutiva utilizando critérios propostos por Brooks e McLennan (1993), atribuindo esse aumento da diversificação dos girodactilídeos vivíparos a uma combinação de caracteres simplesiomórficos e apomórficos que favorecem a especiação e/ou reduzem a taxa de mortalidade tais como: (1) hiperviviparidade; (2) partenogênese; (3) transmissão não limitada a um estágio larval, facilitando a troca de hospedeiro quando adulto; (4) protoginia; e (5) perda do ovo com gotícula adesiva. Além disso, Boeger et al. (2003) sugerem que a especiação associada a uma troca de hospedeiro deve ser mais prevalente nas linhagens deste clado. A habilidade de migrar em qualquer momento durante o ciclo de vida parece favorecer os girodactilídeos vivíparos durante a colonização de novas espécies de hospedeiros. No entanto, se a colonização se inicia em um hospedeiro resistente, ou que represente um recurso incompatível com o parasito, o verme tem a possibilidade de escapar dessa resposta, migrando para outro indivíduo (Boeger et al. 2005).

Esses autores (Boeger et al. 2005) portanto, utilizando um modelo composto por espécies de *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) e *Gyrodactylus anisopharynx* Popazoglo e Boeger, 2000 testaram a influência da possibilidade de transmissão contínua (item 3 acima) sobre parâmetros populacionais nesses helmintos. Indivíduos

de *G. anisopharynx* mantidos em um ambiente onde a troca de hospedeiros era possível, apresentaram valores significativamente maiores para diversos parâmetros (i.e. intensidade de infecção, tempo de infecção, taxas de crescimento) se comparados com os dos organismos em experimentos nos quais não houve a possibilidade de troca de hospedeiro.

Entretanto Boeger et al. (2005) reportaram que *G. anisopharynx* de *Corydoras ehrhardti* Steindachner, 1910 do Paraná, geralmente encontrados em simpatria com *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842), não apresentam diferença significativa em parâmetros populacionais entre populações agrupadas e isoladas de hospedeiros, sugerindo que há níveis distintos de adaptação dos parasitos em cada uma das duas espécies simpátricas de hospedeiros. De acordo com esses autores, a co-adaptação das espécies de parasitos observadas em *Corydoras* spp. deve ter ocorrido alopatricamente em cada hospedeiro e a simpatria observada das espécies de hospedeiros e das suas respectivas linhagens de parasitos deve ser resultado de contato secundário seguido por trocas de hospedeiros.

Especiação simpátrica é reconhecida atualmente como um processo importante e plausível no processo de diversificação das espécies, sendo um conceito histórico em que a divergência pode ocorrer sem isolamento geográfico, permitindo uma alta frequência de encontro das espécies no ambiente (McCoy, 2003). O fluxo gênico continua a existir entre as espécies até o momento que uma delas apresenta diferenças suficientes que impeçam a reprodução.

Dada a complexidade da interação parasito-hospedeiro, entender fatores que geram, mantêm e restringem a associação são de fundamental interesse, com implicação para uma ampla gama de questões ecológicas aplicadas, incluindo a dinâmica de doenças infecciosas emergentes (Brooks e Ferrao, 2005, Brooks e Hoberg, 2006 e 2007, Agosta et al. 2010), controle biológico, introduções e invasões biológicas, e as respostas bióticas para as alterações climáticas (Brooks e McLennan, 2002, Agosta et al. 2010).

Em modelos de associação parasito-hospedeiro a distribuição do parasito, devido a sua forma de vida, em geral, está diretamente relacionada à distribuição dos seus hospedeiros. Graças a essa forte associação, eventos de especiação dos

hospedeiros levam a eventos de especiação nos parasitos, resultando em filogenias espelhadas de acordo com a regra de Fahrenholz (Page, 1994, Page e Hafner, 1996, Poulin, 1998).

No entanto nessa relação parasito-hospedeiro há casos em que o parasito não é o membro passivo na associação (i.e. Gyrodactylidae), podendo utilizar novos recursos (i.e novas espécies e linhagens diferentes de hospedeiros) ativamente, realizando troca de hospedeiro. Diversos são os processos responsáveis por formar novas espécies. Co-especiação pode ser tratada como especiação vicariante alopátrica, enquanto que troca de hospedeiro pode ser considerado um evento de especiação peripátrica (Brooks e McLennan, 1993).

Uma característica chave da relação parasito-hospedeiro é de que os parasitos parecem ser especializados a um recurso específico, dando origem à ideia de que a especialização é um beco sem saída (também conhecido como *one-way street*). Nesse modelo de evolução, parasitos se tornam cada vez mais bem adaptados aos seus hospedeiros, em detrimento da capacidade de sobreviver em hospedeiros alternativos (Agosta et al. 2010). Entretanto, muitos grupos de parasitos exibem altas taxas de transição de especialistas a generalistas do que vice-versa associadas a eventos de trocas de hospedeiros.

A troca de hospedeiros compreende dois eventos distintos: (1) colonização de novos recursos, seguida por (2) perda do recurso ancestral. Assim, para que uma mudança de hospedeiro possa ser concluída, deve haver um mecanismo de generalização (aumento da amplitude do recurso) com consequente mecanismo de especialização (diminuindo a amplitude da dieta). Essa especialização ao novo recurso não deve criar um *beco sem saída evolutivo* (Agosta et al. 2010).

No entanto, para que essa troca de hospedeiros possa ocorrer, parasitos e hospedeiros devem apresentar características que possibilitem a associação. Essa capacidade que organismos possuem de utilizar recursos distintos, apesar dos associados terem evoluído em alopatria, é denominada de *ecological fitting*. Em 1985, Janzen cunhou o termo para descrever situações nas quais um organismo interage com seu ambiente abiótico e biótico de uma forma que parece indicar uma história evolutiva em comum, quando de fato os traços do organismo, relevantes para a interação,

evoluíram em resposta a um conjunto diferente de condições ambientais (Janzen, 1985). Ainda, de acordo com esse autor, o *ecological fitting* é apresentado como uma visão contrastante com o pressuposto de que as associações observadas no presente entre os organismos são a prova de história evolutiva compartilhada ou, mais genericamente, como uma resposta aos argumentos explicitamente adaptacionistas para explicar a presença de um fenótipo ou espécie num ambiente em particular (Agosta e Klemens, 2008). Para esses autores, plasticidade fenotípica, características correlacionadas e conservadorismo filogenético são a matéria prima para que o *ecological fitting* possa ocorrer. *Ecological fitting* pode ser um precursor para a diversidade evolutiva, sendo um processo pelo qual organismos que invadem um novo ambiente utilizam novos recursos ou formam novas associações (Agosta e Klemens, 2008).

Bueno-Silva et al. (2011), com intuito de entender o compartilhamento de espécies de parasitos por dois hospedeiros em simpatria, avaliaram como uma espécie de *Gyrodactylus* (i.e. *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva e Boeger, 2009) utiliza duas espécies simpátricas de hospedeiros. Esses autores reconheceram que *G. corydori* possui duas linhagens mitocondriais (i.e. COI) distintas, cada uma associada a um dos dois hospedeiros analisados, sugerindo ainda que *G. corydori* apresenta uma associação antiga com *C. ehrhardti*, sendo sua presença em *C. paleatus* o resultado de contato secundário devido à colonização recente de *C. paleatus* na Bacia do Alto Rio Iguaçu.

A integração dos estudos discutidos acima sugerem que as composições das infracomunidades de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* foram fortemente influenciadas por processos de co-adaptação, co-evolução e troca de hospedeiro associados à dinâmica da distribuição geográfica dos hospedeiros.

Assim, o objetivo desse trabalho é identificar a origem dos componentes das infracomunidades de *Gyrodactylus* spp. reconstruindo os eventos históricos que influenciaram a composição atual das faunas de *C. paleatus* e *C. ehrhardti*. Além disso, utilizando esse modelo simplificado de parasito-hospedeiro, são testados procedimentos genéticos que permitam identificar processos históricos de troca de hospedeiro e/ou dispersão entre comunidades.

Com o objetivo de resolver um aparente problema taxonômico, esse estudo realiza, ainda, um teste da identidade de *G. anisopharynx* e *G. corydori* utilizando métodos de código de barras genéticos e morfometria geométrica. Essas espécies são de difícil diferenciação morfológica e isso levantou a possibilidade de que não se tratassem de unidades taxonômicas e evolutivas válidas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Desenho experimental e teste de hipóteses

A distribuição atual dos parasitos em seus hospedeiros é resultado de eventos históricos pré e pós contato com novos hospedeiros e também resultado de eventos que modificam a dinâmica da associação, alternando entre ciclos generalistas e especialistas.

Com isso, baseando-se em trabalhos anteriores de Boeger et al. (2003), Bueno-Silva et al. (2011) e resultados obtidos no presente trabalho é possível identificar parâmetros esperados e compará-los com resultados encontrados (Tabela 1) na tentativa de identificar eventos de colonização de novos ambientes, definir quais eventos estão associados com esse compartilhamento e testar se esses cenários favoreceram, favorecem ou favorecerão a diversificação dos parasitos como sugerido por Boeger et al. (2003) e Araujo et al. (Em preparação)

De acordo com Boeger et al. (2003) três parâmetros são afetados quando há troca de hospedeiro: diversidade genética, distribuição geográfica e sinal demográfico. Naqueles parasitos que apresentam relação histórica com determinados hospedeiros espera-se que uma maior diversidade genética esteja presente, resultante do acúmulo de haplótipos com o passar do tempo. Logo, nos parasitos que em algum momento passado entraram em contato com outro hospedeiro e se estabeleceram espera-se uma menor diversidade genética (baixo número de haplótipos), determinada por eventos de colonização de novos ambientes em que poucos organismos conquistam o novo recurso.

Organismos parasitos tem sua distribuição geográfica restrita à distribuição de seus hospedeiros podendo, no caso dos girodactilídeos, realizar troca de hospedeiro em estágio adulto. Com isso, espera-se que a ocorrência de parasitos que tenham relação histórica com o hospedeiro seja ampla na área de ocorrência do hospedeiro. Caso sua ocorrência no hospedeiro seja resultante de troca de hospedeiro espera-se que sua distribuição seja restrita a áreas onde os hospedeiros ocorram em simpatria.

A troca de hospedeiro, ou a colonização de um novo recurso por poucos exemplares da população original faz com que ocorra uma baixa diversidade genética

na nova população, como citado anteriormente e faz com que ocorra um sinal demográfico de queda na população efetiva. Em organismos que apresentam relação histórica com o hospedeiro, espera-se que um sinal demográfico compatível com o padrão observado para o hospedeiro, enquanto que naqueles que realizaram troca de hospedeiro espera-se evidências de um “gargalo” passado, com possível subsequente recuperação da população.

Propõem-se ainda, que existam padrões nas filogenias dos parasitos quando otimizada com informações do hospedeiro. Espera-se que para aquelas linhagens que apresentam relação histórica com o hospedeiro o caráter seja plesiomórfico, com linhagens tão antigas quanto a diversificação do clado. Entretanto para eventos recentes de diversificação de linhagens associadas a uma troca de hospedeiro, espera-se que a aquisição do novo hospedeiro seja apomórfica na filogenia.

Além de parâmetros na associação histórica, podemos identificar parâmetros que alteram a dinâmica de especialização. De acordo com Bueno-Silva et al. (2011) em parasitos generalistas ou que utilizam o recurso eventualmente, o fluxo entre hospedeiros e o número de diferentes recursos utilizados é alto e não há sinal de estruturação da população, enquanto que naqueles que são especialistas ou estão em processo de especialização os recursos utilizáveis são restritos e a população apresenta sinais de estruturação.

Além disso, ainda é possível avaliar outros dois parâmetros que indicam qual o estado presente da associação: rede de haplótipos e otimização dos hospedeiros.

A ausência de grupos distintos associados a espécies hospedeiras na rede de haplótipos indica que os parasitos são generalistas, utilizando de forma indiscriminada os recursos oferecidos pelos hospedeiros. Quando são encontrados grupos associados a espécies de hospedeiros, supõe-se que os parasitos sejam especialistas, ou então que se encontrem em processo de especialização. Finalmente, quando não há evidência de haplogrupos associados a uma espécie de hospedeiro supõe-se que a utilização do recurso é eventual, indicando transmissão recente.

Por fim, as informações obtidas da filogenia dos parasitos contrastadas com informações dos hospedeiros também podem ser relevantes. Quando generalistas, o padrão na filogenia indica plesiomorfia do grupo, diferente do padrão esperado para

quando a utilização do recurso é eventual (autapomorfia), entretanto ambos apresentam distribuição nos hospedeiros ao acaso. Já quando o padrão encontrado na filogenia indica sinapomorfia do grupo, espera-se que ele seja especializado ao recurso ou em processo de especialização, e com distribuição ao longo dos hospedeiros significativamente distinta do acaso.

Tabela 1: Previsões referentes ao *status* do relacionamento entre hospedeiro e parasitos (Associação histórica) e a dinâmica de especialização de linhagens de parasitos aos seus hospedeiros conforme análises realizadas nesse estudo.

Associação Histórica				
Parâmetros	Relação Histórica pré contato entre hospedeiros	Troca de Hospedeiro - pós contato entre hospedeiros		Referência
Diversidade genética	Maior (acúmulo de haplotipos/tempo)	Menor (quando bem recente) mas pode recuperar		Boeger et al. (2003)
Distribuição geográfica	Ampla onde há ocorrência da espécie do hospedeiro a qual está associada	Restrita à áreas onde os hospedeiros da espécie ou das espécies irmãs ocorrem em simpatria		Boeger et al. (2003)
Sinal demográfico	Compatível com padrão observado para o hospedeiro	Evidência de “gargalo” passado com subsequente recuperação possível		Boeger et al. (2003)
Otimização do hospedeiro	Plesiomórfico	Apomórfico		presente trabalho
Dinâmica de especialização				
Parâmetros	Generalista	Em especialização/especialista	Uso eventual recurso	
Estruturação da População	Não estruturada	Estruturada	Não estruturada	Bueno Silva et al (2011)
Rede de haplótipos	Sem haplogrupos claramente associados a espécies hospedeiras	Haplogrupos associados à espécie do hospedeiro	Sem haplogrupos claramente associados a uma espécie hospedeira	presente trabalho
Optimização do hospedeiro	Plesiomórfica	Sinapomórfica	Autapomórfica	presente trabalho
Otimização dos hospedeiros	Ao acaso (vide item acima)	Significativamente distinta do acaso	Ao acaso (vide item acima)	presente trabalho

2.2 Coleta dos hospedeiros e identificação dos parasitos

Para realização desse trabalho foram amostrados indivíduos de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* coletados da Bacia do Rio Iguaçu e de rios da bacia costeira no Estado do Rio Grande do Sul. De acordo com Reis et al. (2003), *C. paleatus* está presente na bacia do baixo rio Iguaçu e em rios costeiros do Uruguai e do Brasil e *C. ehrhardti* está presente em rios costeiros no Paraná, Santa Catarina e na bacia do rio Iguaçu. *Corydoras paleatus* e *C. ehrhardti* compartilham quatro espécies de *Gyrodactylus*: *G. corydori*, *G. anisopharynx*, *G. superbus* (Szidat, 1973) e *G. samirae* Popazoglo e Boeger, 2000.

Indivíduos adultos de *C. paleatus* (n = 108) e *C. ehrhardti* (n = 55) foram amostrados entre Fevereiro de 2005 e Março de 2010 no rio Miringuava (25°38'06"S, 49°05'07"W) no município de São José dos Pinhais, no rio Piraquara (25°29'59"S, 49°02'40"W) no município de Piraquara e no rio Iguaçu (25°79'41,6"S, 50°19'99,7"W) no município da Lapa, todos no estado do Paraná. Espécimes de *C. paleatus* (n= 53) foram coletados no Arroio Senandes (32°09'00"S, 52°11'53"W), no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

Os hospedeiros foram capturados através de eletronarcolese, sacrificados em água quente (60°C) por alguns segundos para posterior fixação do material em etanol 95% e formalina 5%. A água quente promove relaxamento dos parasitos, fundamental para a confecção de lâminas permanentes e identificação morfológica. O material em formalina foi utilizado para procedimentos morfológicos, já o material fixado em etanol 95% foi utilizado para procedimentos moleculares.

2.3 Processamento morfológico dos parasitos

Os parasitos fixados em formalina 5% foram utilizados para preparação de lâminas permanentes utilizando corante de Tricrômico de Gomori e montados em lâminas com bálsamo do Canadá (Humason, 1979). Esse procedimento é utilizado para observação de estruturas moles. Outros espécimes de parasitos foram utilizados para confecção de lâminas em meio de Hoyer (Humason, 1979) para observação de estruturas esclerotizadas. O estudo morfológico foi realizado com auxílio de uma câmera digital (Olympus QColor 5) acoplada a um microscópio com contraste de fase e de DIC (Olympus BX 51).

2.3.1 *Gyrodactylus corydori* vs *G. anisopharynx*

Devido a resultados ambíguos encontrados ao decorrer do trabalho, a identidade das espécies *G. corydori* e *G. anisopharynx* foram testadas com procedimentos morfológicos e moleculares com o gene citocromo oxidase subunidade II do DNA mitocondrial, utilizado como *barcoding*.

2.4 Processamento molecular

2.4.1 Extração do DNA

Os parasitos fixados em etanol 95% foram separados para extração de seu DNA total utilizando o kit DNeasy (Qiagen) adaptado para os monogenóides. Para cada parasito extraído foi confeccionada uma lâmina testemunho na qual o háptor de cada espécime foi separado do corpo para posterior identificação (espécimes testemunhos). Uma lista de animais sequenciados está apresentada no Anexo 1, com informações de hospedeiros e sua localidade de coleta.

2.4.2 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA dos parasitos foi realizada com o marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) e do fragmento 18S rDNA nuclear. Para a amplificação do COII foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores COX2F2 (5' –TTTCACTGAGATAAGTCGTAAC- 3') combinado com COX2R (5' –AATAMWKATWGGCATRWAAGARTG- 3') ou COX2R2 (5' –TTACCGCTTCCYTGAACACG- 3') (Bueno-Silva e Boeger, 2014). Para o fragmento 18S do DNA ribossomal, foram utilizados os iniciadores 18S7 (5' –GCCCTATCAACTTACGATGGTA- 3') com 18SF (5' –CCAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC- 3') (Littlewood e Bray, 2001). A reação de PCR foi otimizada para: 10-30 ng de extrato de DNA, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de dNTP (25mM), 2,5µl de PCR-Buffer (10X), 0,3µl de cada iniciador (50pmoles/µl), 1 U de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen) e água bidestilada até completar o volume final de 25 µl. A PCR foi conduzida a partir das seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 45 s, anelamento a 45°C por 45 s para COII e 50°C por 45 s para 18S, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min.

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e observado em luz ultravioleta. Os produtos amplificados dos parasitos foram purificados com kit MiniElute (Qiagen).

Os produtos purificados da PCR foram submetidos à reação de sequenciamento, que foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 s, anelamento de 45°C para COII, 62°C para 18S e extensão a 72°C por 1min. A reação utilizada foi para: 10-20 ng de purificado de DNA dos parasitos, 1µl de Buffer (5X) (Applied Biosystems), 1µl de cada iniciador (1,6 pmoles/µl), 1 µl de BigDye v3.1 (Applied Biosystem) e água bidestilada até completar volume final de 10 µl.

As reações de sequenciamento foram submetidas a um sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com o programa Geneious 5.6.6 (<http://www.geneious.com/>) e comparadas com outras sequências de Gyrodactylidae contidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5 Análise filogenética

As análises filogenéticas das espécies de *Gyrodactylus* foram realizadas utilizando ambos os fragmentos (18S rDNA e COII). Apenas sequências de boa qualidade e com aproximadamente 1500 e 530 pares de bases, respectivamente, foram utilizadas.

As relações filogenéticas dos parasitos, com base nas sequências de COII foram inferidas utilizando análise de Neighbor-Joining, com o programa Geneious 5.6.6 com *bootstrap* de 1000 repetições. Para inferência bayesiana o modelo inicial de evolução para cada agrupamento analisado foi definido (HKY+G) através do programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Análise de inferência Bayesiana foi implementada com o programa BEAST 1.7 (Drummond et al., 2007). Probabilidades posteriores através de quatro corridas independentes com 30 milhões de gerações cada, amostradas a cada 1000 gerações, com burn-in de 3000 árvores e frequências de bases estimadas. Inferências sobre a datação da filogenia foram obtidas com o programa BEAST 1.6, utilizando a menor taxa evolutiva de evolução do DNA mitocondrial estipulada por Meinilä et al. (2004) (13,7 % por milhão de anos)

para as espécies de *Gyrodactylus* sob um modelo de relógio molecular fixo. Na análise filogenética com o rDNA 18S, duas espécies de parasitos de *Scleromystax* spp. foram utilizadas como grupo externo, enquanto nas análises com o gene COII uma espécie de parasitos de *Scleromystax barbatus* (Quoy et Gaimard) foi utilizada como grupo externo.

2.6 Morfometria Geométrica

A morfometria geométrica corresponde a uma área relativamente nova, cujo alcance e extensão começam a ser compreendidos e aplicados em diversos campos da ciência. Essa técnica é utilizada para a descrição e análises estatísticas da variação da forma entre os organismos, podendo trazer discussões sobre crescimento, tratamento experimental e questões evolutivas do grupo estudado (Rohlf e Marcus, 1993).

Nos girodactilídeos em geral, a estrutura utilizada para identificação das espécies é o gancho, no entanto essa estrutura pode apresentar diferenças sutis entre espécies filogeneticamente próximas dificultando a identificação correta, como ocorre em *G. anisopharynx* e *G. corydori*. Assim, para testar a diferença morfológica entre *G. anisopharynx* e *G. corydori*, foram utilizados ganchos dos espécimes na análise morfométricas.

Para isso as análises morfométricas foram realizadas através de fotos das estruturas de fixação dos espécimes, obtidas com uma câmera digital (Olympus QColor 5) acoplada a um microscópio com contraste de fase e diferencial (Olympus BX51). As imagens foram compactadas em um mesmo arquivo no programa tpsUtil (Rohlf, 2008). Com auxílio do programa tpsDIG (Rohlf, 2008) foram traçados 5 marcos anatômicos (*landmarks* - LM) e outros 80 pseudo-marcos anatômicos (*pseudolandmarks*) equidistantes entre os LM nos ganchos (Fig. 1), com três réplicas objetivando diminuir o erro nas marcações, estando os *pseudolandmarks* distribuídos da seguinte maneira:

- 20 entre os LM 1 e 2;
- 20 entre os LM 2 e 3;
- 15 entre os LM 3 e 4;
- 10 entre os LM 4 e 5;

- 15 entre os LM 5 e 1.

Esses *landmarks* e *pseudolandmarks* foram escolhidos por representarem pontos putativamente homólogos nos espécimes estudados e servirem de base para caracterizar a forma e a curvatura das estruturas.

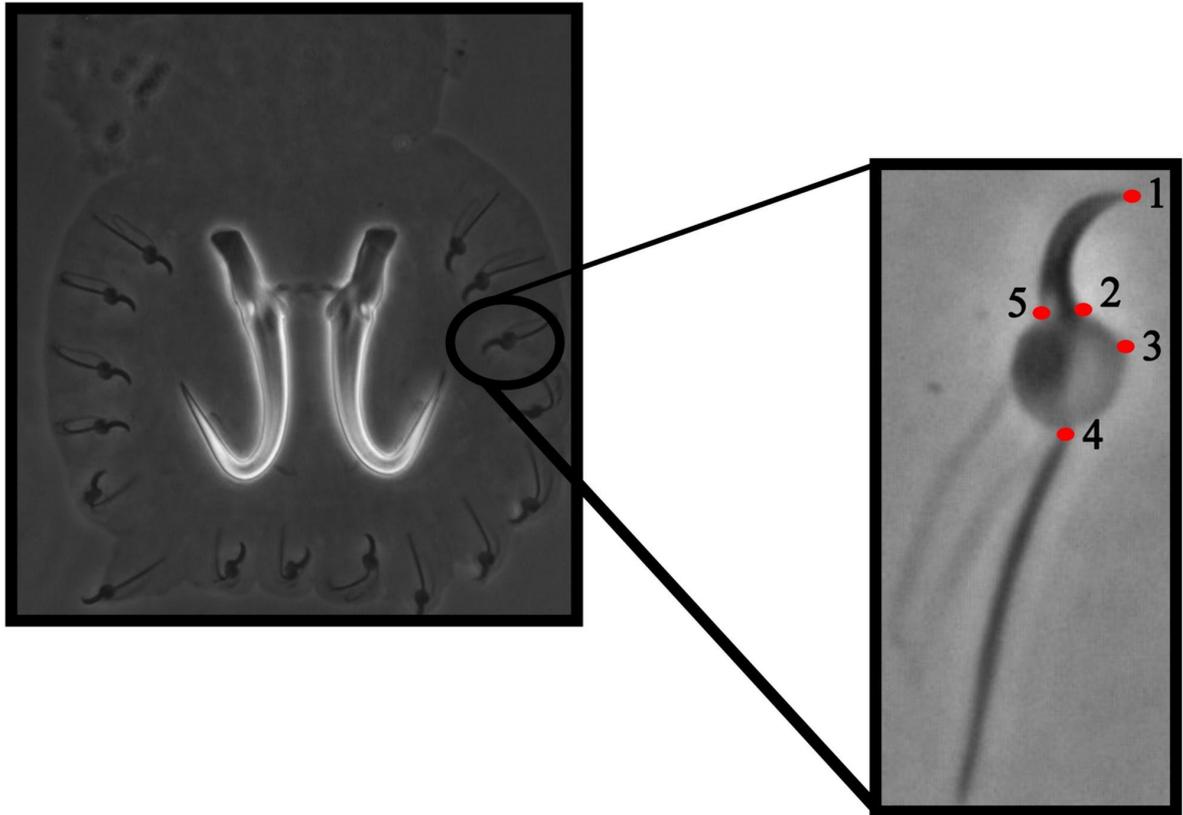


Figura 1: Disposição dos cinco *landmarks* utilizados na análise em um gancho de *G. corydori*. Para as duas espécies foram utilizados os mesmos *landmarks* (Fotos de M. Bueno-Silva).

Após traçados todos os *landmarks* e *pseudolandmarks*, o arquivo foi importado no programa PAST (Hammer et al., 2001) para formatação. Com auxílio do programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) os dados foram submetidos à superimposição de Procrustes (Dryden e Mardia, 1998) para escalonar e reposicionar as coordenadas dos *landmarks*, e categorizados em dois grupos de acordo com os hospedeiros em que são encontrados. Posteriormente foi realizada análise de componentes principais (PCA) e Análise de Variável Canônica para testar se haviam agrupamentos de acordo com a forma.

2.7 Genética populacional

As sequências do marcador mitocondrial COII foram analisadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) para a obtenção da matriz de distâncias das diferenças entre os haplótipos, AMOVA, Fst e diversidade haplotípica com 1000 réplicas em cada teste. Com auxílio do *plugin* Species Delimitation (Masters, et al. 2011), no programa Geneious, foram obtidas medidas de suporte filogenético e diagnóstico de espécies, identificando seu caráter monofilético e calculando suas distâncias inter e intraespecíficas.

Para avaliar as relações entre haplótipos de hospedeiros e parasitos, foram construídas redes de haplótipos com o programa TCS 1.2.1 (Clement, et al. 2000). Além disso, parâmetros populacionais como Tajima D (Tajima, 1989) e Fu (Fu, 1997) foram obtidos com auxílio do programa DNAsp (Librado e Rozas, 2009).

2.8 Reconstrução do hospedeiro ancestral

A reconstrução do hospedeiro ancestral foi realizada com auxílio do programa Mesquite 3.02 (Maddison e Maddison, 2015) usando o critério de parcimônia. Para isso as distribuições atualmente encontradas dos parasitos nos seus respectivos hospedeiros foram plotadas na filogenia Bayesiana dos grupos, tendo sua significância calculada a partir do número de passos de 1000 caracteres aleatorizados sobre a filogenia do grupo. Com isso pode-se calcular o número de passos que seriam encontrados caso a distribuição fosse ao acaso e comparar com valores reais (o valor de significância definido foi de 95%).

2.9 Demografia populacional

Inferências sobre a história demográfica dos parasitos e seus hospedeiros foram avaliadas utilizando *skyline plots* Bayesianos produzidos com o programa BEAST 1.6 e Tracer 1.5 (Drummond e Rambaut, 2007) com os parâmetros descritos anteriormente (probabilidades posteriores através de uma corrida independente com 30 milhões de gerações cada, amostradas a cada 1000 gerações). Árvores foram simuladas com um modelo de população HKY+G.

3. Resultados

3.1 Amostragens

Das quatro espécies parasitas de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* da bacia do rio Iguaçu, apenas três foram utilizadas para realização das análises populacionais no presente estudo, pois poucos exemplares de *G. samirae* foram encontrados. Os espécimes amostrados no Rio Grande do Sul foram utilizados apenas para confirmar sua identidade e caracterizar sua área de ocorrência, devido ao baixo número amostrado não foi possível realizar análises demográficas nesses espécimes.

Houve também esforço amostral para obter espécimes de *Corydoras nattereri* Steindachner, 1876, espécie irmã de *C. ehrhardti* (Maia, 2014) sendo citada sua ocorrência para rios costeiros da região sul e sudeste do Brasil, e que poderia adicionar informações sobre a história e compartilhamento fauna de parasitos dessas duas espécies de hospedeiros, entretanto essa espécie não foi encontrada em rios do litoral do Paraná (Rio Sagrado 25°33'17,4"S 48°48'02,4"W, Rio do Meio 25°33'32,9"S 48°48'55,2"W, Rio Marumbi 25°30'25,4"S 48°52'26,3"W, Rio do Pinto 25°32'48,7"S 48°51'53,0"W, Rio Passa Sete 25°32'35,7"S 48°50'04,9"W, Rio do Nunes 25°20'19"S 48°47'5"W, Rio Cacatu 25°19'25"S 48°45'7"W, Rio Tagaçaba 25°11'38"S 48°31'17"W, Rio Capivari 25°11'3"S 48°31'23"W, Rio Bananal 25°10'41"S 48°22'51"W, Rio Pederneiras 25°08'34"S 48°23'38"W, Rio Morato 25°12'48"S 48°17'52"W, Rio Brejatuba 25°38'29"S 48°37'14"W, Rio Saci 25°14'14"S 48°45'10"W e Rio Mergulhão 25°17'38"S 48°44'24"W) e em rios pertencentes a região da Baía da Babitonga (Rio Cupim 26°05'53"S 48°51'43"W e Rio Palmital 26°05'29"S 48°51'18"W).

3.2 Distribuição geográfica dos sistemas hospedeiros parasitos

Gyrodactylus anisopharynx, *G. corydori* e *G. superbus* parasitam e foram coletadas em *C. paleatus* e *C. ehrhardti* na bacia do Alto Iguaçu. *Gyrodactylus superbus* é ainda encontrado em uma bacia hidrográfica Atlântica do Rio Grande do Sul e na região de Buenos Aires (Szidat, 1973) onde é relatada apenas a ocorrência de *C. paleatus* (Fig. 2). Adicionalmente, amostras obtidas de *C. paleatus*, invasoras

de micro bacias da Patagônia Argentina, foram identificadas como *G. superbis* e *G. anisopharynx* (Viozzi, comunicação pessoal).



Figura 2: Distribuição dos hospedeiros na região de acordo com Reis et al. (2003). Em cinza, a distribuição de *C. paleatus* e em preto *C. ehrhardti*. Nos pontos vermelhos estão indicados os locais de coletas, especificados no Anexo 1. (Mapa adaptado de: <http://www.mapcruzin.com/free-world-maps/free-south-america-map.htm>).

3.3 Relações Filogenéticas entre as espécies de *Gyrodactylus*

Para esclarecer a relação filogenética entre as espécies de *Gyrodactylus* oito indivíduos (dois *G. anisopharynx*, dois *G. corydori*, dois *G. superbis* e dois *Gyrodactylus* spp.) foram sequenciados para obtenção de aproximadamente 1500 pb do fragmento ribossomal 18S. A hipótese sobre o relacionamento filogenético das espécies parasitas (Fig. 3) baseado no rDNA 18S suporta que *G. anisopharynx* é

grupo irmão de *G. corydori* enquanto *G. superbus* é uma espécie irmã do ancestral comum dessas.

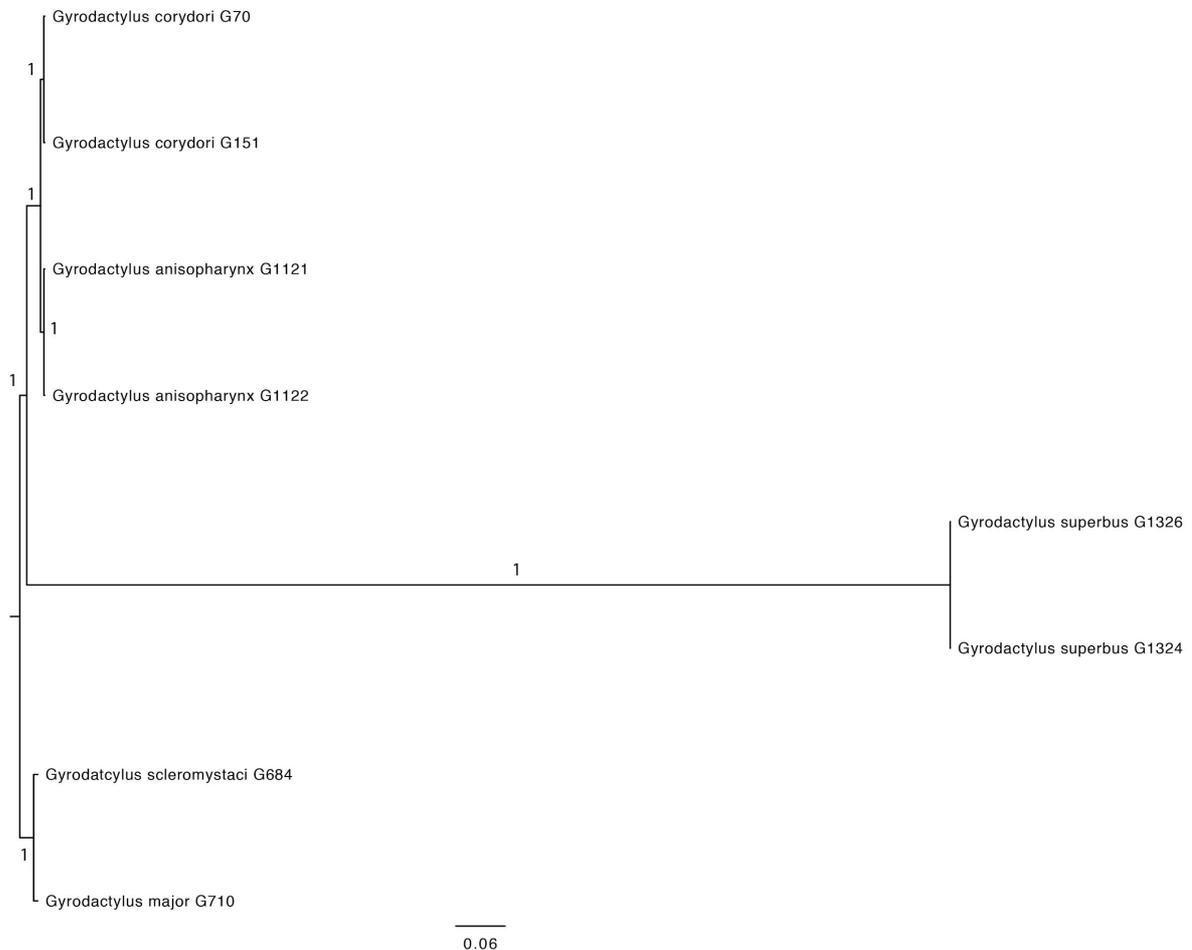


Figura 3: Filogenia bayesiana baseada no fragmento ribossomal 18S. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos.

3.4 *Gyrodactylus corydori* vs *G. anisopharynx*

Para realização das análises filogenéticas subsequentes 79 indivíduos (18 *G. anisopharynx*, 32 *G. corydori*, 28 *G. superbus*) foram sequenciados para obtenção de aproximadamente 530 pb do gene mitocondrial COII.

3.4.1 Código de barras genético

Os resultados das análises de *Neighbor-joining* (NJ) e Bayesiana do marcador mitocondrial COII são apresentadas nas Figs. 4 e 5, respectivamente. As duas análises mostraram resultados compatíveis com três grupos, identificados na Fig. 3. Indivíduos de *G. superbus* (Fig. 5, clado 1) e *G. corydori* (Fig. 5, clado 3)

agruparam com valor de probabilidade posterior igual à 100%; indivíduos de *G. anisopharynx* (Fig. 5, clado 2) agruparam-se com valores de probabilidade posterior igual a 98%. Todos apresentando diferenciação genética elevada (Anexo 2). Há ainda a ocorrência de quatro espécimes identificados morfologicamente como *G. corydori* e agrupamos através de dados moleculares com *G. anisopharynx*, indicando que possivelmente ocorram eventos de hibridização nas populações dessas duas espécies.

O cladograma de NJ produzido no software Geneious foi analisado com o *plugin* Species Delimitation cujo resultado é apresentado na Tabela 2. Valores baixos de probabilidade de distinção em *G. corydori* indicam a possibilidade de a espécie ser críptica, enquanto valores iguais a um, como em *G. anisopharynx* e *G. superbus*, representam grupos que se ramificam em eventos que seriam esperados sob o modelo de coalescência em uma população. Os resultados obtidos suportam a monofilia e validade evolutiva de *G. corydori*, *G. anisopharynx* e *G. superbus*.

Apesar de serem consideradas espécies distintas, no agrupamento de *G. anisopharynx* (Fig. 5, clado 2) encontram-se quatro espécimes identificados morfologicamente como *G. corydori*. As posições contraditórias desses espécimes podem ser associadas a dificuldades na identificação morfológica ou representar híbridos, algo que será testado a seguir.

Tabela 2: Parâmetros gerados com o *plugin* Species Delimitation sobre um dendograma de NJ criado em Geneious. A Probabilidade de Distinção (P) indica a probabilidade de realizar uma identificação correta de um espécimen desconhecido da espécie foco usando sua posição na árvore e o critério de que ela deve se alocar dentro do clado mas não como grupo irmão. *Análise realizada após remover indivíduos híbridos indicados.

Espécie	Espécie com maior proximidade	Distância média intraespecífica	Distância média interespecífica	Relação Intra/Inter específica	Probabilidade de distinção (P)
<i>G. corydori</i>	<i>G. anisopharynx</i>	0,024	0,067	0,35	0,05
<i>G. anisopharynx</i>	<i>G. corydori</i>	0,003	0,067	0,04	0,16
<i>G. superbus</i>	<i>G. corydori</i>	0,037	0,131	0,29	0,77
<i>G. superbus</i> *	<i>G. corydori</i>	0,037	0,131	0,29	0,77
<i>G. corydori</i> *	<i>G. anisopharynx</i>	0,024	0,067	0,35	0,16
<i>G. anisopharynx</i> *	<i>G. corydori</i>	0,003	0,067	0,04	1

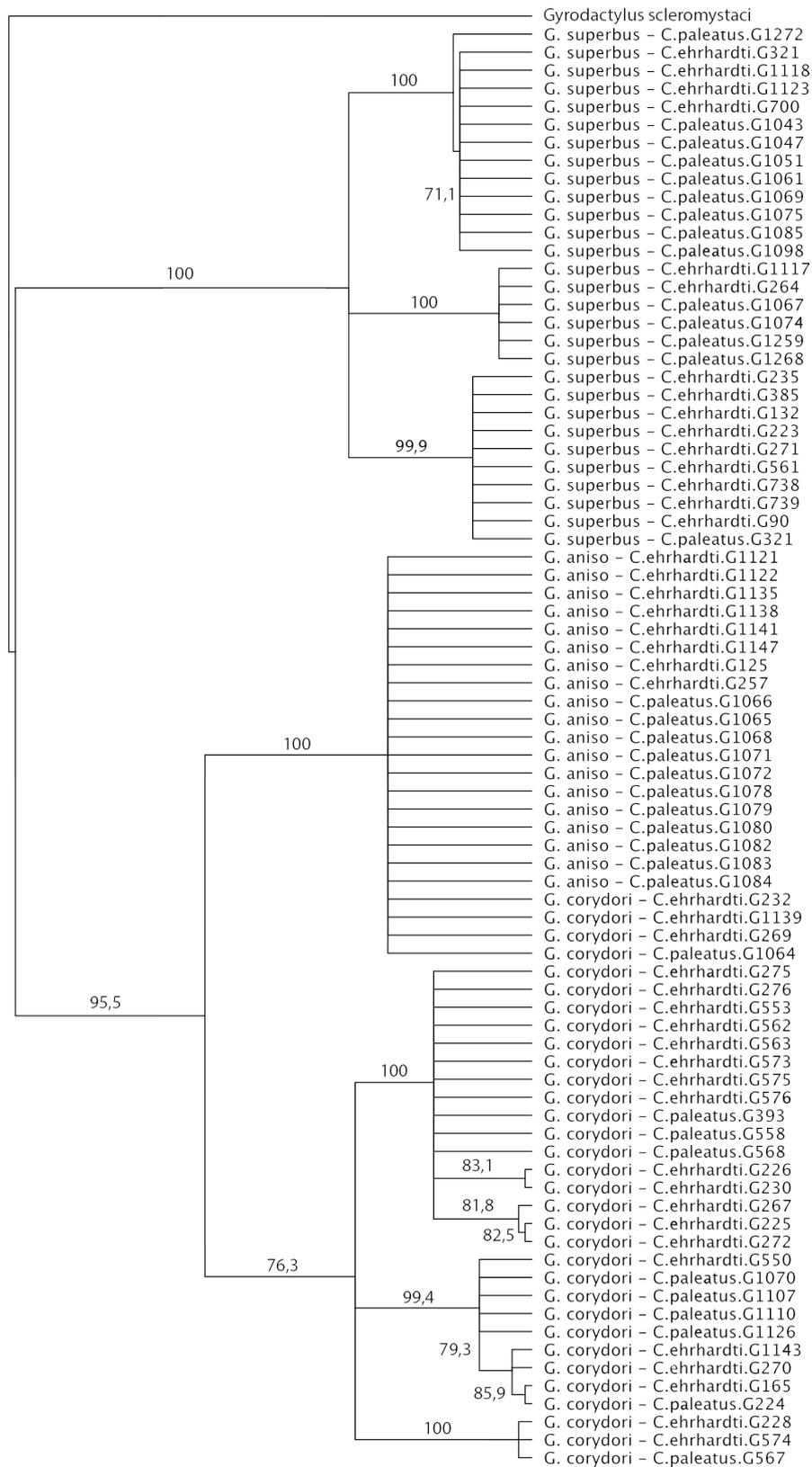


Figura 4: Filograma enraizado de Neighbor-Joining (NJ) baseado no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II. O suporte de ramo foi obtido através de 1000 repetições de bootstrap.

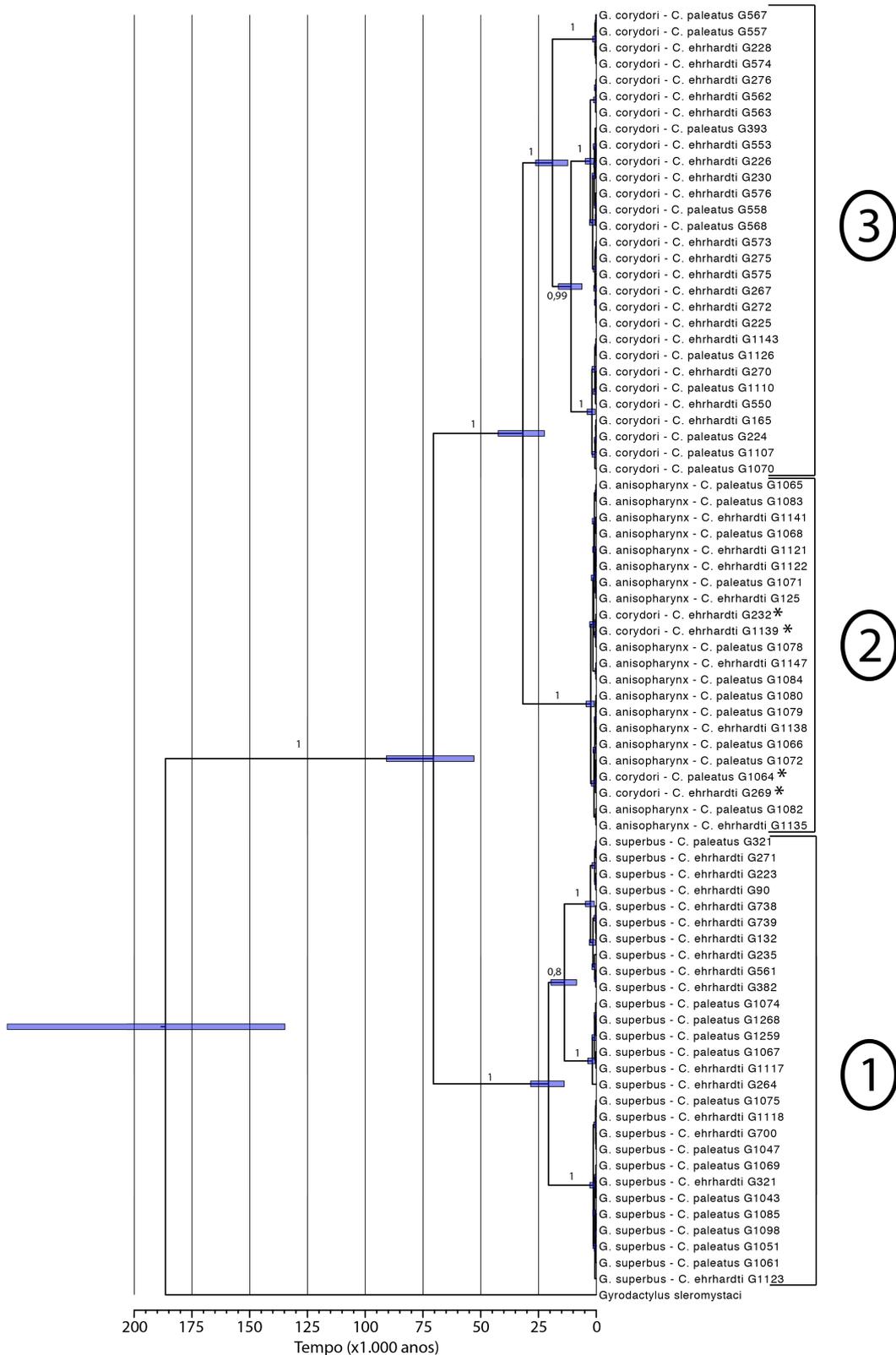


Figura 5: Cladograma enraizado das análises Bayesianas baseado no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) das três espécies citadas. Valores de probabilidade superiores a 0,80 são representados nos ramos. Barras representam a probabilidade de 95% dos valores de densidade para cada evento de divergência. Espécies com posições contraditórias estão representados com asterisco.

3.4.2 Morfometria geométrica

A análise de variáveis canônicas geradas pela morfometria geométrica agrupou os espécimes em dois grupos distintos (Fig. 6), diretamente associados às duas espécies de parasitos. A distância de Procrustes ao longo dos grupos (Tabela 3) suporta a hipótese de que os respectivos agrupamentos apresentam proximidade intraespecífica.

Os espécimes considerados de identificação questionável na Fig. 5 (clado 2, com asteriscos) apresentam, simultaneamente, ganchos com morfologia característica tanto de *G. corydori* como de *G. anisopharynx* (Fig. 7).

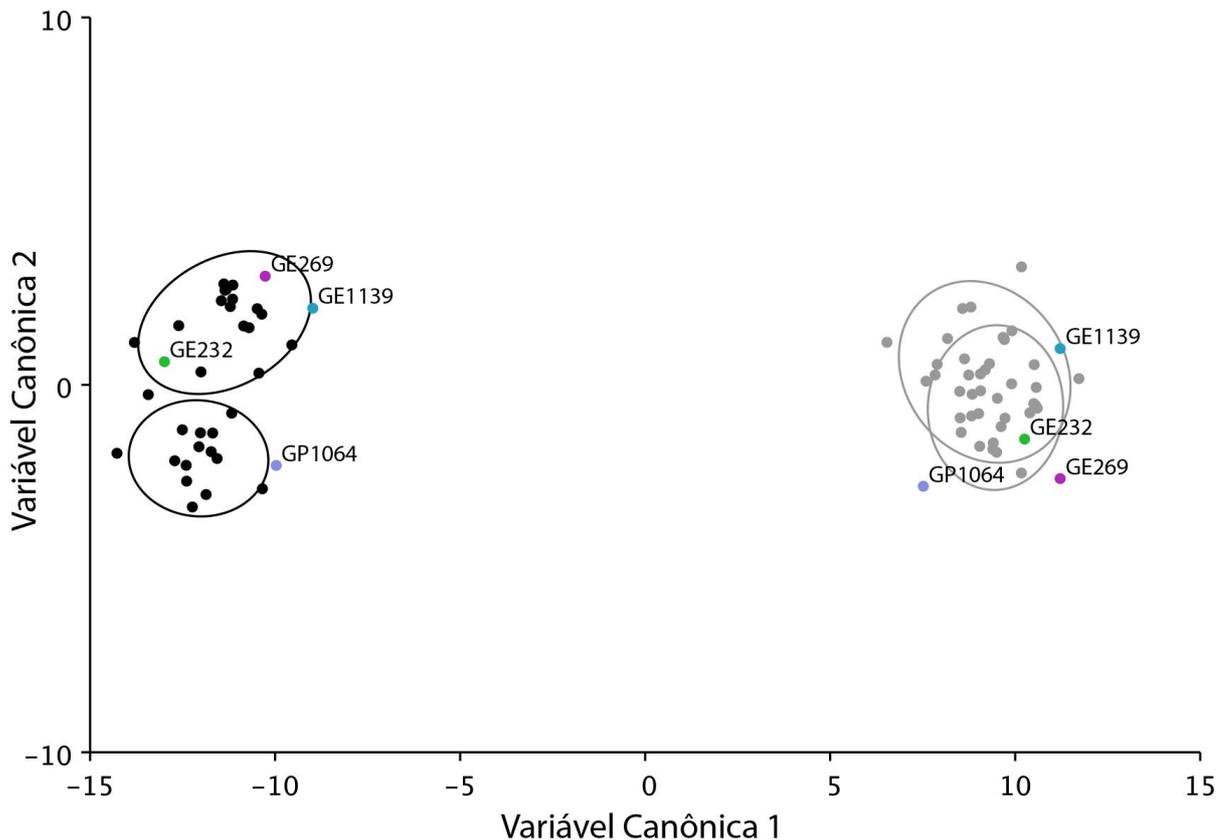


Figura 6: Análise de Variável Canônica dos espécimes de *G. anisopharynx* (em preto) e *G. corydori* (em cinza). Os círculos coloridos indicam os espécimes que apresentam morfologia ambígua (diferenciados pela coloração), apresentando simultaneamente ganchos que agrupam com aqueles das duas espécies estudadas.

Tabela 3: Distância de procrustes dos ganchos das duas espécies utilizadas. Valores de distância entre os grupos menores que 0,05 indicam proximidade entre os grupos indicados na Fig. 4.

	<i>G. corydori</i> <i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i> <i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i> <i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i> <i>C. ehrhardti</i>
<i>G. corydori</i>				
<i>C. paleatus</i>				
<i>G. corydori</i>	0,0368			
<i>C. ehrhardti</i>	p-valor = 0,7627			
<i>G. anisopharynx</i>	0,1476	0,1688		
<i>C. paleatus</i>	p-valor = 0,0037	p-valor = 0,0048		
<i>G. anisopharynx</i>	0,1387	0,1574	0,0383	
<i>C. ehrhardti</i>	p-valor = 0,0145	p-valor = 0,0160	p-valor = 0,8587	

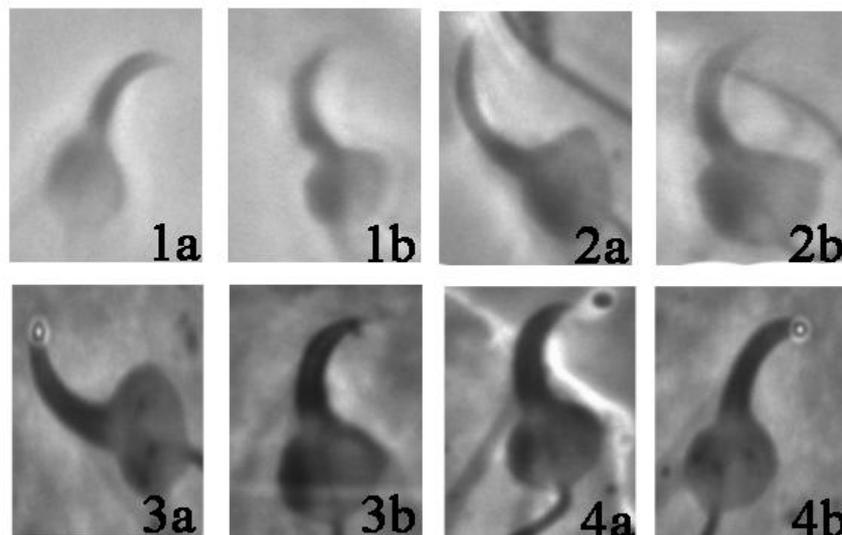


Figura 7: Fotos utilizadas nas análises morfométricas dos espécimes que apresentam formas dos ganchos característicos de *G. anisopharynx* e *G. corydori*. Esses espécimes são aqueles indicados na Fig. 4. Assim, 1a e 1b correspondem ao espécimen identificado como GE232; 2a e 2b correspondem ao espécimen indicado como GE269; 3a e 3b correspondem ao espécimen indicado como GP1064; e 4a e 4b correspondem ao espécimen identificado como GE1139.

3.5 Genética populacional e filogeografia

3.5.1 Diversidade Genotípica e Haplótipica

Valores de diversidade genética e haplotípica foram obtidos através de sequências do marcador mitocondrial COII com auxílio dos programas Arlequin e TCS, e estão indicados na Tabela 4. *Gyrodactylus anisopharynx* foi a espécie que apresentou maior número de haplótipos (15) em apenas 18 espécimes sequenciados, ao tempo que *G. corydori* com 32 espécimes sequenciados apresentou apenas 11 haplótipos. *Gyrodactylus superbus* foi o que apresentou menor número de haplótipos sequenciados (9) em 28 espécimes sequenciados.

Tabela 4: Número de Indivíduos sequenciados nas três espécies, Número de Haplótipos, Diversidade de Haplótipos (Hd), Diversidade nucleotídica (π) e Número médio de diferenças de nucleotídeos (k).

Espécies	Hospedeiro	Parâmetros Genéticos				
		Número de Indivíduos Sequenciados	Número de Haplótipos (haplótipos exclusivos)	Diversidade de Haplótipos (Hd)	Diversidade Nucleotídica (π)	Número Médio de Diferenças de Nucleotídeos (k)
<i>G. anisopharynx</i>	Ambos	18	15	0,945 +/- 0,00027	0,00554	2,925
	<i>C. ehrhardti</i>	7	5 (4)	0,835 +/- 0,00323	0,00366	1,934
	<i>C. paleatus</i>	11	11 (10)	0,942 +/- 0,00047	0,00442	2,333
<i>G. corydori</i>	Ambos	32	11	0,904 +/- 0,00023	0,0231	12,174
	<i>C. ehrhardti</i>	18	11 (6)	0,927 +/- 0,00031	0,02094	11,035
	<i>C. paleatus</i>	14	4 (0)	0,779 +/- 0,00374	0,02452	12,947
<i>G. superbus</i>	Ambos	28	9	0,932 +/- 0,00039	0,11549	60,634
	<i>C. ehrhardti</i>	15	7 (5)	0,938 +/- 0,00033	0,02989	15,724
	<i>C. paleatus</i>	13	4 (2)	0,763 +/- 0,00552	0,03078	16,222

3.5.2 Haplótipos

O programa TCS detectou 35 haplótipos nos espécimes estudados com o marcador mitocondrial COII, sendo 15 haplótipos de *G. anisopharynx*, 11 haplótipos de *G. corydori* e apenas 9 haplótipos de *G. superbus* (Anexo 1). Os relacionamentos filogenéticos desses haplótipos foram reconstruídos através de inferência Bayesiana (Fig. 8).

Em *G. anisopharynx* foram identificados quatro haplótipos que ocorrem apenas em *C. ehrhardti*, 10 haplótipos exclusivos de *C. paleatus* e um haplótipo (HA04) com indivíduos que ocorrem nos dois hospedeiros (dois espécimes de parasitos encontrados em *C. ehrhardti* e um espécimen encontrado em *C. paleatus*).

A relação entre os haplótipos de *G. anisopharynx* está representada na Fig. 8 (cladograma) e Fig. 9 (rede de haplótipos).

Para *G. corydori* foram encontrados seis haplótipos exclusivos de *C. ehrhardti* e cinco haplótipos que são encontrados em ambos os hospedeiros. O relacionamento filogenético desses haplótipos está na Fig. 8 (cladograma). A rede de haplótipos de *G. corydori* está representada na Fig. 10.

Finalmente, em *G. superbus* foram encontrados cinco haplótipos exclusivos de *C. ehrhardti* e dois haplótipos exclusivos de *C. paleatus*. A relação entre os haplótipos de *G. superbus* está representada na Fig. 8 (cladograma) e a rede de haplotipos é apresentada na Fig. 11.

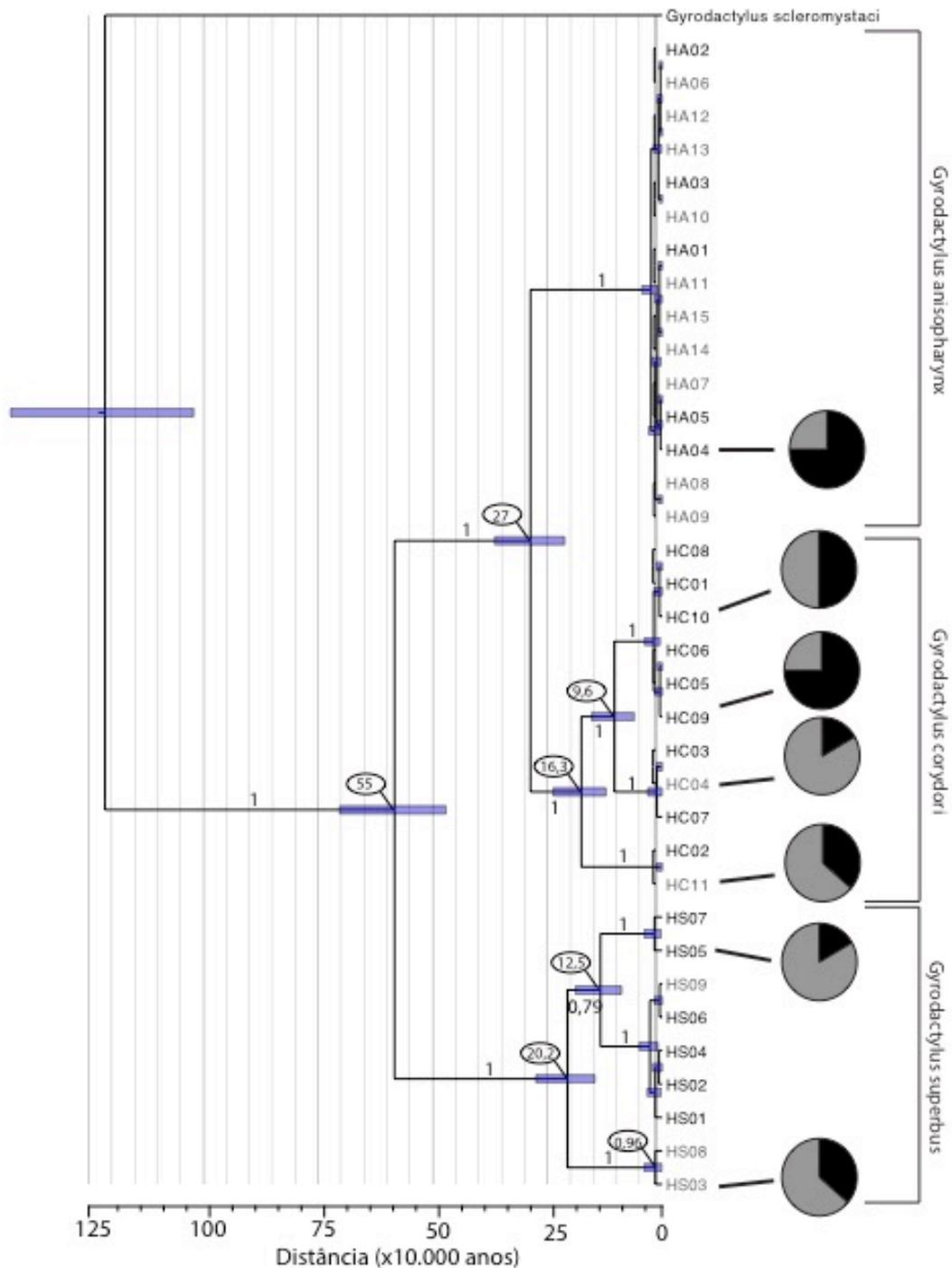


Figura 8: Filogenia enraizado da análise Bayesiana baseada nos haplótipos encontrados das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) das três espécies citadas. HA = haplótipos de *G. anisopharynx*, HC = haplótipos de *G. corydori* e HS = haplótipos de *G. superbus*. Haplótipos pretos indicam parasitos relacionados com *C. ehrhardti*, enquanto que haplótipos cinza representam parasitos relacionados com *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Apenas valores superiores a 0,79 são representados. Barras representam a probabilidade de 95% dos valores de densidade para cada evento de divergência. Nos balões estão indicados o tempo de diversificação de cada linhagem. Os gráficos indicam a distribuição dos haplótipos nos hospedeiros.

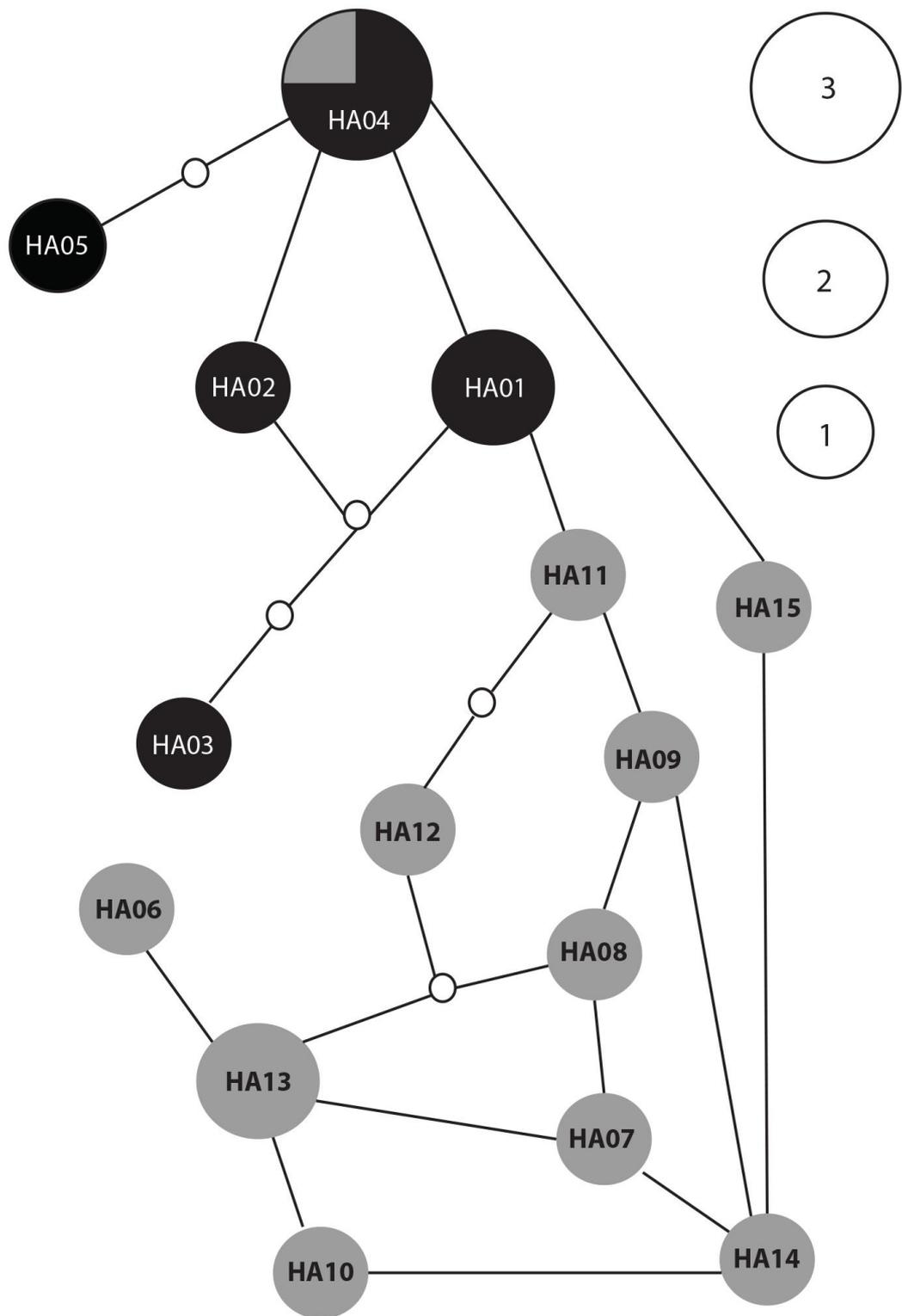


Figura 9: Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. anisopharynx*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos.

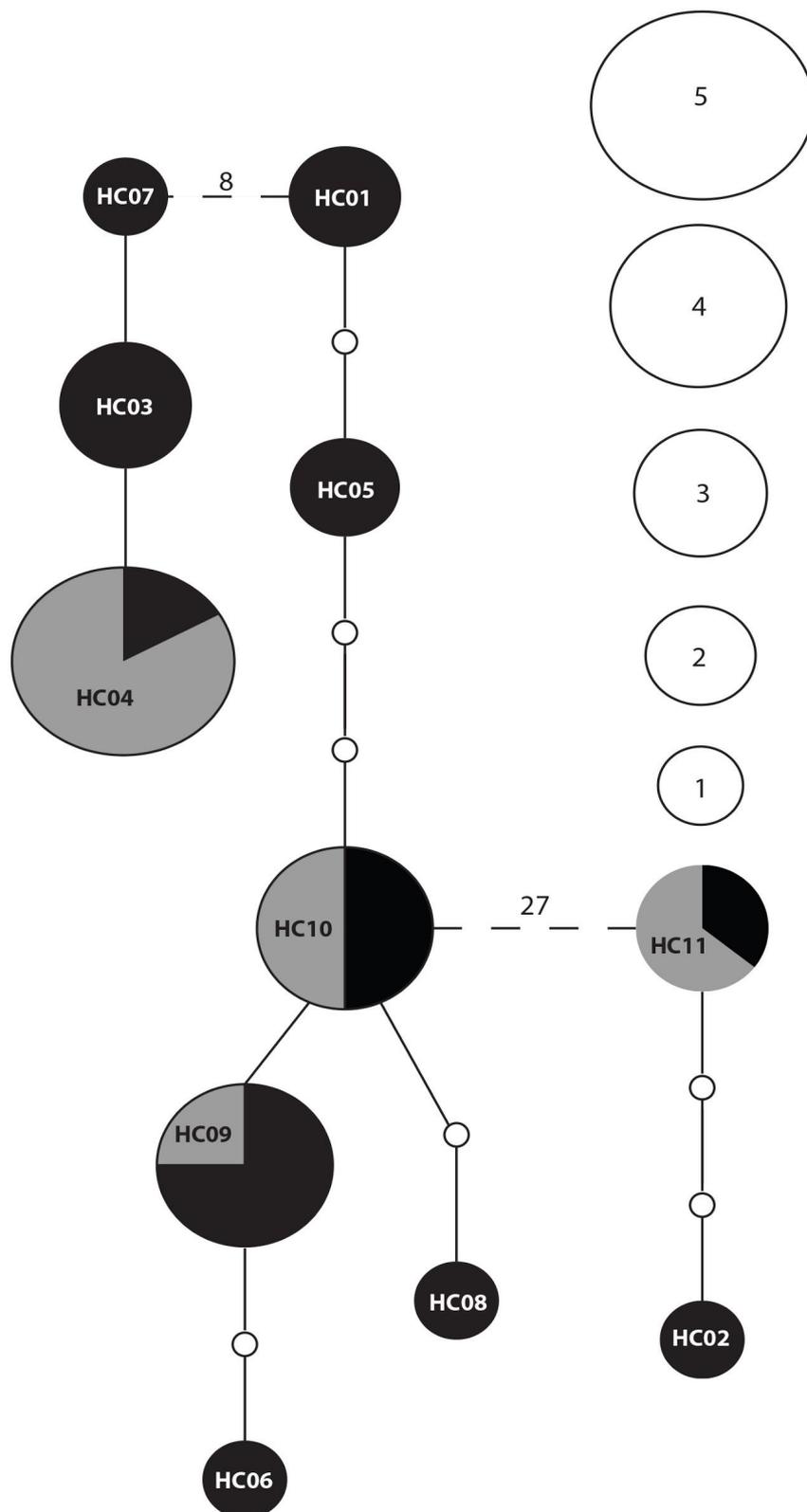


Figura 10: Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. corydori*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos. Linhas pontilhadas estão indicando haplótipos com alto número de mutações que os separam.

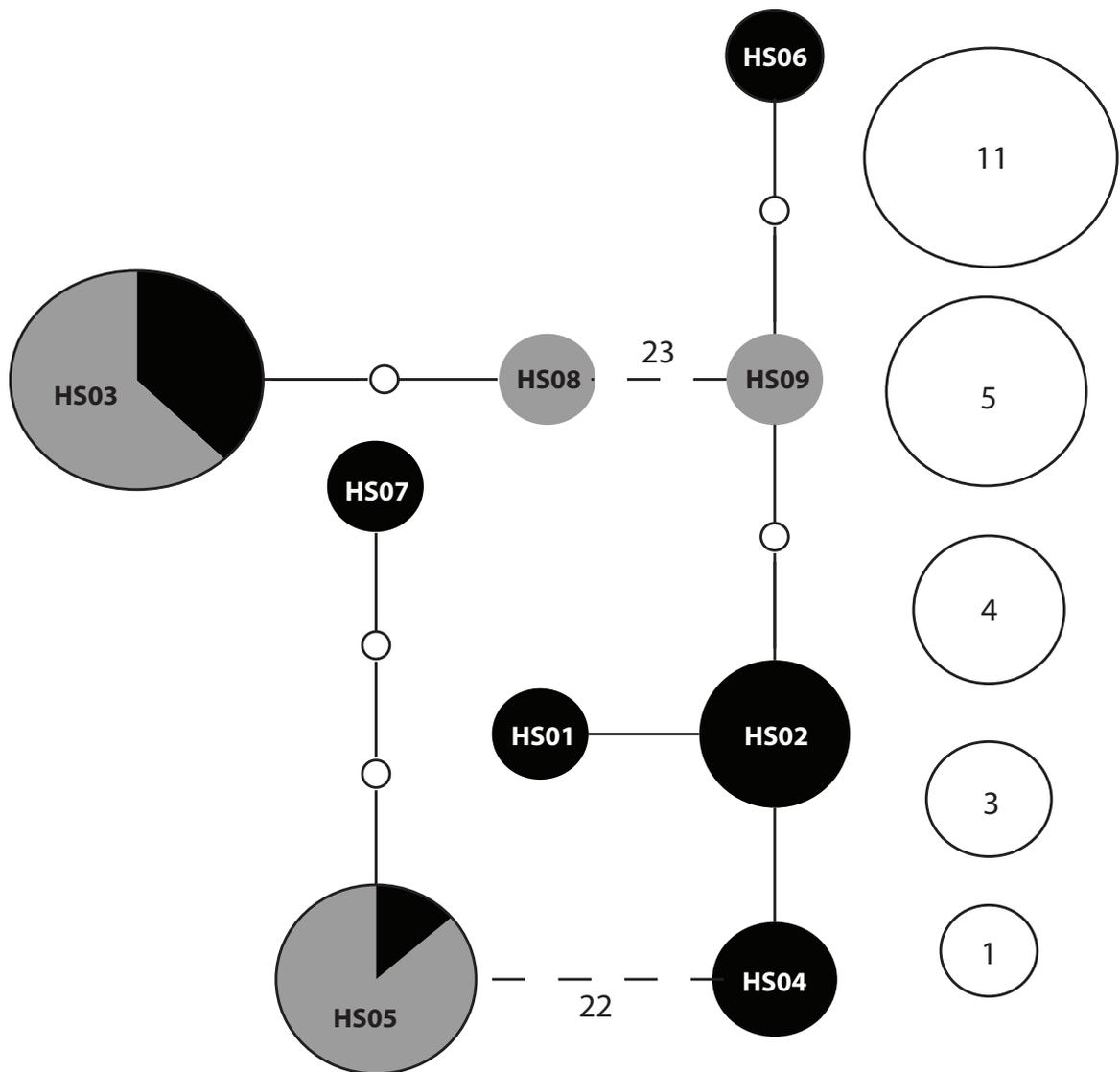


Figura 11: Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COII em *G. superbus*. As cores representam os hospedeiros, sendo em preto *C. ehrhardti* e em cinza *C. paleatus*. Os círculos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos (número de espécimes) é representada pelo tamanho dos círculos. Linhas pontilhadas estão indicando haplótipos com alto número de mutações que os separam.

3.6 Genética populacional

3.6.1 *Gyrodactylus anisopharynx*

Estatisticamente houve estruturação entre as duas populações de *G. anisopharynx* que ocorrem em *C. paleatus* e *C. ehrhardti*. A análise da estatística F (Fst) indicou forte estruturação das duas populações (Fst = 0,37662, p = 0,00098 +/- 0,00098). Os resultados da AMOVA mostraram que existe mais variação dentro da população do que entre elas: 62,34% e 37,66% respectivamente.

Além disso, valores de Tajima e Fu indicam que a população de *G. anisopharynx* associadas a *C. paleatus* apresenta expansão demográfica (Tabela 5). Apesar do resultado de Fu da população de *G. anisopharynx* em *C. ehrhardti* ter indicado expansão demográfica, seu resultado não foi significativo.

Tabela 5: Resultados para análises populacionais de *G. anisopharynx* (P > 0,05 indica que o resultado não é significativo).

	Hospedeiro	Tajima's D	Fu's Fs
<i>G. anisopharynx</i>	<i>C. ehrhardti</i>	0,79672 P > 0,10	-0,00832 P > 0,05
	<i>C. paleatus</i>	1,368 P > 0,10	-4,316 P < 0,05

3.6.2 *Gyrodactylus corydori*

Estatisticamente não foi detectada estruturação entre as duas populações de *G. corydori* que ocorrem em *C. paleatus* e *C. ehrhardti*. A análise da estatística F (Fst) indicou ausência de estruturação (Fst = 0,02824, p = 0,32551 +/- 0,01738). Os resultados da AMOVA mostraram que existe mais variação dentro da população do que entre elas: 97,18% e 2,82% respectivamente.

Além disso, valores de Tajima e Fu indicam que não há expansão demográfica nas populações de *G. corydori* nos dois hospedeiros (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados para análises populacionais de *G. corydori* ($P > 0,05$ indica que o resultado não é significativo).

	Hospedeiro	Tajima's D	Fu's Fs
<i>G. corydori</i>	<i>C. ehrhardti</i>	0,51455 $P > 0,10$	3,34 $P > 0,05$
	<i>C. paleatus</i>	1,38628 $P > 0,10$	10,239 $P > 0,05$

3.6.3 *Gyrodactylus superbis*

Estatisticamente houve estruturação entre as duas populações de *G. superbis* que ocorrem em *C. paleatus* e *C. ehrhardti*. A análise da estatística F (Fst) indicou estruturação (Fst = 0,18410, $p = 0,03030 \pm 0,0064$). Os resultados da AMOVA mostram que existe mais variação dentro da população do que entre elas: 81,59% e 18,41% respectivamente.

Além disso, valores de Tajima e Fu indicam que não há expansão demográfica nas populações de *G. corydori* nos dois hospedeiros (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados para análises populacionais de *G. superbis* ($P > 0,05$ indica que o resultado não é significativo).

	Hospedeiro	Tajima's D	Fu's Fs
<i>G. superbis</i>	<i>C. ehrhardti</i>	1,31483 $P > 0,10$	4,369 $P > 0,05$
	<i>C. paleatus</i>	2,06930 $P < 0,05$	10,669 $P > 0,05$

3.7 Reconstrução dos hospedeiros ancestrais

3.7.1 *Gyrodactylus anisopharynx*

A reconstrução do caráter ancestral baseada na filogenia bayesiana para *G. anisopharynx* indica que o número de passos observados na análise não é significativamente diferente de uma distribuição ao acaso ($P > 0,05$), sugerindo que a população de parasitos encontra-se distribuída homoganeamente entre os hospedeiros (Fig. 12). Todavia, com auxílio da reconstrução do caráter ancestral pode-se inferir que o hospedeiro ancestral de *G. anisopharynx* é *C. paleatus* e há nesse grupo seis eventos de troca/transmissão entre hospedeiros (Fig. 13).

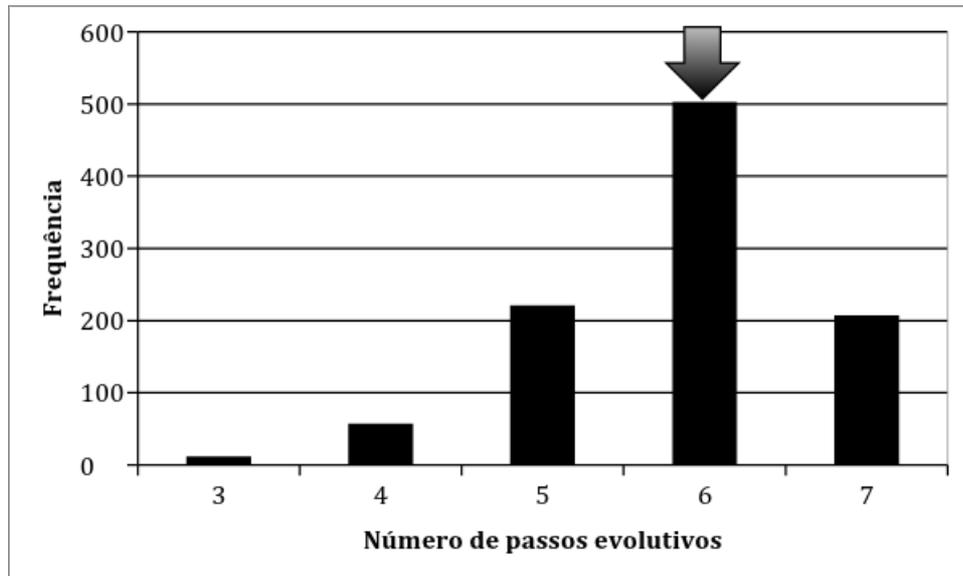


Figura 12: Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. anisopharynx*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros.

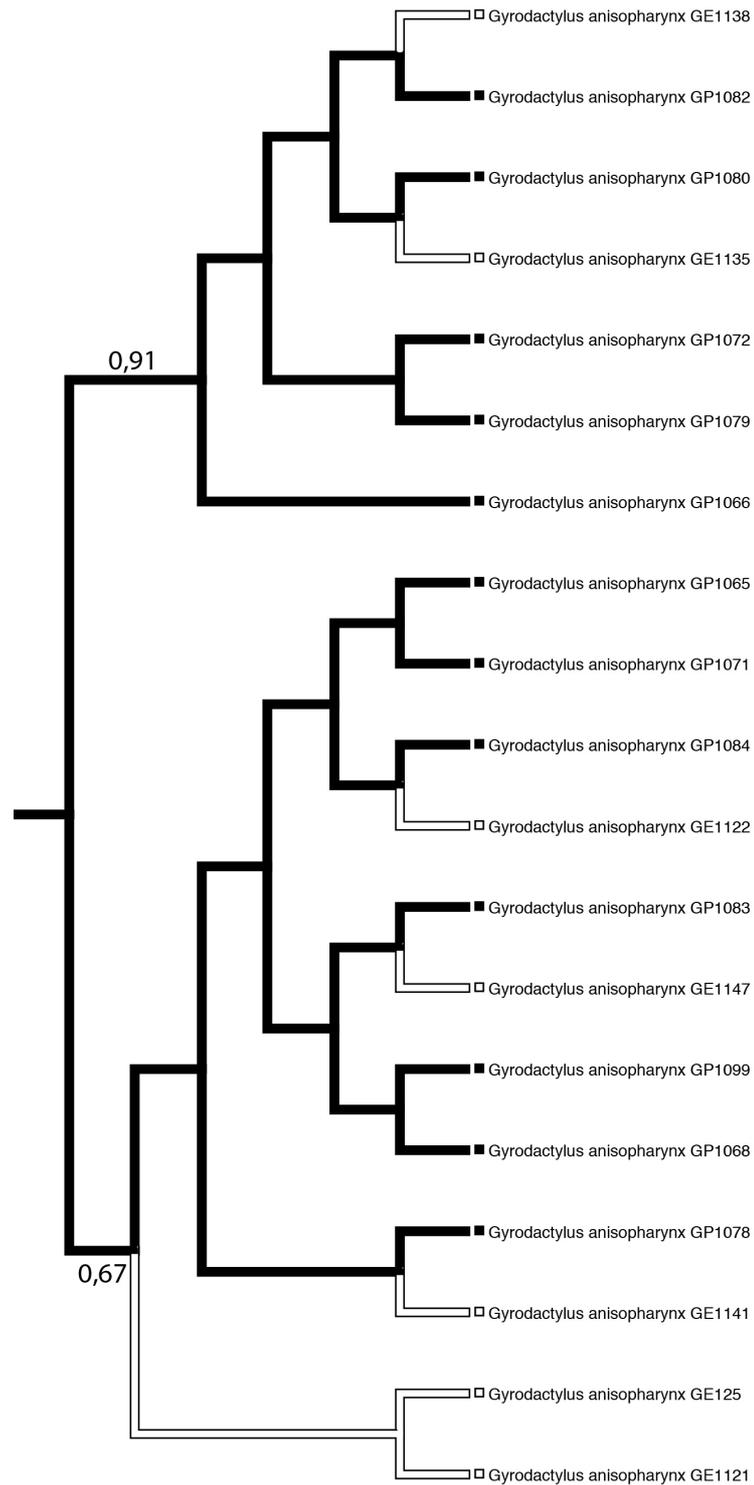


Figura 13: Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. anisopharynx*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Pode-se inferir que o hospedeiro ancestral desse grupo seria *C. paleatus*.

3.7.2 *Gyrodactylus corydori*

A reconstrução do caráter ancestral baseada na filogenia bayesiana para *G. corydori* nos mostra que o número de passos observados na análise não é significativamente diferente de uma distribuição ao acaso ($P > 0,05$), sugerindo que a população de parasitos encontra-se distribuída homogeneamente entre os hospedeiros (Fig. 14). Com auxílio da reconstrução do caráter ancestral não se pode inferir qual seria o hospedeiro ancestral desse grupo, dando suporte às duas hipóteses e há nesse grupo sete eventos de troca de hospedeiros (Fig. 15).

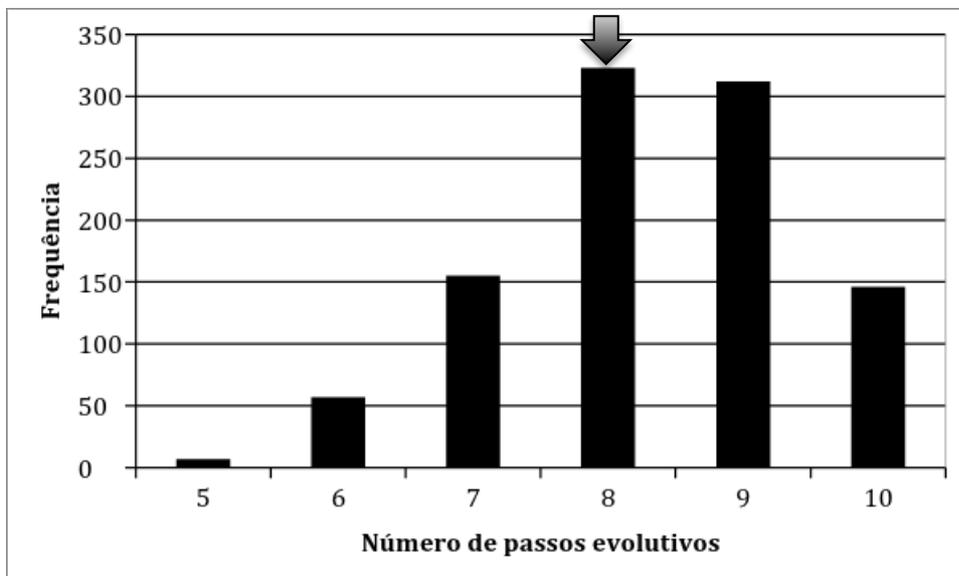


Figura 14: Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. corydori*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros.

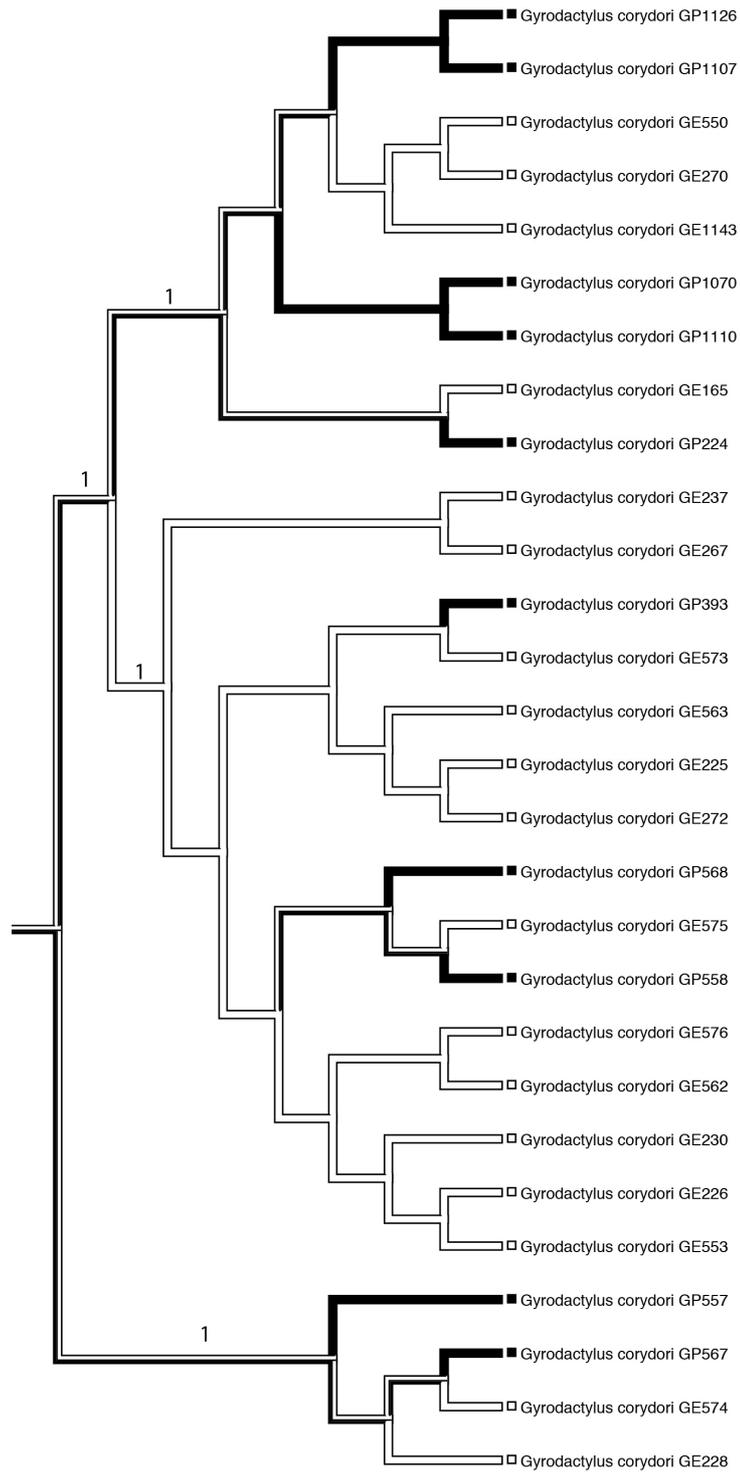


Figura 15: Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. corydori*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Não foi possível inferir o hospedeiro ancestral desse grupo, sendo que as duas hipóteses apresentam suporte.

3.7.3 Gyrodactylus superbis

A reconstrução do caráter ancestral baseado na filogenia bayesiana para *G. superbis* nos mostra que o número de passos observados na análise não é significativamente diferente de uma distribuição ao acaso ($P > 0,05$), sugerindo que a população de parasitos encontra-se distribuída homogeneamente entre os hospedeiros (Fig. 16). Com auxílio da reconstrução do caráter ancestral não se pode inferir qual seria o hospedeiro ancestral desse grupo, dando suporte às duas hipóteses e há nesse grupo seis eventos de troca de hospedeiros (Fig. 17).

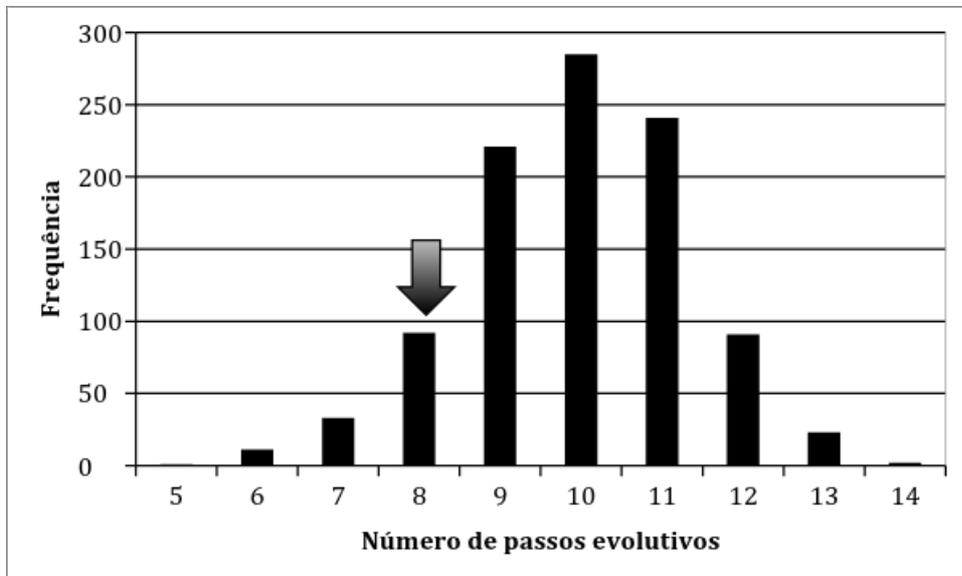


Figura 16: Reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na filogenia Bayesiana de *G. superbis*. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. A seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos parasitos em seus hospedeiros.



Figura 17: Reconstrução do caráter ancestral utilizando análise Bayesiana em *G. superbus*. Nos ramos brancos, aqueles parasitos que foram encontrados em *C. ehrhardti*, enquanto que nos ramos pretos, aqueles que foram encontrados em *C. paleatus*. Valores de probabilidade posterior estão representados nos ramos. Não foi possível inferir o hospedeiro ancestral desse grupo, sendo que as duas hipóteses apresentam suporte.

3.8 História demográfica

3.8.1 *Gyrodactylus anisopharynx*

A reconstrução da história demográfica para *G. anisopharynx*, inferida por coalescência Bayesiana, pode ser encontrada na Fig. 18. Em (a) é apresentada a reconstrução sem distinção de hospedeiro, utilizando as duas populações de parasitos, enquanto que em (b) e (c) são apresentadas as populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. Essa análise sugere que houve um declínio populacional nas duas populações há aproximadamente 12 mil anos, sem expansão populacional. A frequência das diferenças pareadas para o gene COII das duas populações estão representadas nas Figs. 18 (d) e (e). Resultados apresentam somas dos desvios quadrados (SSD) de 0,01583 ($P = 0,62$) para parasitos de *C. ehrhardti* e SSD de 0,01212 ($P = 0,43$) para parasitos de *C. paleatus*, indicando que resultados encontrados não são significativamente diferentes dos esperados, com *G. anisopharynx* apresentando expansão populacional nos dois hospedeiros.

3.8.2 *Gyrodactylus corydori*

A reconstrução da história demográfica para *G. corydori*, inferida por coalescência Bayesiana, pode ser encontrada na Fig. 19. Em (a) é apresentada a reconstrução sem distinção de hospedeiro, utilizando as duas populações de parasitos, enquanto que em (b) e (c) são apresentadas as populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. Essa análise sugere que houve um declínio populacional nas duas populações há aproximadamente 12 mil anos, sem expansão populacional. A frequência das diferenças pareadas para o gene COII das duas populações estão representadas nas Figs. 19 (d) e (e). Resultados apresentam SSD de 0,02101 ($P = 0,71$) para parasitos de *C. ehrhardti* e SSD de 0,1270 ($P = 0,030$) para parasitos de *C. paleatus*, indicando que os resultados observados não são significativamente diferentes do esperado para aqueles de *C. ehrhardti*, enquanto que os resultados observados para parasitos de *C. paleatus* são significativamente diferentes do esperado. Logo, os resultados indicam que as populações de parasitos de *G. corydori* em *C. ehrhardti* estão em expansão populacional, enquanto que as populações de *G. corydori* em *C. paleatus* são resultado de contato secundário.

3.8.3 *Gyrodactylus superbis*

A reconstrução da história demográfica para *G. superbis*, inferida por coalescência Bayesiana, pode ser encontrada na Fig. 20. Em (a) é apresentada a reconstrução sem distinção de hospedeiro, utilizando as duas populações de parasitos, enquanto que em (b) e (c) são apresentadas as populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. Essa análise sugere que houve um declínio populacional nas duas populações há aproximadamente 12 mil anos, com estabilização da queda do tamanho efetivo da população recentemente quando analisada sem distinguir o hospedeiro de origem. A frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* das duas populações estão representadas nas Figs. 20 (d) e (e). Resultados apresentam SSD de 0,06106 ($P = 0,021$) para parasitos encontrados em *C. ehrhardti* e SSD de 0,21333 ($P = 0,020$) para aqueles encontrados associados a *C. paleatus*. Esses resultados indicam que as duas populações parasitando *C. paleatus* são resultado de contato secundário ou representam linhagens mitocondriais distintas e distantes.

Em todas as populações das três espécies de parasitos o mesmo sinal de queda da população efetiva se fez presente, sem apresentar recuperação em *G. corydori* e *G. anisopharynx*.

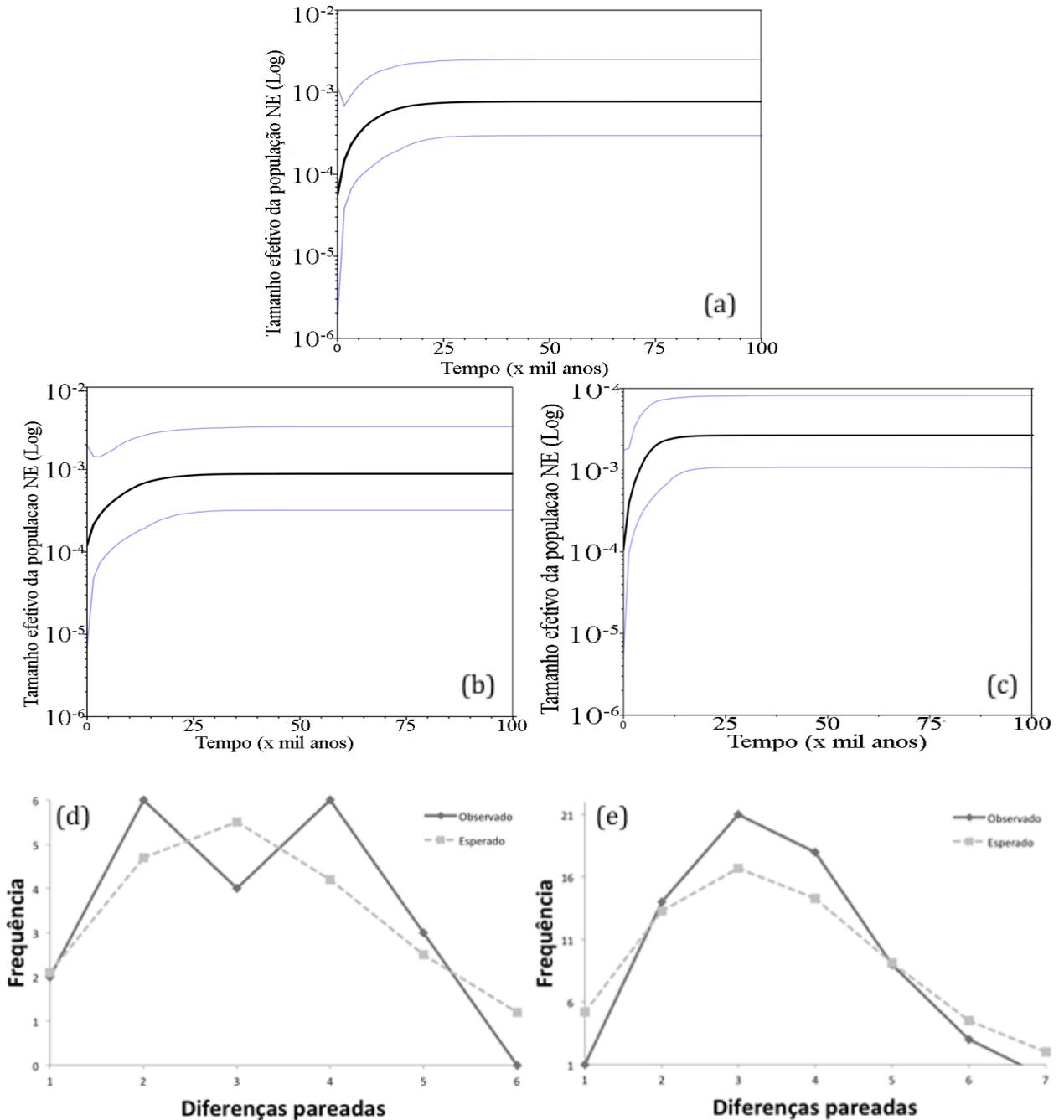


Figura 18: Reconstrução da história demográfica de *G. anisopharynx*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene COII dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

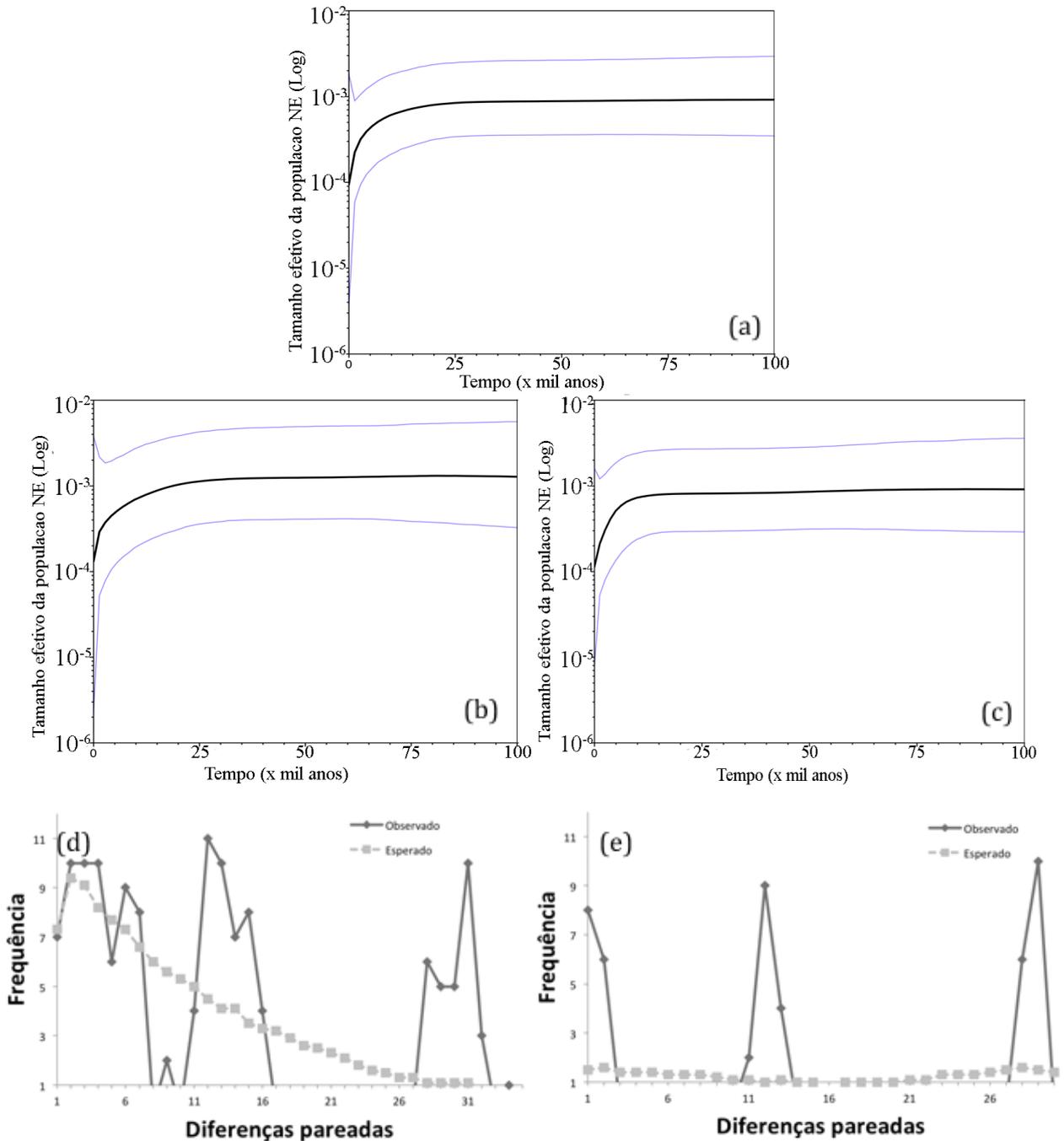


Figura 19: Reconstrução da história demográfica de *G. corydori*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

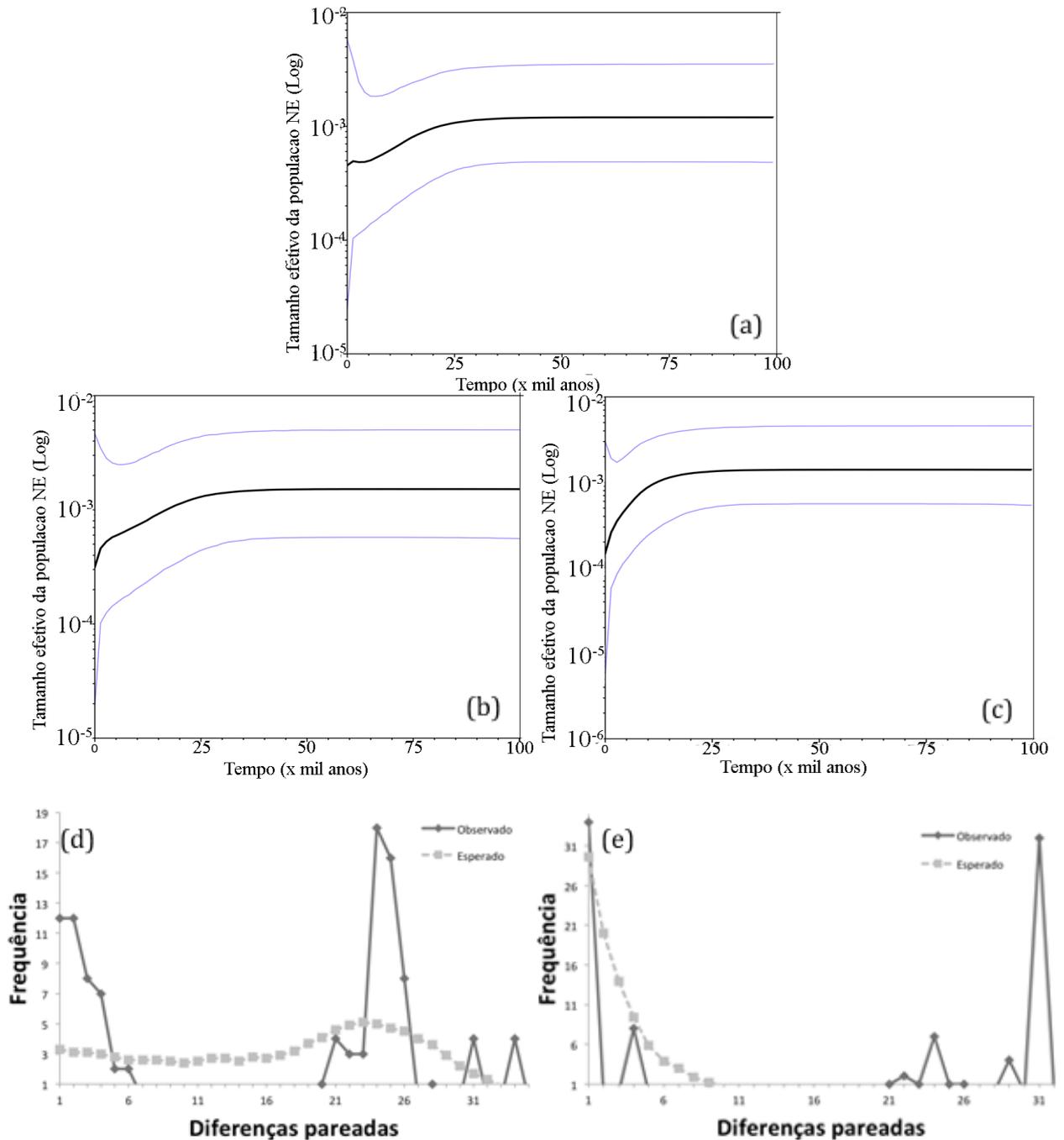


Figura 20: Reconstrução da história demográfica de *G. superbis*. Os gráficos (a), (b) e (c) representam a reconstrução bayesiana da história para toda a população dessa espécie, e das populações de *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, respectivamente. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (N_e) e as linhas azuis representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (d) e (e) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene *COII* dos parasitos de *C. ehrhardti* e *C. paleatus* respectivamente. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional observado para essas sequências e a linha tracejada mostra o esperado.

3.9 Teste de Predições

Como proposto anteriormente, resultados obtidos foram comparados com os resultados esperados de acordo com bibliografia (ver Tabela 1). Os resultados obtidos para *G. anisopharynx* (Tabela 8) sugerem que *C. paleatus* seja seu hospedeiro ancestral, apresentando maior diversidade genética nesse hospedeiro, ocorrendo em áreas onde não há ocorrência de *C. ehrhardti* e tendo *C. paleatus* como estado plesiomórfico na reconstrução do hospedeiro. Além disso, *G. anisopharynx* apresenta estruturação das populações nas duas espécies de hospedeiros indicando que pode estar em um processo de especialização ou ser especialista a um recurso, utilizando eventualmente recursos diferentes do seu ideal.

Os resultados obtidos para *G. corydori* (Tabela 9) não possibilitam caracterizar o hospedeiro ancestral dessa espécie através da otimização do hospedeiro. Entretanto através da diversidade genética pode-se inferir que o hospedeiro ancestral dessa espécie de hospedeiro seria *C. ehrhardti* e sua ocorrência apenas em áreas onde há simpatria das duas espécies de hospedeiros indica que sua ocorrência em *C. paleatus* é decorrente de eventos de troca de hospedeiro. Além disso, *G. corydori* não apresentou estruturação das populações nas duas espécies de hospedeiros, indicando um estado atual generalista.

Já os resultados obtidos para *G. superbus* (Tabela 10) também não possibilitam caracterizar o hospedeiro ancestral dessa espécie. Sabe-se, através de informações obtidas com espécimes amostrados em outras bacias, que *G. superbus* ocorre em áreas onde não há simpatria dos hospedeiros logo, os resultados encontrados sugerem que houve uma recuperação da diversidade genética nas populações que estão associadas a *C. ehrhardti*. Além disso, *G. superbus* apresenta estruturação das populações nas duas espécies de hospedeiros indicando que pode estar em um processo de especialização ou ser especialista a um recurso, utilizando eventualmente recursos diferentes do seu ideal.

Esperava-se um sinal demográfico decorrente da troca de hospedeiro pelos parasitos, no entanto em todos os casos houve queda recente há aproximadamente 12 mil anos, com evidência de contato secundário ou linhagens distintas e distantes nas populações de *G. superbus*.

Tabela 8: Resultados observados para *G. anisopharynx*.

Gyrodactylus anisopharynx

Associação Histórica

Parâmetros	Relação Histórica pré contato entre hospedeiros	Troca de hospedeiro pós contato entre hospedeiros
Diversidade Genética	↑ <i>C. ehrhardti</i>	↓ <i>C. paleatus</i>
Distribuição geográfica	Registros em áreas onde <i>C. ehrhardti</i> não ocorre	
Sinal demográfico	-	Queda como todos os demais (mas muito recente)
Optimização do hospedeiro	<i>C. paleatus</i> (plesiomórfico)	<i>C. ehrhardti</i> (autapomorfia e sinapomorfia)

Dinâmica de especialização

Parâmetros	Generalista	Em especialização/Especialista	Uso eventual do recurso
Estruturação da População	-	Estruturado	
Rede de Haplótipos	-	Com haplótipos compartilhados e grupo de haplótipos específicos ao hospedeiro	
Optimização do Hospedeiro	-	Basal em <i>C. paleatus</i> e um clado de animais em <i>C. ehrhardti</i>	Há casos de autapomorfia (Transmissão recente)
Optimização dos Hospedeiros	-		Ao acaso

Tabela 9: Resultados observados para *G. corydori*.

Gyrodactylus corydori

Associação Histórica

Parâmetros	Relação Histórica pré contato entre hospedeiros	Troca de hospedeiro pós contato entre hospedeiros
Diversidade Genética	↑ <i>C. ehrhardti</i>	↓ <i>C. paleatus</i>
Distribuição geográfica	-	Ocorre em áreas onde há simpatria dos hospedeiros
Sinal demográfico	-	Queda como todos os demais (mas muito recente)
Optimização do hospedeiro	Generalista	<i>C. ehrhardti</i> mais basal com linhagens em autá e sinapomorfia em <i>C. paleatus</i>

Dinâmica de especialização

Parâmetros	Generalista	Em especialização/Especialista	Uso eventual do recurso
Estruturação da População	Não estruturado	-	
Rede de Haplótipos	Com haplótipos compartilhados e grupo de haplótipos específicos ao hospedeiro	-	
Optimização do Hospedeiro	Plesiomorficamente generalista (mas provavelmente em <i>C. ehrhardti</i>)	2 clados em sinapomorfia	Há casos de autapomorfia (Transmissão recente)
Optimização dos Hospedeiros	-	-	Ao acaso

Tabela 10: Resultados observados para *G. superbus*.

Gyrodactylus superbus

Associação Histórica

Parâmetros	Relação Histórica pré contato entre hospedeiros	Troca de hospedeiro pós contato entre hospedeiros
Diversidade Genética	↓ <i>C. paleatus</i>	↑ <i>C. ehrhardti</i>
Distribuição geográfica	Ocorre em áreas onde <i>C. ehrhardti</i> não ocorre	-
Sinal demográfico	-	Queda como todos os demais, mas com queda acentuada em <i>C. ehrhardti</i> (mas muito recente). Alguma evidência de contato secundário ou linhagens distintas e distantes
Optimização do hospedeiro	Generalista	<i>C. paleatus</i> mais basal com <i>auta</i> e sinapomorfia em <i>C. ehrhardti</i>

Dinâmica de especialização

Parâmetro	Generalista	Em especialização/Especialista	Uso eventual do recurso
Estruturação da População	-	Estruturado	
Rede de Haplótipos	-	Com haplótipos compartilhados e grupo de haplótipos específicos ao hospedeiro	
Optimização do Hospedeiro	Plesiomorficamente generalista (mas provavelmente em <i>C. paleatus</i>)	Um clado em <i>C. ehrhardti</i> em sinapomorfia	Há casos de autapomorfia (Transmissão recente)
Optimização dos Hospedeiros	-		Ao acaso

4. Discussão

Esse estudo buscou identificar a origem dos componentes das infra comunidades de *Gyrodactylus* spp. reconstruindo eventos históricos que influenciaram a composição atual das faunas de *C. paleatus* e *C. ehrhardti*, testando também procedimentos genéticos que permitiriam identificar processos históricos de troca de hospedeiros e/ou dispersão entre comunidades. Como resultado subsidiário, foi testada a identidade evolutiva e taxonômica de *G. anisopharynx* e *G. corydori*, utilizando procedimentos de código de barras genético e morfometria geométrica.

4.1 Taxonomia Integrativa: testando a validade de *G. anisopharynx* e *G. corydori*.

Os resultados das análises dos dados moleculares utilizando o marcador COII suportam três clados distintos, compostos por *G. superbus* (Fig. 5 [1]), *G. anisopharynx* (Fig. 5 [2]) e *G. corydori* (Fig. 5 [3]); os três monofiléticos, com alto suporte de ramo. Entretanto, em *G. anisopharynx* foram encontrados quatro espécimes identificados morfologicamente como *G. corydori* (Identificados com asterisco na Fig. 5). A ocorrência desses espécimes morfologicamente determinados como *G. corydori* mas agrupados através de dados moleculares com *G. anisopharynx* levanta questões sobre a utilização de código de barras genético na identificação de espécies quando não é realizada identificação morfológica dos espécimes.

Uma explicação plausível para essa inconsistência entre morfologia e molecular é que as espécies de *G. anisopharynx* e *G. corydori* possuem espécimes híbridos, apresentando características genóticas e fenotípicas das duas espécies parentais. De fato, isso foi confirmado através de análises morfométricas da forma do gancho, estrutura tradicionalmente utilizada para identificação das espécies desse grupo de parasitos. A morfometria geométrica constatou que os indivíduos que não estão de acordo com a identificação molecular apresentam formas dos ganchos das duas espécies, sugerindo que ocorrem eventos de hibridização nas populações. Por esses espécimes (i.e. *G. corydori*) terem se agrupado

molecularmente com *G. anisopharynx*, sugere-se que esses indivíduos representam híbridos do tipo (♂) *G. corydori* + (♀) *G. anisopharynx*. Nenhum híbrido putativo de (♀) *G. corydori* + (♂) *G. anisopharynx* foi detectado nesse estudo levando em consideração que não foi encontrado nenhum espécime identificado morfologicamente como *G. anisopharynx* e geneticamente agrupado com *G. corydori*.

A presença de híbridos pode, portanto, ser o resultado de contato entre as espécies e ausência de isolamento reprodutivo, o que mantém um fluxo gênico entre elas. Esses organismos recebem material genético mitocondrial apenas da mãe, enquanto que o material genético celular é oriundo de pareamento do material genético de ambos os parentais. Logo, a ocorrência de espécimes com material genético de uma espécie e morfologia das estruturas de outra faz com que surjam cenários ainda mais complexos para os relacionamentos encontrados entre os girodactilídeos. Sua identificação utilizando-se ambos os métodos é dificultada devido à presença de plasticidade em suas estruturas esclerotizadas (Bueno-Silva et al. 2011).

De acordo com Funk (1985), a hibridização é a causa de incongruências, contendo dados cruzados que acabam por esconder informações filogenéticas dos grupos. Essas espécies podem estar no início de processo de especiação, em uma zona onde ainda há fluxo gênico entre as populações, entretanto já são encontrados espécimes característicos de cada espécie. Essa zona é chamada de zona de hibridização, ocorrendo quando populações distintas entram em contato e conseguem gerar descendentes que quando férteis, apresentam o potencial de manter o fluxo gênico entre as populações (Toro et al. 2002).

4.2 Associação histórica

Os resultados obtidos com os dois marcadores utilizados no estudo (18S rDNA e COII) suportam que *G. anisopharynx* é grupo irmão de *G. corydori*, enquanto *G. superbus* é espécie irmã do ancestral comum dessas, todos monofiléticos. O evento de divergência que gerou o clado que hoje correspondente à espécie *G. superbus* ocorreu há aproximadamente 550 mil anos, anterior ao evento de

diversificação que originou os clados que hoje representam *G. anisopharynx* e *G. corydori* (270 mil anos).

Originalmente, *C. paleatus* não estava presente na região da bacia do rio Iguaçu, tendo colonizado essa região, no máximo há 22 Ma devido à formação das cataratas do Iguaçu (Shibatta e Hoffmann, 2005). Os resultados desse estudo sugerem que *G. superbus* e *G. anisopharynx* sejam parasitos historicamente associados a *C. paleatus* e provavelmente dispersaram para a bacia do Iguaçu nesse mesmo período. Ao entrar na nova região e entrar em contato com *C. ehrhardti*, que já estava estabelecido no alto Iguaçu, houve troca de seus parasitos fazendo com que as três espécies conhecidas atualmente utilizadas nesse estudo passassem a viver de forma simpátrica nas duas espécies de hospedeiros.

A impossibilidade de avaliar a parasitofauna de *C. nattereri* e a indisponibilidade de espécimes de *G. samirae* para análises populacionais prejudica a capacidade de reconstrução da história coevolutiva das espécies, mas existem pelo menos duas possibilidades derivadas dos resultados gerados nesse estudo. Primeiro, ao colonizar a bacia do rio Iguaçu, *C. paleatus* foi recipiente de linhagens de *G. corydori*. Entretanto, se a datação de (Shibatta e Hoffmann, 2005) e as inferidas no presente estudo estão corretas, a recente origem de *G. corydori*, que divergiu de *G. anisopharynx* há aproximadamente 300 mil anos pode suportar uma segunda hipótese. Nessa hipótese, a troca de hospedeiros realizada por *G. anisopharynx* simpatricamente, pode ter promovido a origem e divergência de *G. corydori* através de um processo de especiação ecológica simpátrica, como proposto por Bueno-Silva et al. (2011) em uma escala de tempo menor. De certa forma, existe um sinal que suporta essa hipótese na reconstrução dos hospedeiros sobre as árvores filogenéticas dos hospedeiros.

O hospedeiro ancestral de *G. anisopharynx* é reconstruído como *C. paleatus* (Fig. 13). Apesar da reconstrução do hospedeiro sobre a filogenia de *G. superbus* não ter sido claramente reconstruída na Fig. 17, ao constatar que o indivíduo identificado como GE264 pode representar um evento de transmissão contemporânea (representando um único representante de um haplótipo exclusivo) e que GE1117 é o único representante de seu haplótipo em *C. ehrhardti*, fica evidente que *C. paleatus* também representa a espécie ancestral de hospedeiro de *G. superbus*. No entanto o menor número e a menor diversidade de haplótipos

nesse hospedeiro sugere que *G. superbus* utiliza de forma adequada os dois recursos, mantendo populações com alta diversidade genotípica mesmo naquele que não representa seu hospedeiro ancestral, *C. ehrhardti*. Essas conclusões suportam a proposta de que a associação entre essas espécies de parasitos e hospedeiros seja antiga. *Gyrodactylus corydori*, por outro lado, foi otimizado como generalista na base da filogenia (Fig. 15), mas é mais comum em *C. ehrhardti*. A diferenciação de *G. corydori*, a partir de uma linhagem de *C. ehrhardti* pode ter sido resultado do processo de utilização diferenciada de recursos, como proposto por Bueno-Silva et al. (2011) de forma semelhante ao processo de especiação simpátrica proposto por Bush (1975, 1994).

Apesar de não ter refletido em mudanças genéticas e moleculares que justifiquem especiação, o mesmo processo parece ter deixado sinais na evolução de *G. superbus*, com a especialização da espécie em *C. ehrhardti*, mas ainda tendo *C. paleatus* como hospedeiro original (vide abaixo maiores detalhes). Evidência adicional para isso é a curva multimodal na análise de *mismatch* (Fig. 19), que sugere a presença de mais de uma linhagem mitocondrial, relativamente distantes, na amostragem realizada. Essas linhagens provavelmente refletem diferenças acumuladas durante um período muito semelhante àquele observado na divergência entre *G. anisopharynx* e *G. corydori* (Fig. 8).

Com os resultados encontrados é possível sugerir um cenário para exemplificar o que ocorreu/está ocorrendo na região (Figura 21). A hipótese é de que em rios Argentinos, onde os hospedeiros não são encontrados em simpatria, a fauna de parasitos seja composta por *G. superbus* e espécimes de apresentam a forma dos ganchos das duas outras espécies, *G. anisopharynx* e *G. corydori*. Ao colonizar a bacia do Rio Iguaçu e passar a viver em simpatria com *C. ehrhardti* houve dispersão para o novo recurso, manutenção da espécie de *G. superbus* e após a dispersão houve diferenciação da linhagem dando origem a *G. anisopharynx* e *G. corydori* reforçando a hipótese de que esteja ocorrendo especiação simpátrica nesses organismos.

A reconstrução dessa associação histórica de maneira mais robusta depende de uma análise mais abrangente, com a inclusão de mais hospedeiros *Corydoras* spp. e seus respectivos parasitos. Análises co-filogeográficas, de hospedeiros e parasitos, podem fornecer, ainda, suporte para a tarefa de reconstituir a história dessas associações.

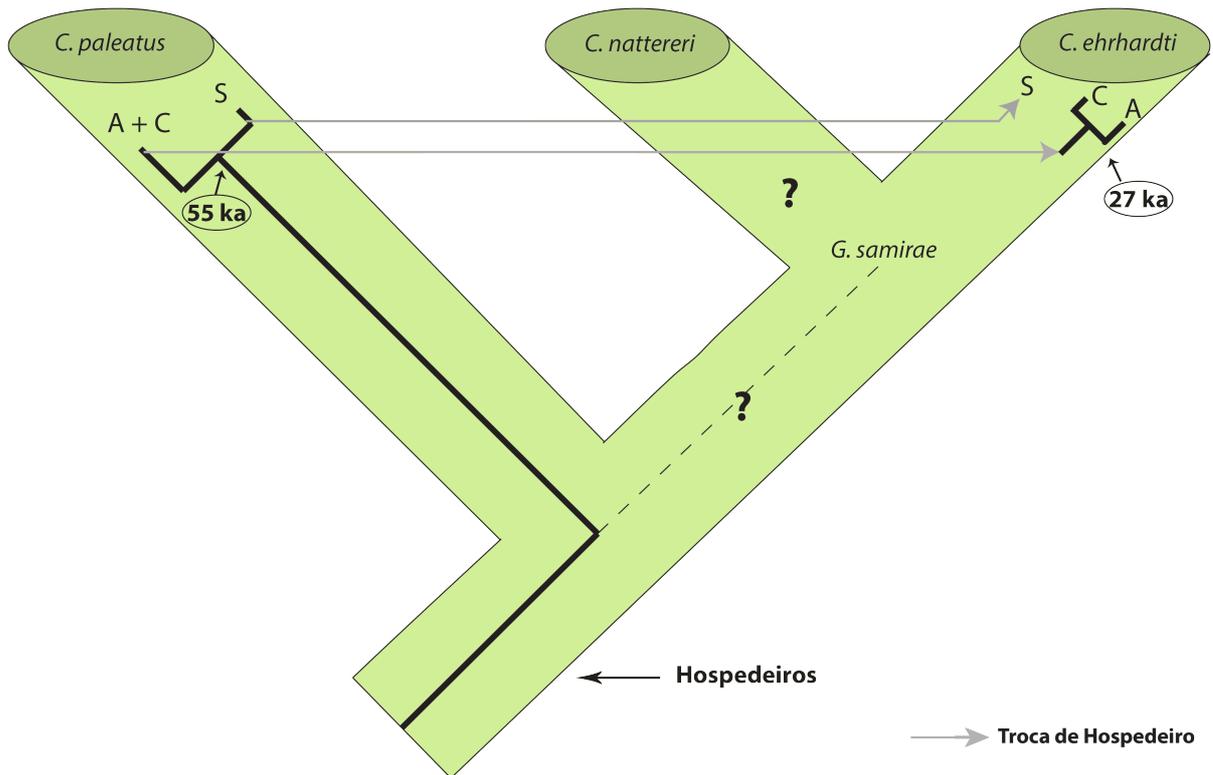


Figura 21: Cenário hipotético do que ocorre/ocorreu na região do estudo incluindo informações de organismos encontrados na Argentina. Na região da Argentina não há simpatria dos hospedeiros, ocorrendo apenas *C. paleatus*. As informações de *C. nattereri* e *G. samirae* não são conhecidas e podem ser de fundamental importância para o entendimento do relacionamento do grupo. O tempo de divergência de cada linhagem baseado nas análises Bayesianas para o marcador mitocondrial COII estão representados nos balões.

4.3 O uso dos hospedeiros

A atual distribuição desse sistema de hospedeiros e parasitos indica que os parasitos apresentam características que os permitem utilizar, de forma indiscriminada ou não, recursos (hospedeiros) semelhantes. Parecem existir, entretanto, 4 formas básicas de utilização dos recursos (hospedeiros) disponíveis: 1. por plesiomorfia: quando parasito e hospedeiros tem uma relação histórica entre si; 2. por sinapomorfia: quando existe a formação de linhagens derivadas específicas de parasitos para um novo hospedeiro; 3. quando todas as linhagens do parasito podem utilizar os recursos indiscriminadamente; e 4. quando ocorre um uso oportunista do recurso, decorrente de uma transmissão recente entre hospedeiros (vide Boeger et al. 2003) – os hospedeiros são considerados autapomorfias na otimização sobre a filogenia do parasito.

Dentre os parasitos analisados, apenas *G. anisopharynx* apresenta suporte em praticamente todas as análises (Tabela 9) suportando a especialização de linhagens a partir de uma linhagem basal. Apesar da otimização ter sido considerada não estatisticamente diferente do acaso, populações de *G. anisopharynx* são estruturadas conforme o hospedeiro, a rede de haplótipos claramente apresenta dois haplogrupos, cada um mais prevalente em respectivas espécies hospedeiras e a otimização produz uma linhagem na qual o hospedeiro derivado é sinapomórfico. A espécie, todavia, é capaz de sobreviver sobre diferentes hospedeiros subsequente a transmissão recente, como evidenciado pelo status autapomórfico de hospedeiros em diversas ocasiões (Fig. 13).

Gyrodactylus corydori e *G. superbus*, entretanto, apresentam menor evidência de especialização. A análise de estruturação não foi positiva, existe muito compartilhamento de haplótipos, sem evidência de formação de haplogrupos hospedeiro-específicos, e existem diversos casos de transmissão recente, sinapomórficas. Ambas espécies, entretanto, apresentaram picos multimodais nas análises de *mismatch* (Figs. 19 e 20) e forte evidência de agrupamentos sinapomórficos de linhagens hospedeiro-específica nas reconstruções de hospedeiros ancestrais (Figs. 14 e 15, respectivamente). No caso de *G. superbus*, ao avaliar a reconstrução do hospedeiro ancestral fica relativamente evidente a evolução de uma linhagem específica de *C. ehrhardti* enquanto que no caso de *G. corydori* esse sinal é menos evidente, mas com alguns casos de sinapomorfias para *C. paleatus*. Evidentemente, esses parasitos apresentam, ainda, uma ampla evidência de uso de hospedeiro devido à transmissões recentes, algo que é considerado comum no caso de um grupo que realiza transmissões contínuas, como adultos, ao longo da vida (vide Boeger et al. 2003, 2005).

Esse cenário reconstruído sugere ciclos de especialização e generalização os quais são esperados sob a hipótese de Oscilação (Janz e Nylin, 2008). Como previsto na modelagem desse conceito por Araujo et al. (comunicação pessoal), ciclos de trocas de hospedeiros são esperados com o acúmulo de novidades evolutivas nas linhagens de animais parasitos. O presente cenário sugere, pelo menos, dois grandes eventos de diversificação associados a especialização seguindo eventos de trocas de hospedeiros para as 3 espécies de *Gyrodactylus* parasitas de *Corydoras spp.* no alto rio Iguaçu. Em pelo menos um caso, a divergência de *G. corydori*, esse processo parece ter gerado uma nova espécie

como previsto nas modelagens computacionais de Araujo et al. (comunicação pessoal).

Mais uma vez fica evidente que existe um limite esperado para os processos de trocas de hospedeiros. Como sugerido por Braga et al. (2014), o compartilhamento de linhagens de parasitos (i.e. resultado esperado de trocas de hospedeiros) é fortemente influenciado pelas relações filogenéticas das espécies hospedeiras.

4.4 Testando protocolo de detecção de trocas de hospedeiros

Finalmente, conforme proposta de Boeger et al. (2003), eventos de troca de hospedeiro podem promover uma redução no tamanho efetivo populacional do parasito, representando um evento de *bottleneck* (Nei et al. 1974). Assim, a premissa desse estudo foi a de que, ao analisar a história demográfica das populações dos parasitos que apresentam troca de hospedeiro, seria possível detectar pelo menos um *bottleneck*, com posterior aumento da população efetiva (Boeger et al. 2003). Esse *bottleneck* deveria ser identificado nas populações de parasito ao ocorrer a invasão do alto Iguaçu por *C. paleatus*, sendo que naquelas populações que trocaram de hospedeiro deveria ser encontrada uma nítida redução do tamanho efetivo da população com posterior recuperação do tamanho efetivo. Entretanto, esse padrão não foi detectado em nenhum caso.

Ao verificar a história demográfica de *G. corydori*, Bueno-Silva et al. (2011) encontraram aumento da população efetiva há cerca de 12 mil anos, sugerindo forte expansão populacional. Entretanto no presente trabalho não foi encontrado expansão populacional em nenhuma das três espécies analisadas. Isso pode indicar que eventos locais estão afetando o padrão encontrado já que esses autores utilizaram indivíduos de apenas dois rios, enquanto no presente trabalho foram utilizados espécimes de cinco rios. Esse seria o padrão esperado sob a hipótese do Mosaico Geográfico de Coevolução (Thompson, 2005).

O sinal demográfico nas três espécies utilizadas indicou redução no tamanho efetivo da população há aproximadamente 13 mil anos, muito mais recente do que os eventos esperados em associação com as trocas de hospedeiros. *Gyrodactylus anisopharynx* e *G. corydori* apresentam o mesmo padrão, declínio populacional em

aproximadamente 13 mil anos, sem apresentar expansão populacional, com queda mais acentuada em *C. ehrhardti*.

Esses sinais de redução do tamanho efetivo da população podem ser resultado de eventos de alterações climáticas que ocorreram no Quaternário, há aproximadamente 12 mil anos, período característico por baixas temperaturas e seca em escala global (Markgraf, 1989). Nesse período a maioria dos eventos de mudanças climáticas estavam distribuídos globalmente, caracterizados por resfriamento polar, aridez tropical e grandes mudanças de circulação atmosférica (Mayewski et al. 2004) levando à alterações drásticas nas distribuições das espécies. Como previsto por Boeger et al. (2003), os efeitos da troca de hospedeiro, o *bottleneck*, são recuperados com o tempo, através do acúmulo de mutações e recombinação sexuada. Portanto, o método deve ser útil, mas apenas para eventos recentes de colonização de novos hospedeiros.

Adicionalmente, de acordo com Grant et al. (2012), eventos demográficos recentes que causam diminuição no tamanho efetivo da população, acabam por esconder eventos mais antigos acerca da história demográfica das espécies. Ainda segundo esses autores, deteriorações climáticas durante as glaciações máximas levam a uma diminuição populacional, a qual não é suficiente para causar um *bottleneck* na população. Entretanto, essa queda é suficiente para apagar eventos demográficos anteriores.

Os sinais demográficos encontrados nas três espécies de parasitos utilizadas provavelmente refletem eventos climáticos que causaram redução populacional, mascarando eventos passados que poderiam sugerir troca de hospedeiro no momento em que eles passaram a viver simpatricamente na região. Adicionalmente, padrões demográficos semelhantes foram detectados anteriormente em peixes da região do Alto Iguaçu, tendo queda do tamanho efetivo da população em períodos recentes (Tschá e Boeger, comunicação pessoal). Isso sugere um evento regional que teve reflexo em diversas populações na região.

Referências

- Agosta, S.J., Klemens, J.A. (2008). Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters*. 11, 1123-1134.
- Agosta, S.J., Janz, Niklas., Brooks, D.R. (2010) How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. *Zoologia*. 27 (2), 151-162.
- Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal of Parasitology*. 32, 281-308.
- Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D. (2007). The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian Doll-killers”. *Adv. Parasitol.* 64, 161-376.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C. (1997). Coevolution of the Monogenoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. *International Journal of Parasitology*. 27, 1495-1511.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R. (2003). Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). *Zool. Scr.* 32, 437-448.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., Engers, K.B. (2005). Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). *Journal of Parasitology*. 91, 1000-1007.
- Braga, M.P., Razzolini, E., Boeger, W. (2014). Drivers of parasite sharing among Neotropical freshwater fishes. *Journal of Animal Ecology*. 1-11.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A. (1993). *Parascript: Parasites and the Language of Evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A. (2002). *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. Chicago, University of Chicago Press.
- Brooks, D.R. e Ferrao, A.L. (2005). The historical biogeography of coevolution: emerging infectious diseases are evolutionary accidents waiting to happen. *Journal of Biogeography*. 32: 1291-1299.
- Brooks, D.R. e Hoberg, E.P. (2006). Systematics and emerging infectious diseases: from management to solution. *Journal of Parasitology*. 92: 426-429.

- Brooks, D.R. e Hoberg, E.P. (2007). How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends in Parasitology*. 23: 571-574.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A., Pie, M.R. (2011). Choice matters: incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogeneoidea: Gyrodactylidae). *International Journal for Parasitology*. 41, 657-667.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A. (2014). Neotropical Monogeneoidea. 58. Three new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae) from *Scleromystax* spp. (Callichthyidae) and the proposal of COII gene as an additional fragment for barcoding gyrodactylids. *Folia Parasitologica* (Praha). 61: 213-222.
- Bush, G. L. (1975). Sympatric speciation in phytophagous parasitic insects. In *Evolutionary strategies of parasitic insects and mites*. Springer US. 187-206.
- Bush, G. L. (1994). Sympatric speciation in animals: new wine in old bottles. *Trends in Ecology & Evolution*. 9(8), 285-288.
- Clement, M., Posada, D. e Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1660.
- Cogswell, A.T., Kenchington, E.L.R., Zouros, E. (2011). Segregation of sperm mitochondria in two- and four-cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome*. 49(7): 799-807.
- Doucet-Beaupré, H., Breton, S., Chapman, E.G., Blier, P.U., Bogan, A.E., Stewart, D.T. e Hoeh, W.R. (2010). Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10: 50.
- Drummond, A.J., Suchar, M.A., Xie, D. e Rambaut, A., (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1969-1973.
- Dryden IL, Mardia KV (1998) Statistical shape analysis. Wiley, Chichester.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915-925.

- Funk, V.A. (1985). Phylogenetic Patterns and Hybridization. *Ann. Nissouri Bot. Gard.* 72: 681-715.
- Grant, W.S., Liu, M., Gao, T., Yanagimoto, T. (2012) Limits of Bayesian skyline plot analysis of mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 65: 203-212.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C, Hebert, P.D.N. e Hickey, D.A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetic and population genetics. *TRENDS in Genetics.* 23(4): 167-172.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 4(1): 1-9
- Humason, L. (1979). Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, 4th ed. San Francisco, 661.
- Janzen, D. (1985). On ecological fitting. *OIKOS.* 45, 308-310.
- Janz, N., & Nylin, S. Ö. R. E. N. (2008). The oscillation hypothesis of host-plant range and speciation. Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects, 203-215.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources.* 11: 353-357.
- Librado, P., Rozas, J., (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451–1452.
- Maddison, W.P. e Maddison, D.R. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.02. <http://mesquiteproject.org>
- Maia, G.M.G. (2014). Identificação Molecular de Espécies da Subfamília Corydoradinae (Siluriformes: Callichthyidae). 103 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- Markgraf, V. (1989). Paleoclimates in Central and South America since 18,000 BP based on pollen and lake-level records. *Quaternary Science Reviews.* 8: 1-24.
- Masters, B.C., Fan, V. e Ross, H.A. (2011). Species Delimitation – a Geneious plugin for the exploration of species boundaries. *Molecular Ecology Resources.* 11: 154-157.

- Mayewski, P.A., Rohling, E.E., Stager, J.C., Karlén, W., Maasch, K.A., Meeker, D., Meverson, E.A., Gasse, F., van Krevel, S., Holmgren, K., Lee-Thorp, J., Rosqvist, G., Rack, F., Staubwasser, M., Schneider, R.R., Steig, E.J. (2004). Holocene climate variability. *Quaternary Research*. 62(3): 243-255.
- McCoy, K.D. (2004). Sympatric speciation in parasites – what is sympatry? *Trends in Parasitology*. 19 (9): 400-4004.
- Meinilä, M., Kuusela, J., Zie tara, M.S., Lumme, J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *International Journal of Parasitology*. 34, 515–526.
- Nei, M., Maruyama, T. Chakraborty, R. (1974). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *International Journal of Organic Evolution*. 29 (1): 1-10.
- Ornelas-García, C. P.; Domínguez-Domínguez, O.; Doadrio, E I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*. 8, 340.
- Page, R.D.M. (1994). Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*. 10, 155-173.
- Page, D.M., Hafner, M.S. (1996). Molecular phylogenies and host-parasite cospeciation: gophers and lice a model system. In: Harvey, P.H., Brown, A.J.L., Smith, J.M., Nee, S. (Eds.), *New Uses for New Phylogenies*, Oxford University Press, New York, pp. 255-270.
- Palumbi, S.R. (1996). Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds) *Molecular systematics*. *Sinauer Associates, Inc.* 205-247.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14, 817–818.
- Poulin, R. (1998). *Evolutionary Ecology of Parasites: From Individuals to Communities*, Chapman and Hall, London.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr, C.J. (2003). Family Callichthyidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 291–309.
- Rohlf, F.J. e Marcus, L.F. (1993). A revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology e Evolution*. 8(4): 129-132.

- Rohlf, F.J. (2008). tpsUtil, file utility program. version 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics*. 19, 1572-1574.
- Rubinoff, D., Cameron, S. e Will, K. (2007). A genomic perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. *Journal of Heredity*. 97(6): 581-594.
- Saavedra, C. Reyero, M.I., e Zouros, E. (1997). Male-Dependent Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA and Female-Dependent Sex-Ratio in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*. April 1, 1997 vol. 145 no. 4 1073-1082.
- Shibatta, O.A. e Hoffmann, A.C. (2005). Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22 (2): 366-371.
- Szidat, L. (1973). Morphologie und Verhalten von *Paragyrodactylus superbus* ng. sp., Erreger eines Fischsterbens in Argentinien. *Angew. Parasitol.* 14, 1-10.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123, 585–595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson, J. N. (2005). The geographic mosaic of coevolution. University of Chicago Press, Londres. 408 p
- Toro, J.E., Thompson, R.J., Innes, D.J. (2002). Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. *Marine Biology* 141: 897-909.
- Ziêtara, M. S.; Arndt, A.; Geets, A.; Hellemans, B.; Volckaert, F. A. M. (2000). The nuclear rDNA region of *Gyrodactylus arcuatus* and *G. branchicus* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Journal of Parasitology*. v.86, p.1368-1373.

ANEXO 1

Anexo 1: Lista de animais sequenciados com seus respectivos hospedeiros e locais em que foram amostrados.

Rio em que hospedeiros foram amostrados	Hospedeiros	Parasitas	Tombo	Haplótipos
Rio Barigui (25°25'8,14"S 49°18'32,54"W)	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G125	HA05
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G165	HC04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G267	HC06
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G270	HC03
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G272	HC05
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G132	HS04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G264	HS07
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G271	HS09
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G738	HS04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G739	HS04
Rio Iguaçu - Água Azul (25°79'41,6"S 50°19'99,7"W)	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1121	HA01
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1122	HA01
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1135	HA02
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1138	HA03
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1141	HA04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1147	HA04
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1066	HA06
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1065	HA07
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1068	HA08
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1071	HA09
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1072	HA10
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1078	HA11
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1079	HA12
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1080	HA13
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1082	HA13
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1083	HA14
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. anisopharynx</i>	G1084	HA04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G1143	HC03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G1070	HC04
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G1099	HA15
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G1107	HC04
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G1110	HC04
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G1126	HC03
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G1117	HS05
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G1118	HS03
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G1123	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1043	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1051	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1061	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1067	HS05
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1069	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1074	HS05

	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1075	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1085	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1098	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1259	HS05
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1268	HS05
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G1272	HS08
Rio Miringuava - Olho d'Água (25°36'16"S 49°05'07"W)	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G700	HS03
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G393	HC10
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G557	HC11
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G558	HC09
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G567	HC11
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G568	HC10
Rio Miringuava - Colônia Murici (25°36'16"S 49°07'42"W)	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G550	HC07
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G553	HC08
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G562	HC09
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G563	HC10
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G573	HC10
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G574	HC11
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G575	HC09
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G576	HC09
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G385	HS02
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G561	HS02
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. superbus</i>	G321	HS03
Rio Piraquara (25°29'59"S 49°02'40"W)	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G226	HC01
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G228	HC02
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G230	HC01
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. corydori</i>	G225	HC05
	<i>C. paleatus</i>	<i>G. corydori</i>	G224	HC04
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G235	HS01
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G223	HS06
	<i>C. ehrhardti</i>	<i>G. superbus</i>	G90	HS02

ANEXO 2

Anexo 2: Estimativas de divergência evolutiva entre haplótipos. O número de substituições de bases entre as sequências são mostradas. A análise envolveu 35 haplótipos. Todas as posições que contêm gap e falta de dados foram eliminados, resultando em 463pb. As espécies estão indicadas pelas cores, *G. anisopharynx* em azul, *G. corydori* em verde e *G. superbus* em cinza.

	HA01	HA02	HA03	HA04	HA05	HA06	HA07	HA08	HA09	HA10	HA11	HA12	HA13	HA14	HA15
HA01	-														
HA02	0,0022	-													
HA03	0,0022	0,0000	-												
HA04	0,0000	0,0022	0,0022	-											
HA05	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	-										
HA06	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022	-									
HA07	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	-								
HA08	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	-							
HA09	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	-						
HA10	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0022	0,0022	0,0022	-					
HA11	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	-				
HA12	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0022	0,0022	0,0022	0,0000	0,0022	-			
HA13	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0022	0,0022	0,0022	0,0000	0,0022	0,0000	-		
HA14	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0022	0,0022	-	
HA15	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0022	0,0022	0,0000	-
HC01	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC02	0,0856	0,0882	0,0882	0,0856	0,0856	0,0882	0,0856	0,0856	0,0856	0,0882	0,0856	0,0882	0,0882	0,0856	0,0856
HC03	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567
HC04	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567
HC05	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC06	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC07	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0567	0,0567	0,0592	0,0567	0,0592	0,0592	0,0567	0,0567
HC08	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC09	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC10	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639	0,0639
HC11	0,0856	0,0882	0,0882	0,0856	0,0856	0,0882	0,0856	0,0856	0,0856	0,0882	0,0856	0,0882	0,0882	0,0856	0,0856
HS01	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380
HS02	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380
HS03	0,1416	0,1417	0,1417	0,1416	0,1416	0,1417	0,1416	0,1416	0,1416	0,1417	0,1416	0,1417	0,1417	0,1416	0,1416
HS04	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408	0,1408
HS05	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459	0,1459
HS06	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380
HS07	0,1514	0,1515	0,1515	0,1514	0,1514	0,1515	0,1514	0,1514	0,1514	0,1515	0,1514	0,1515	0,1515	0,1514	0,1514
HS08	0,1470	0,1471	0,1471	0,1470	0,1470	0,1471	0,1470	0,1470	0,1470	0,1471	0,1470	0,1471	0,1471	0,1470	0,1470
HS09	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380	0,1380

	HC01	HC02	HC03	HC04	HC05	HC06	HC07	HC08	HC09	HC10	HC11
HA01											
HA02											
HA03											
HA04											
HA05											
HA06											
HA07											
HA08											
HA09											
HA10											
HA11											
HA12											
HA13											
HA14											
HA15											
HC01	-										
HC02	0,0516	-									
HC03	0,0153	0,0492	-								
HC04	0,0153	0,0492	0,0000	-							
HC05	0,0000	0,0516	0,0153	0,0153	-						
HC06	0,0000	0,0516	0,0153	0,0153	0,0000	-					
HC07	0,0153	0,0492	0,0000	0,0000	0,0153	0,0153	-				
HC08	0,0000	0,0516	0,0153	0,0153	0,0000	0,0000	0,0153	-			
HC09	0,0000	0,0516	0,0153	0,0153	0,0000	0,0000	0,0153	0,0000	-		
HC10	0,0000	0,0516	0,0153	0,0153	0,0000	0,0000	0,0153	0,0000	0,0000	-	
HC11	0,0516	0,0000	0,0492	0,0492	0,0516	0,0516	0,0492	0,0516	0,0516	0,0516	-
HS01	0,1184	0,1374	0,1237	0,1237	0,1184	0,1184	0,1237	0,1184	0,1184	0,1184	0,1374
HS02	0,1184	0,1374	0,1237	0,1237	0,1184	0,1184	0,1237	0,1184	0,1184	0,1184	0,1374
HS03	0,1271	0,1490	0,1325	0,1325	0,1271	0,1271	0,1325	0,1271	0,1271	0,1271	0,1490
HS04	0,1211	0,1402	0,1264	0,1264	0,1211	0,1211	0,1264	0,1211	0,1211	0,1211	0,1402
HS05	0,1313	0,1482	0,1342	0,1342	0,1313	0,1313	0,1342	0,1313	0,1313	0,1313	0,1482
HS06	0,1184	0,1374	0,1237	0,1237	0,1184	0,1184	0,1237	0,1184	0,1184	0,1184	0,1374
HS07	0,1367	0,1537	0,1396	0,1396	0,1367	0,1367	0,1396	0,1367	0,1367	0,1367	0,1537
HS08	0,1323	0,1545	0,1377	0,1377	0,1323	0,1323	0,1377	0,1323	0,1323	0,1323	0,1545
HS09	0,1184	0,1374	0,1237	0,1237	0,1184	0,1184	0,1237	0,1184	0,1184	0,1184	0,1374

	HS01	HS02	HS03	HS04	HS05	HS06	HS07	HS08	HS09
HA01									
HA02									
HA03									
HA04									
HA05									
HA06									
HA07									
HA08									
HA09									
HA10									
HA11									
HA12									
HA13									
HA14									
HA15									
HC01									
HC02									
HC03									
HC04									
HC05									
HC06									
HC07									
HC08									
HC09									
HC10									
HC11									
HS01	-								
HS02	0,0000	-							
HS03	0,0445	0,0445	-						
HS04	0,0022	0,0022	0,0468	-					
HS05	0,0398	0,0398	0,0560	0,0421	-				
HS06	0,0000	0,0000	0,0445	0,0022	0,0398	-			
HS07	0,0444	0,0444	0,0608	0,0444	0,0043	0,0444	-		
HS08	0,0491	0,0491	0,0043	0,0515	0,0607	0,0491	0,0655	-	
HS09	0,0000	0,0000	0,0445	0,0022	0,0398	0,0000	0,0444	0,0491	-