

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL EUCLYDES DOS SANTOS

UMA ABORDAGEM ECOFILOGENÉTICA PARA COMPREENSÃO DOS PADRÕES
DE DIVERSIFICAÇÃO E ESPECIFICIDADE DAS ESPÉCIES NA INTERAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO

CURITIBA

2024

RAFAEL EUCLYDES DOS SANTOS

UMA ABORDAGEM ECOFILOGENÉTICA PARA COMPREENSÃO DOS PADRÕES
DE DIVERSIFICAÇÃO E ESPECIFICIDADE DAS ESPÉCIES NA INTERAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zoologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Magalhães Campião

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santos, Rafael Euclides dos

Uma abordagem ecofilogenética para compreensão dos padrões de diversificação e especificidade das espécies na interação parasito-hospedeiro / Rafael Euclides dos Santos. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Magalhães Campião.

1. Relação hospedeiro-parasito. 2. Nicho (Ecologia). 3. Taxonomia. 4. Mata Atlântica. 5. Anuro. I. Campião, Karla Magalhães, 1985-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RAFAEL EUCLYDES DOS SANTOS** intitulada: **UMA ABORDAGEM ECOFILOGENÉTICA PARA COMPREENSÃO DOS PADRÕES DE DIVERSIFICAÇÃO E ESPECIFICIDADE DAS ESPÉCIES NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, sob orientação da Profa. Dra. KARLA MAGALHÃES CAMPIÃO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Junho de 2024.

Assinatura Eletrônica
17/06/2024 10:11:46.0
KARLA MAGALHÃES CAMPIÃO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/06/2024 10:50:54.0
SABRINA BORGES LINO ARAÚJO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
20/06/2024 13:17:28.0
CYNTHIA ELIZABETH GONZÁLEZ
Avaliador Externo (CENTRO DE ECOLOGIA APLICADA DEL LITORAL)

Assinatura Eletrônica
20/06/2024 16:42:45.0
MARIA ISABEL MÜLLER
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha avó, que mesmo não estando mais presente neste mundo, sempre esteve ao meu lado e torceu por mim. Agradeço à minha mãe por ser uma mulher incrível e exemplo de inspiração e superação. Agradeço ao meu pai. Agradeço a todas as mulheres da minha família, pois sem elas nenhum sonho seria possível. Espero que saibam o quanto amo e admiro vocês. Também agradeço aos meus orixás e a lemanjá, pois a fé sempre me acompanhou.

Agradeço imensamente à minha orientadora e amiga Karla, por ser mais que uma orientadora, muitas vezes uma amiga e até uma mãe, seja para acolher ou para dar aquela puxada de orelha. Te admiro muito. Obrigado à professora Sabrina, que é uma mulher, pesquisadora e mãe admirável. É sempre muito bom ter você por perto. Um obrigado especial aos integrantes do Interações Biológicas (Angie, Henrique, Ju, Luri, Aline, Júlia, Natale) pelas discussões de artigo, cafés e jogos. Obrigado a todos os professores e professoras que fizeram parte da minha formação, assim como a todos os técnicos, servidores e às meninas da limpeza. Nada funciona sem vocês.

Obrigado aos meus amigos que me acompanham todos os dias, aguentam minhas reclamações e estão sempre prontos para ajudar em qualquer momento. Nati (Pumba), Cleitin, Thamy, Vitor e Gui, não sei como seriam os dias sem ter cada um de vocês para tomar um café, fofocar e reclamar como bons idosos que somos. Obrigado por me permitirem fazer parte da vida de vocês (amo vocês). Anto e Gui, obrigado pela amizade e por tudo que já fizeram por mim e pela Hanna, mas principalmente por terem colocado a Didi em nossas vidas, esse bebê de apoio emocional que amo desde antes de nascer. Obrigado aos novos amigos Rafa Z., Renan, Cami e toda galera da Bebold, que torce pelos seus alunos além dos campeonatos.

O obrigado mais especial é para minha namorada, amiga, companheira de treinos e de vida, Hanna, o melhor presente que a biologia e a vida me deu. Nunca vou ter palavras para te agradecer ou te mostrar o quanto você é uma mulher incrível, o quanto te admiro e torço pelo seu sucesso, pois é o mínimo que você merece. Obrigado por ter me apoiado e ficado comigo em todas as situações e mudanças (todas mesmo). Saiba que nada, inclusive este doutorado, seria possível se você não estivesse ao meu lado. Obrigado por adotar a Grampola comigo e me dar uma família. Te amo muito. Agradeço também à Grampola por ser a gatinha de apoio emocional.

“Você nunca tem completamente seus direitos, individualmente, até que todos tenham direitos.”

Marsha P. Johnson

RESUMO

A interação entre parasitos e hospedeiros desempenha um papel crucial na ecologia e evolução dos organismos envolvidos. Investigar os padrões existentes nessa interação é essencial para uma melhor compreensão dos mecanismos de diversificação e circulação dos parasitos entre diferentes hospedeiros. Estudos anteriores destacaram a importância de identificar padrões na diversificação e amplitude de nicho dos parasitos e patógenos para compreender questões cruciais na ecologia e evolução desses organismos. No entanto, um desafio significativo nesse processo é a correta nomeação das espécies, sendo a taxonomia tradicional muitas vezes limitada por usar apenas dados morfológicos. Nesse contexto, a taxonomia integrativa surge como uma abordagem fundamental, superando tais desafios ao combinar múltiplas evidências, incluindo dados morfológicos, moleculares, filogenéticos e ecológicos. Esta abordagem é particularmente relevante para identificar espécies crípticas, que são morfológicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintas. A precisão na identificação é essencial para estudos ecológicos, evolutivos e de conservação, e a taxonomia integrativa permite estimar a diversidade de parasitos de forma mais precisa do que os métodos tradicionais. A incorporação de técnicas moleculares, como o sequenciamento de DNA, junto com análises morfológicas detalhadas, facilita a resolução de problemas taxonômicos e a descoberta de novas espécies. Além disso, a delimitação de espécies desempenha um papel importante na conservação da biodiversidade e na compreensão da história evolutiva dos parasitos. Diante dessas considerações, o objetivo geral desta tese é desvendar a diversidade e entender os padrões gerais de interação entre parasitos e hospedeiros, com objetivos específicos que abrangem a descrição da diversidade de parasitos em anuros da Mata Atlântica, a síntese da variabilidade morfológica de parasitos pulmonares na região Neotropical e a descrição de espécies (*Rhabdias* spp.) com base em dados morfológicos, moleculares e filogenéticos. Encontramos uma grande diversidade de parasitos de anuros na Mata Atlântica, e observamos que a riqueza de parasitos está relacionada ao tamanho e esforço de amostragem dos hospedeiros, enquanto a prevalência de infecção está ligada ao número de espécies hospedeiras e à abundância dos parasitos. Nossos resultados também ampliaram o conhecimento sobre a diversidade, repertório de hospedeiros e distribuição de *Rhabdias* spp. já conhecidas, além de revelar potenciais novas espécies. A proposta filogenética e a delimitação de espécies trouxeram novidades na organização dos clados e agrupamentos, incluindo espécies não analisadas anteriormente, como *Rhabdias guaianensis*, *Rhabdias matogrossensis* e *Rhabdias waiapi*. Por fim, identificamos e descrevemos duas novas espécies de parasitos pulmonares, *Rhabdias megacephala* e *Rhabdias taquariensis*.

Palavra-chave: Delimitação de espécies; Espécies crípticas; Interações ecológicas; Mata Atlântica; Taxonomia integrativa

ABSTRACT

The interaction between parasites and hosts plays a crucial role in the ecology and evolution of the organisms involved. Investigating the existing patterns in this interaction is essential for a better understanding of the mechanisms of diversification and circulation of parasites among different hosts. Previous studies have highlighted the importance of identifying patterns in the diversification and niche breadth of parasites and pathogens to comprehend crucial issues in the ecology and evolution of these organisms. However, a significant challenge in this process is the accurate species naming, with traditional taxonomy often constrained by using only morphological data. In this context, integrative taxonomy emerges as a fundamental approach, overcoming such challenges by combining multiple lines of evidence, including morphological, molecular, phylogenetic, and ecological data. This approach is particularly relevant for identifying cryptic species, morphologically indistinguishable but genetically distinct. Precision in identification is essential for ecological, evolutionary, and conservation studies, with integrative taxonomy enabling a more precise estimation of parasite diversity than traditional methods. The incorporation of molecular techniques, such as DNA sequencing, along with detailed morphological analyses, facilitates the resolution of taxonomic problems and the discovery of new species. Moreover, species delimitation plays an important role in biodiversity conservation and understanding the evolutionary history of parasites. Considering these considerations, the overall aim of this thesis is to unravel diversity and understand the general patterns of interaction between parasites and hosts, with specific objectives encompassing the description of parasite diversity in Atlantic Forest anurans, the synthesis of morphological variability of lung parasites in the Neotropical region, and the description of species (*Rhabdias* spp.) based on morphological, molecular, and phylogenetic data. We found a significant diversity of anuran parasites in the Atlantic Forest and observed that parasite richness is related to the size and sampling effort of the hosts, while infection prevalence is linked to the number of host species and parasite abundance. Our results also expanded the knowledge of the diversity, host repertoire, and distribution of known *Rhabdias* spp., as well as revealing potential new species. The phylogenetic proposal and species delimitation introduced novelties in the organization of clades and groupings, including species not previously analyzed, such as *Rhabdias guaianensis*, *Rhabdias matogrossensis*, and *Rhabdias waiapi*. Finally, we identified and described two new species of lung parasites, *Rhabdias megacephala* and *Rhabdias taquariensis*.

Keywords: Species delimitation; Cryptic species; Ecological interactions; Atlantic Forest; Integrative taxonomy

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1** – MAP WITH ANURAN SAMPLING SITES IN THE ATLANTIC FOREST, BRAZIL.....26
- FIGURA 2** – PATTERNS OF INTERACTION BETWEEN 49 TAXA OF PARASITES AND THE ANURAN SPECIES FROM DIFFERENT LOCALITIES IN THE ATLANTIC FOREST, BRAZIL. THE GRAPH ILLUSTRATES THE RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE RICHNESS AND AVERAGE ANURAN SIZE AND SAMPLING EFFORT. EACH CIRCLE SHOWS THE SAMPLING EFFORT. THE FITTED LINEAR CURVE (BLUE LINE) AND THE 95% CONFIDENCE INTERVAL (GRAY AREA) ARE ALSO SHOWN.....42
- FIGURA 3** – RELATIONSHIP BETWEEN THE PREVALENCE OF PARASITE SPECIES IN THE HOST COMMUNITY AND THE (A) NUMBER OF HOST SPECIES, AND (B) RELATIONSHIP BETWEEN THE PREVALENCE AND ABUNDANCE OF PARASITE SPECIES IN THE HOST COMMUNITY. THE GRAPHS ON THE LEFT CONSIDER ALL PARASITE SPECIES AND THOSE ON THE RIGHT CONSIDER ONLY PARASITES FOUND IN MORE THAN ONE HOST SPECIES (MULTI-HOST). THE P-VALUES ARE SHOWN IN THE BOTTOM RIGHT CORNER OF EACH GRAPH. THE FITTED LINEAR CURVE (BLUE LINE) AND THE 95% CONFIDENCE INTERVAL (GRAY AREA) ARE ALSO ILLUSTRATED.....44

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1** – IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA DE *Rhabdias* spp. (A) VISÃO GERAL DO CORPO E (B) VISÃO DA BOCA E ESTRUTURAS ACESSÓRIAS DE *Rhabdias* sp.7. (C) VISÃO DO CORPO E (D) VISÃO DA BOCA DE *Rhabdias* sp.8.66

FIGURA 2 – DIVERSIDADE DE <i>Rhabdias</i> spp. COLETADAS, AS LINHAS REPRESENTAM AS INTERAÇÕES COM AS ESPÉCIES DE HOSPEDEIROS ANUROS.....	79
FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>Rhabdias</i> COM O MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA COM OS GENES COI, ITS E 28S CONCATENADOS.....	83
FIGURA 4 – ÁRVORE BAYESIANA GERAL GMYC DE <i>Rhabdias</i> spp. COM DADOS DO GENE CITOCROMO OXIDASE I (COI). OS ASTERISCOS REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES SUPERIORES A 90%. OS RAMOS VERMELHOS MOSTRAM OS 13 <i>CLUSTERS</i> QUE ESTÃO NUMERADOS DE ACORDO COM ANÁLISE. AS <i>Rhabdias</i> SEM ID DO GENBANK SÃO AS ESPÉCIES COLETADAS NESTE ESTUDO (EXCETO <i>R. megacephala</i>).....	90

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – LINE DRAWINGS OF <i>Rhabdias megacephala</i> n. sp. FROM <i>Proceratophrys boiei</i> . A - ENTIRE BODY, LATERAL VIEW. B - ANTERIOR END OF THE BODY, LATERAL VIEW. C - VULVA REGION, LATERAL VIEW. D - CAUDAL END, LATERAL VIEW.....	117
FIGURA 2 – LINE DRAWINGS OF CROSS SECTIONS OF ANTERIOR END AND FACE VIEW OF <i>Rhabdias megacephala</i> n. sp. FROM <i>Proceratophrys boiei</i> . A - ANTERIOR EXTREMITY END FACE VIEW. B - OPTICAL SECTION THROUGH ANTERIOR PART OF BUCCAL CAPSULE. C - OPTICAL SECTION THROUGH POSTERIOR PART OF BUCCAL CAPSULE.....	117
FIGURA 3 – PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION TOPOLOGY RECOVERED BY MAXIMUM LIKELIHOOD (ML) AND BAYESIAN INFERENCE (BI) RHABDIAS SPP. USING PARTIAL COI GENE AND SHOWING THE POSITION OF <i>Rhabdias</i>	

megacephala n. sp. (IN BOLD). *Serpentirhabdias viperidicus* IS THE OUTGROUP. BLACK CIRCLES DEPICT SUPPORT VALUES OF POSTERIOR PROBABILITY <0.90 (BI) AND BOOTSTRAP <70 (ML). IT IS NOTEWORTHY THAT THE TOPOLOGIES ARE IDENTICAL.....121

CAPÍTULO 4

FIGURA 1 – DESENHOS DE *Rhabdias taquariensis* n. sp. DE *Physalaemus albonotatus*. A - CORPO INTEIRO, VISTA LATERAL. B - EXTREMIDADE ANTERIOR DO CORPO, VISTA LATERAL.....138

FIGURA 2 – TOPOLOGIA DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA RECUPERADA POR MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (MV) E INFERÊNCIA BAYESIANA (IB) DE *Rhabdias* spp. USANDO O GENE COI (PARCIAL) E APRESENTANDO A POSIÇÃO DE *Rhabdias taquariensis* n. sp. (EM NEGRITO). *Serpentirhabdias viperidicus* É O GRUPO EXTERNO. OS CÍRCULOS PRETOS REPRESENTAM OS VALORES DE SUPORTE DE *BOOTSTRAP* <70 (MV) E PROBABILIDADE POSTERIOR <0,90 (BI). AS TOPOLOGIAS DE MV E IB SÃO SEMELHANTES.....143

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1 – LIST OF ANURANS COLLECTED IN THE ATLANTIC FOREST. THE FAMILIES OF EACH SPECIES, SAMPLING SITES, SAMPLING EFFORT, AVERAGE BODY SIZE (MM), HABITAT, RICHNESS OF PARASITES, OVERALL PREVALENCE OF PARASITE INFECTION AND TOTAL ABUNDANCE.....	28
TABLE 2 – DIVERSITY OF ANURAN PARASITES IN THE ATLANTIC FOREST. PREVALENCE IN THE HOST COMMUNITY, ABUNDANCE OF EACH PARASITE SPECIES, NUMBER OF ASSOCIATED HOSTS, PHYLOGENETIC AND ECOLOGICAL DIVERSITY INDICES, AND NEW REGISTERS.	34
TABLE 3 – FACTORS RELATED TO PARASITE SPECIES RICHNESS IN ANURANS FROM ATLANTIC FOREST AREAS. THE PHYLOGENETIC GENERALIZED LEAST SQUARES (PGLS) ANALYSIS CONSIDERS THE RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE PREVALENCE AND HOST SIZE, HABIT, AND SAMPLING EFFORT.....	41
TABLE 4 – FACTORS RELATED TO THE PREVALENCE OF ANURAN PARASITES IN THE ATLANTIC FOREST AREA. GENERALIZED LINEAR MODEL (GLM) ANALYSIS CONSIDERING THE CORRELATION OF PARASITE PREVALENCE WITH THE NUMBER OF INFECTED HOSTS, ABUNDANCE, AND PHYLOGENETIC AND ECOLOGICAL INDICES (NRI) FOR ALL PARASITES AND MULTI-HOST PARASITES AT THE COMMUNITY.	43

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Rhabdias</i> NEOTROPICAIS.	68
---	----

TABELA 2 – PARÂMETROS DE INFECÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Rhabdias</i> ASSOCIADAS A ANUROS DA FLORESTA ATLÂNTICA.....	74
TABELA 3 – REPERTÓRIO DE HOSPEDEIROS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE <i>Rhabdias</i> NA REGIÃO NEOTROPICAL.....	76

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 1 – PATTERNS IN PARASITE DIVERSITY AND INTERACTIONS WITH ANURANS FROM THE ATLANTIC FOREST	22
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIAL AND METHODS	25
2.1. SAMPLING SITE	25
2.2. SAMPLING AND IDENTIFICATION OF HOSTS AND PARASITES	26
2.3. PARASITE SPECIES RICHNESS, PREVALENCE, AND PARASITE ABUNDANCE.....	27
2.4. STATISTICAL ANALYSES	28
3. RESULTS.....	33
3.1. PARASITE DIVERSITY	33
3.2. INTERACTION PATTERNS	39
4. DISCUSSION	45
5. CONCLUSION.....	49
REFERENCES.....	50
CAPÍTULO 2 – O MULTIVERSO DAS <i>RHABDIAS</i> (<i>RHABDIASIDAE</i>): DIVERSIDADE, FILOGENIA E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE PARASITOS PULMONARES DE ANUROS	54
RESUMO.....	54
1. INTRODUÇÃO	55
1.1. DIVERSIDADE DE <i>RHABDIAS</i>	57

1.2.	FERRAMENTAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E DELIMITAÇÃO DE <i>RHABDIAS</i>	58
2.	OBJETIVOS	59
3.	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1.	COLETA DE DADOS.....	60
3.2.	MORFOLOGIA DAS ESPÉCIES DE <i>RHABDIAS</i>	61
3.3.	ANÁLISES MOLECULARES	61
3.4.	ALINHAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS	62
3.5.	DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES	64
4.	RESULTADOS	65
4.1.	VARIABILIDADE MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES <i>RHABDIAS</i>	65
4.2.	ANÁLISES MOLECULARES E DIVERGÊNCIA GENÉTICA.....	80
4.3.	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	80
4.4.	DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES COM O GENE COI	89
4.5.	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, REPERTÓRIO DE HOSPEDEIROS E A INFECÇÃO PELAS ESPÉCIES <i>RHABDIAS</i>	92
5.	DISCUSSÃO	94
5.1.	MORFOLOGIA	95
5.2.	ANÁLISES MOLECULARES E DISTÂNCIA GENÉTICA	96
5.3.	PROPOSTA FILOGENÉTICA	98
5.4.	INTEGRANDO DIFERENTES ABORDAGENS	99
	REFERÊNCIAS	104
 CAPÍTULO 3 – A NEW SPECIES OF LUNGWORM FROM THE ATLANTIC FOREST: <i>RHABDIAS MEGACEPHALA</i> N. SP. PARASITE OF THE ENDEMIC ANURAN <i>PROCERATOPHRYS BOIEI</i>.....		
		109

ABSTRACT.....	109
1. INTRODUCTION	110
2. MATERIAL AND METHODS	111
2.1. HOST SAMPLING, PARASITE COLLECTION AND IDENTIFICATION.....	111
2.2. MOLECULAR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS	112
3. RESULTS.....	114
3.1. SYSTEMATICS	114
3.2. REMARKS.....	118
3.3. MOLECULAR ANALYSIS AND PHYLOGENETIC STUDY	120
4. DISCUSSION	121
REFERENCES.....	126
 CAPÍTULO 4 – <i>RHABDIAS TAQUARIENSIS</i> N. SP., EVIDÊNCIAS	
MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DE UMA NOVA ESPÉCIE DE PARASITO	
PULMONAR DE <i>PHYSALAEMUS ALBONOTATUS</i> DO PANTANAL.....	130
RESUMO.....	130
1. INTRODUÇÃO	131
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	132
2.1. COLETA DE HOSPEDEIROS, PARASITA E IDENTIFICAÇÃO	133
2.2. ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA.....	134
3. RESULTADOS	136
3.1. SISTEMÁTICA.....	136
3.2. OBSERVAÇÕES	138
3.3. ANÁLISE MOLECULAR E ESTUDO FILOGENÉTICO	141
4. DISCUSSÃO	143
REFERÊNCIAS.....	149

CONCLUSÃO GERAL.....	147
ANEXOS	149
CAPÍTULO 1	152
SUPPLEMENTARY FIGURE S1 – ACCUMULATION CURVE BASED ON THE TOTAL NUMBER OF COLLECTED HOSTS (SAMPLING EFFORT) OF ANURAN SPECIES IN RELATION TO PARASITE RICHNESS.	152

INTRODUÇÃO GERAL

Ao investigar padrões na interação entre parasitos e hospedeiros, podemos entender melhor os mecanismos de diversificação e circulação dos parasitos entre diferentes hospedeiros (Poulin e Morand, 2000). Identificar padrões na diversificação e amplitude de nicho dos parasitos e patógenos é fundamental para compreender questões cruciais na ecologia e evolução desses organismos (Dobson e Hudson, 1986; Poulin, 1998).

O passo mais fundamental que antecede as pesquisas em ecologia e evolução é inventariar a diversidade, começando por identificar as espécies, determinar onde elas estão e entender como elas interagem (Groom *et al.*, 2006; Wilson, 1988). Esse conhecimento é crucial, pois serve como base para estudos sobre dinâmica populacional, interações ecológicas e processos evolutivos. Entretanto, um grande desafio nesse processo é a correta nomeação das espécies. A taxonomia, com suas dificuldades particulares, especialmente quando lida com organismos morfologicamente semelhantes, pode representar um entrave significativo (Bickford *et al.*, 2007; Hebert *et al.*, 2003). Portanto, a identificação precisa e a classificação adequada das espécies são fundamentais para permitir avanços significativos nas áreas de ecologia e evolução (Godfray e Wheeler, 2004).

Neste contexto, a taxonomia integrativa surgiu como uma abordagem importante para a identificação e classificação de parasitos, não se limitando com os desafios que a taxonomia tradicional, baseada exclusivamente em características morfológicas, frequentemente apresenta (Blasco-Costa e Poulin, 2017; Dayrat, 2005). Este método combina múltiplas linhas de evidência, incluindo dados morfológicos, moleculares, ecológicos e comportamentais, para fornecer uma visão

mais completa e precisa da diversidade parasitária (Poulin *et al.*, 2020; Poulin e Morand, 2000). A aplicação da taxonomia integrativa é particularmente importante para a identificação de espécies crípticas, que são morfologicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintas (Bickford *et al.*, 2007; Dayrat, 2005). A precisão na identificação é essencial para estudos ecológicos e evolutivos, e para a implementação de medidas de conservação (Blasco-Costa e Poulin, 2017; Pérez-del-Olmo *et al.*, 2023). A importância da taxonomia integrativa também é destacada pois auxilia a estimar a diversidade de parasitos, que frequentemente é subestimada devido às limitações dos métodos tradicionais (Poulin *et al.*, 2020).

A incorporação de técnicas moleculares, como o sequenciamento de DNA, junto com análises morfológicas detalhadas, permite a resolução de problemas taxonômicos e a descoberta de, novas espécies (Hebert *et al.*, 2003). Além disso, essa abordagem multidisciplinar facilita a compreensão das interações ecológicas e evolutivas entre parasitos e seus hospedeiros, promovendo uma visão mais precisa da biodiversidade (Poulin e Morand, 2000). Com a taxonomia integrativa é possível construir bases de dados mais robustas e confiáveis (Dayrat, 2005; Padial e Miralles 2010).

A delimitação de espécies é outro tópico importante da biologia evolutiva e é utilizada para conservação da biodiversidade, além disso a delimitação de espécies é importante para a ecologia, taxonomia, filogeografia e outras áreas da biologia (Carstens *et al.*, 2013). A partir de métodos utilizados para a delimitação é possível compreender a história evolutiva de parasitos, determinar limites para a separação de novas linhagens e adquirir conhecimento sobre a diversidade de diversos grupos (Hebert *et al.*, 2003; Knowles e Carstens, 2007). Além disso, biólogos evolucionistas e taxonomistas observaram que as espécies são melhor delimitadas quando

informações sobre a origem e trajetória evolutiva são incluídas, além das características morfológicas (Padial e Miralles, 2010). A combinação de dados morfológicos e moleculares desempenha um papel importante na avaliação da diversidade de parasitos, evitando tanto a subestimação quanto a superestimação de espécies (Poulin e Presswell, 2016).

Considerando as informações apresentadas, o objetivo geral da tese é desvendar a diversidade e procurar entender padrões gerais de interação entre parasitos e hospedeiros. Nossos objetivos específicos são: 1) descrever a diversidade de parasitos encontrados em anuros Mata Atlântica, analisando quais características dos hospedeiros influenciam a riqueza de parasitos e como a prevalência de infecção se relaciona com métricas de especificidade ecológica e filogenética; 2) sintetizar informações sobre a variabilidade morfológica de parasitos pulmonares (*Rhabdias* spp.) da região Neotropical e integrar dados taxonômicos, moleculares e filogenéticos com informações de distribuição geográfica e repertório de hospedeiros. Além de propor uma hipótese filogenética e de delimitação das espécies de *Rhabdias*; e 3) Descrever duas novas espécies (*Rhabdias megacephala* e *Rhabdias taquariensis*) com base em dados morfológicos, moleculares e filogenéticos. A tese está dividida em quatro capítulos em formato de artigo, sendo o primeiro submetido a *Parasitology International*, o segundo com intenção de dividir em outros dois artigos, o terceiro aceito na *Journal of Helminthology*, e o quarto com intenção na revista *Parasitology Research*.

REFERÊNCIAS

- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.
- BLASCO-COSTA, I.; POULIN, R. Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 647–656, 2017.
- CARSTENS, B. C.; PELLETIER, T. A.; REID, N. M.; SATLER, J. D. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy: integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407–415, 2005.
- GODFRAY, H. C. J. Challenges for taxonomy. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 17–19, 2002.
- DOBSON A.P.; HUDSON P.J. Parasites, disease and the structure of ecological communities. **Trends In Ecology & Evolution**, v. 1, n. 1, p. 11-15, 1986.
[http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(86\)90060-1](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(86)90060-1).
- GODFRAY H.C.J. Challenges for taxonomy. **Nature**, v. 417, n. 6884, 17–19, 2002.
<https://doi.org/10.1038/417017a>.
- GROOM M.J.; MEFFE G.K.; CARROLL C.R. Principles of Conservation Biology. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2006.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- KNOWLES, L. L.; CARSTENS, B. C. Delimiting Species without Monophyletic Gene Trees. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 887–895, 2007.
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A. R. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 16, 2010.
- PÉREZ-DEL-OLMO, A.; GEORGIEVA, S.; DALLARÉS, S.; et al. Linking integrative taxonomy and ecology: Diversity and population structure of two platyhelminth parasites (Digenea: Lepidapedidae) of sympatric deep-sea fishes in the Western Mediterranean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 192, p. 103948, 2023.
- POULIN. Large-scale patterns of host use by parasites of freshwater fishes. **Ecology Letters**, v. 1, n. 2, p. 118–128, 1998.
- POULIN, R.; MORAND, S. The Diversity of Parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–293, 2000.
- POULIN, R.; PRESSWELL, B. Taxonomic Quality of Species Descriptions Varies over Time and with the Number of Authors, but Unevenly among Parasitic Taxa. **Systematic Biology**, v. 65, n. 6, p. 1107–1116, 2016.
- POULIN, R.; PRESSWELL, B.; JORGE, F. The state of fish parasite discovery and taxonomy: a critical assessment and a look forward. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 10–11, p. 733–742, 2020.
- WHEELER, Q. D. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 571–583, 2004.
- WILSON E.O. Biodiversity. National Academy Of Sciences, v. 1, n. 1, p. 0- 531, 1988. **National Academies Press**. <http://dx.doi.org/10.17226/989>

CAPÍTULO 1 – PATTERNS IN PARASITE DIVERSITY AND INTERACTIONS WITH ANURANS FROM THE ATLANTIC FOREST

ABSTRACT

Knowledge on parasite-host interactions is essential for understanding factors associated with the ecology and evolution of both groups. Some aspects, such as host size and phylogeny, as well as parasite specificity, are significant predictors that help unveil the parasite-host relationship. Thus, the goals of this study were: (1) to describe parasite diversity in regions of the Atlantic Forest; (2) to analyze which host characteristics can influence parasite richness; and (3) to investigate if the prevalence of parasite infection is related to specificity metrics (ecological and phylogenetic), number of infected hosts and abundance. We identified 49 parasite taxa, classified in the groups Nematoda, Acanthocephala, and Platyhelminthes. Supporting the existing literature, our findings corroborate the relationship between size and parasite richness, further emphasizing the significance of this predictor. Sample effort is also related to parasite richness, possibly due to the fact that a greater sampling effort increases the likelihood of finding more parasite species. We also noted that parasite prevalence in the host community is related to the number of infected host species and parasite abundance, but not to phylogenetic and ecological specificity indices. We conclude that parasite prevalence is associated with infection opportunity, host sampling effort, and high parasite abundance.

Keywords: Prevalence; anurans; community ecology; parasite specificity.

1. INTRODUCTION

The interest in understanding how host-parasite relationships are established and whether they present a predictable pattern arises with studies on parasite diversity in various organisms. Poulin (Poulin, 2007), for instance, observed that there might be laws that could make the abundance, prevalence, and distribution of parasite species among hosts somehow predictable. Since then, numerous studies have arisen to unveil the dynamics of interactions, such as host and parasite characteristics that could result in greater or lower parasite diversity and prevalence (Campião *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*, 2014; Poulin and Morand, 2000).

Patterns in host-parasite relationship can be investigated under different perspectives, the host's and the parasite's. Looking at the host, the understanding of why some species have higher numbers of parasite infection rates than others has always been intriguing. As a result, it has been relatively well studied and some patterns have been identified, with the body size of the host being one of the main predictors in those associations. Several studies report that larger hosts present greater parasite richness and diversity (Campião *et al.*, 2015; Euclides *et al.*, 2022; Kamiya *et al.*, 2014). Also, host's lifestyle is another ecological trait that can potentially influence the diversity and composition of parasite communities (Euclides *et al.*, 2021; Leung and Koprivnikar, 2016, 2019), and in this sense habitat use is crucial because it can determine the opportunity of infection by parasite infective stages (D'Bastiani *et al.*, 2020; Euclides *et al.*, 2021; Sousa and Grosholz, 1991).

From the parasite's perspective, their prevalence is a good proxy of infection success within a host population (Euclides *et al.*, 2022; Poulin, 2007). It is important to note though, that many parasites can infect more than one species of host (Poulin

and Morand, 2000), and different hosts may have variable suitability and resistance. Consequently, multi-host parasite species may exhibit variable infection success rates (or prevalence) across different host species. Thus, the capacity to associate with one or more hosts (specificity) and infection success (prevalence) are two pivotal parasite traits that may be interrelated (Poulin *et al.*, 2006). While these traits are inherent to each parasite species, they can both be influenced by additional factors, which may be either intrinsic (such as parasite transmission mode) or extrinsic (such as environmental conditions) (Krasnov and Poulin, 2010; Sousa and Grosholz, 1991).

One limitation that precludes our full comprehension of parasite species ecology is the limited information of parasite diversity (Dobson *et al.*, 2008). In Brazil, for example, only 8% of anuran diversity has been studied for parasites, which underestimates parasites diversity when we consider the country's high anuran diversity (1,178 species) (Campião *et al.*, 2014, 2016). The study of diversity within this group may be hindered by the difficulty of identification based only on morphological characteristics, by cryptic species, or by the shortage of researchers in the field Poulin (2011, 2014 e Poulin; Morand (2000). So, we question whether we know enough about the patterns involved in host-parasite interactions, or might these patterns vary depending on the increase in datasets of parasite diversity from understudied host communities. Considering this, the present study aimed to: (1) describe the parasite diversity of anurans in a region of the Atlantic Forest; (2) analyze which host characteristics may influence parasite richness; and (3) assess whether the infection prevalence of parasites is related to metrics of specificity (ecological and phylogenetic), number of infected hosts and abundance.

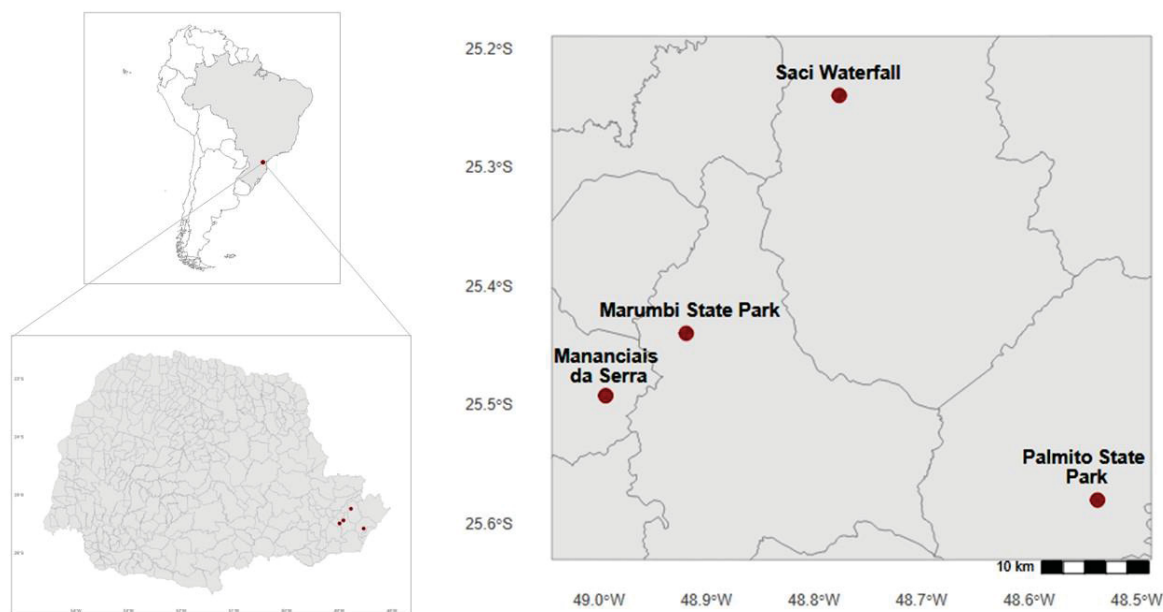
We expect that larger anurans will exhibit higher parasitic richness, due to their exposure to a wider range of microenvironments and potentially greater ability to support a wider variety of parasites. We also expect that terrestrial anurans will exhibit greater parasite diversity as shown in former studies (Euclydes *et al.*, 2021). Considering parasite species, host specificity might be positively related to infection prevalence; i.e. the more specialist the parasite the greater the prevalence. These analyses may provide important insights into the determinants of parasite diversity and infection prevalence within a host community.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. SAMPLING SITE

Samples were collected at four sites in the Atlantic Forest (state of Paraná, Brazil): Mananciais da Serra (25°29'30.1"S, 48°59'34.7"W), Palmito State Park (25°34'46.2"S, 48°32'12.2"W), Marumbi State Park (25°26'42.2"S, 48°54'57.1"W), and Saci waterfall (25°14'20.3"S, 48°46'36.7"W) (Figure 1). This region is classified as a Mixed Ombrophilous Forest, with subtropical climate and lotic and lentic environments that are home to a great diversity of anurans, most of them endemic to the region.

FIGURE 1 – MAP WITH ANURAN SAMPLING SITES IN THE ATLANTIC FOREST, BRAZIL.



FONTE: O autor (2024).

2.2. SAMPLING AND IDENTIFICATION OF HOSTS AND PARASITES

The sampling of anurans was conducted between January 2018 and March 2022, focusing on different studies (D’Bastiani *et al.*, 2020; Dudczak *et al.*, 2022; Euclides *et al.*, 2021; 2022). For this, the visual and auditory search sampling method was employed [54]. After capture, the specimens were transported to the laboratory where the snout-vent length (SVL) was measured, and the anurans were then classified based on literature data and field observations, according to habitat use: arboreal, terrestrial, or semi-aquatic (Hadad *et al.*, 2013). Following the current regulations of the Brazilian Federal Council of Biology (Conselho Federal de Biologia, CFBio, Resolution 308), the animals were euthanized using 4% Lidocaine, and necropsies were performed immediately afterward to collect the parasites, with a longitudinal incision along the anteroposterior axis. All the organs of the

gastrointestinal tract, lungs, kidneys, bladder, and abdominal cavity of the hosts were examined. The nomenclature is up to date according to the American Museum of Natural History [55], and the collected specimens were deposited at the Capão da Imbuia Natural History Museum, in the city of Curitiba, Paraná, Brazil.

The parasites were preserved in 70% ethyl alcohol. Temporary slides of all specimens were produced for their identification. Nematoda species were clarified using Aman's lactophenol, while Acanthocephalans were clarified with lactic acid. For platyhelminthes, the Alcoholic Hydrochloric Acid-Carmine staining (described by Amato and Amato (Amato and Amato, 2010)) was used. These specimens were also preserved in 70% ethyl alcohol and then deposited in the invertebrate collection of the Federal University of Paraná. Parasite nomenclature is in accordance with the following authors: Anderson *et al.* (2000) for the phylum Nematoda, Amin (Amin 1985) for Acanthocephala, Khalil *et al.* (1994) for cestodes, and Jones *et al.* (2005).

2.3. PARASITE SPECIES RICHNESS, PREVALENCE, AND PARASITE ABUNDANCE

Parasite species richness, refers to the total number of parasite species present in a given host. We used parasite infection prevalence as a metric to characterize levels of parasitic infection suggested by Bush *et al.* (1997), but in this study we considered parasite prevalence at a community level since many parasites were found in different host populations. Thus, prevalence of each parasite species was calculated and represents the proportion of infected hosts in the sampled community. Similarly, parasite abundance was recorded and corresponds to the number of parasites in the analyzed parasite community.

2.4. STATISTICAL ANALYSES

We considered anuran species characteristics as predictors of richness, accounting for the evolutionary history of the species. We assessed the phylogenetic signal for anuran size using the phylosignal function, which computes the K-statistic determining whether similarities among species in a set of characteristics are greater than expected by chance, considering the species' phylogenetic tree (Blomberg *et al.*, 2003). Additionally, we calculated the phylogenetic signal for host habits using the phylo.d function, computing the D-value for binary traits (Fritz and Purvis, 2010). A Phylogenetic Generalized Least Squares analysis (PGLS) was used to investigate the influence of size, habitat, and sampling effort of anurans on parasite species richness (Table 1). In this analysis, parasite richness was considered as the response variable, and characteristics associated with hosts (body size and habit) as the predictor variables. The Anura phylogeny (Jetz and Pyron, 2018) was included, as it enables controlling the phylogenetic dependence of the data in the analysis. Host species with low sampling effort, three or fewer individuals collected, or according to the collector's curve (Supplementary figure S1 and figure S2), were removed from the analysis. Hosts that were not identified at the species level, such as *Adenomera* sp. 1 and 2, and *Parathelmatobius segallai* and *Sphaenorhynchus surdus*, which were not included in the Jetz and Pyron phylogeny, were also excluded.

TABLE 1 – LIST OF ANURANS COLLECTED IN THE ATLANTIC FOREST. THE FAMILIES OF EACH SPECIES, SAMPLING SITES, SAMPLING EFFORT, AVERAGE BODY SIZE (MM), HABITAT, RICHNESS OF PARASITES, OVERALL PREVALENCE OF PARASITE INFECTION AND TOTAL ABUNDANCE.

HOST SPECIES	SAMPLING SITE*	SAMPLING EFFORT	SIZE (MM)	HABITAT (continua)	PARASITE RICHNESS
Brachycephalidae					
<i>Ischnocnema henselii</i>	MDS	22	34.8	Terrestrial	6
Bufonidae					
<i>Rhinella ictérica</i>	MDS	3	68	Terrestrial	4
<i>Rhinella ornata</i>	MDS / PSP	31	66.3	Terrestrial	10
Craugastoridae					
<i>Haddadus binotatus</i>	MSP / PSP	3	53.8	Terrestrial	3
Cycloramphidae					
<i>Cycloramphus rhyakonastes</i>	PMS	2	21.8	Terrestrial	1
Hylidae					
<i>Aplastodiscus albosignatus</i>	MDS	18	44.4	Arboreal	3
<i>Boana bischoffi</i>	MDS	28	33.5	Arboreal	11
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	MDS	23	64.8	Arboreal	6
<i>Boana faber</i>	MDS / PSP	19	103.5	Terrestrial	8

HOST SPECIES	SAMPLING SITE*	SAMPLING EFFORT	SIZE (MM)	HABITAT (continuação)	PARASITE RICHNESS
<i>Boana semiguttata</i>	MDS	14	46.4	Arboreal	4
<i>Boana semilineata</i>	MDS	1	44.7	Arboreal	1
<i>Dendropsophus minutus</i>	MDS	2	23.4	Arboreal	0
<i>Nyctimantis bokermanni</i>	PSP	1	53.9	Arboreal	2
<i>Scinax catharinae</i>	MDS	3	44.9	Arboreal	3
<i>Scinax littoralis</i>	MSP	1	34.3	Arboreal	3
<i>Scinax perereca</i>	MDS / MSP	23	39.5	Arboreal	6
<i>Scinax tymbamirim</i>	PSP	10	24.4	Arboreal	2
<i>Sphaenorhynchus surdus</i>	MDS	1	35.2	Arboreal	1
Hylodidae					
<i>Hylodes cardosoi</i>	MSP / SW	9	37.9	Semiaquatic	7
<i>Hylodes heyeri</i>	MDS / MSP	22	43.4	Semiaquatic	8
Leptodactylidae					
<i>Adenomera marmorata</i>	MDS	8	20	Terrestrial	1
<i>Adenomera nana</i>	PSP	1	19	Terrestrial	1
<i>Adenomera</i> sp. 1	PSP	4	20.9	Terrestrial	2

HOST SPECIES	SAMPLING SITE*	SAMPLING EFFORT	SIZE (MM)	HABITAT (conclusão)	PARASITE RICHNESS
<i>Adenomera</i> sp. 2	SW	3	25.8	Terrestrial	0
<i>Leptodactylus latrans</i>	MDS	4	68.4	Terrestrial	7
<i>Leptodactylus notoaktites</i>	MDS	27	41.5	Terrestrial	8
<i>Parathelmatobius segallai</i>	MDS	4	23.5	Terrestrial	2
<i>Physalaemus lateristriga</i>	MDS / SW	3	33.3	Terrestrial	2
<i>Physalaemus maculiventris</i>		11	18.4	Terrestrial	4
<i>Physalaemus olfersii</i>	MDS	3	29.9	Terrestrial	2
<i>Scythrophrys sawayae</i>	MDS	23	18.6	Terrestrial	6
Microhylidae					
<i>Chiasmocleis leucosticta</i>	MDS	1	28.6	Terrestrial	2
Odontophrynidae					
<i>Proceratophrys boiei</i>	MDS / SW	36	54.2	Terrestrial	9

* SW (Saci waterfall), MDS (Mananciais da Serra), MSP (Marumbi State Park), PSP (Palmito State Park)

FONTE: O autor (2024).

Three metrics were used to calculate parasite specificity: number of infected host species, parasite phylogenetic specificity, and parasite ecological specificity. The first metric refers simply to the number of anuran species infected by a certain parasite species. Meanwhile, the latter two metrics, based on the Net Relatedness Index (NRI) among infected host species, allow for a more nuanced assessment of host specificity (Webb, 2000). Host phylogenetic specificity evaluates the degree of evolutionary relatedness among infected host species, while host ecological specificity examines the overlap of ecological traits among these species (Webb, 2000; Webb *et al.*, 2008). The NRI approach enables quantification of the amount of phylogenetic and ecological information within a given community (Webb *et al.*, 2008). These metrics are important for understanding not only the diversity of hosts associated with a parasite but also the patterns of association among hosts and the underlying mechanisms that influence these interactions. The NRI can vary from values below and above 0, and values below -1.96 and above +1.96 are considered, determining whether an organism is more generalized or specialized than expected by chance, respectively (see Euclides *et al.*, 2022). Hence, for each parasite taxon, both phylogenetic and functional specificity metrics were calculated (Euclides *et al.*, 2022; Fecchio *et al.*, 2021).

For phylogenetic specificity, we used the anuran phylogeny Jetz; Pyron (2018), pruned according to the collected species, using the `match.phylo.data` function. From a phylogenetic distance matrix, we assessed specificities through the `ses.mpd` (Standardized Effect Size of Mean Pairwise Distance, MPD) function. To evaluate ecological specificity, we used the size and habitat characteristics of the hosts, which are related to different levels of exposure and infection opportunities, in order to measure and evaluate different species of parasites. To calculate ecological

specificity, an ecological distance matrix generated from the anurans' characteristics (snout-vent length and habitat) was prepared (see Euclides *et al.*, 2022) using the modified Gower's distance (Dray and Dufour, 2007). Subsequently, to obtain the ecological specificity index, the `ses.mpd` function was used with the ecological distance matrix (Pavoine and Bonsall, 2011). The functional characteristics of anurans were tested using the `phylosignal` function.

After obtaining the specificity indexes for each parasite (i.e. the number of infected hosts species, phylogenetic and ecological NRI), we tested the correlation of each of these specificity measures and the infection measures (parasite abundance and prevalence within the community). For this purpose, we examined the correlations between parasite prevalence (our response variable) and the number of hosts associated with a particular parasite, parasite abundance, phylogenetic NRI, and ecological NRI (predictor variables). The sample unit for this analysis was each parasite taxa, and the ran models separate for all parasites (all parasites present in the community) and only multi-host parasites (only parasites that can infect more than one host species). We conducted this analysis for the parasite prevalences in the entire anuran community with a beta regression for rates and proportions (betareg model), which models dependent variables assuming continuous values within a fixed interval (Ferrari and Cribari-Neto, 2004). Before computing the models, the data was normalized with $\log_{10}$ for a better fit. In addition, the models were validated based on the residual distribution, leverage, and Cook's distance inflation factor (Zuur *et al.*, 2009).

We removed individuals belonging to Cosmocercidae from the analysis, as it could bias the results due to the high number of individuals in this group, which likely

include more than one species that could not be identified due to the absence of male individuals. The R software, version 4.2.2 [59], was used for all analyses.

3. RESULTS

3.1. PARASITE DIVERSITY

In total, 412 individuals of 33 anuran species were collected, belonging to nine families: Brachycephalidae, Bufonidae, Craugastoridae, Cycloramphidae, Hylidae, Hylodidae, Leptodactylidae, Microhylidae, and Odontophrynidae. The size of the collected individuals varied between 18.4 mm and 103.5 mm (Table 1). We observed that host body size had no phylogenetic signal in our sample (Z statistic = -0.86). On the other hand, anurans of all habit types showed a phylogenetic signal: arboreal (D estimate: -3.15), terrestrial (D estimate: -0.79), and semi-aquatic (D estimate: -0.45).

Considering all hosts, we found 49 parasite taxa belonging to three phyla: Nematoda, Acanthocephala and Platyhelminthes. The most representative parasite diversity was observed among the Nematoda, 39 taxa. The Nematoda families most frequent were Cosmocercidae ($n = 7$ species), Rhabdiasidae ($n = 10$ species), and Molineidae ($n = 12$ species). In Acanthocephala, four groups were found and the majority of individuals were identified as belonging to the Centrorhynchidae, followed by the *Anuracanthorhynchus* sp. Among the Platyhelminthes, we found parasites from the classes Cestoda and Trematoda. In the Cestoda class, most of the individuals were identified to the genus level (*Cylindrotaenia* sp.). In the Trematoda class, three species of Digenea were identified (two species of *Gorgoderina* and one of *Haematoloechus*) (Table 2).

TABLE 2 – DIVERSITY OF ANURAN PARASITES IN THE ATLANTIC FOREST. PREVALENCE IN THE HOST COMMUNITY, ABUNDANCE OF EACH PARASITE SPECIES, NUMBER OF ASSOCIATED HOSTS, PHYLOGENETIC AND ECOLOGICAL DIVERSITY INDICES, AND NEW REGISTERS.

PARASITES	COMMUNITY PREVALENCE	ABUNDANCE	HOSTS	PHYLOGENETIC NRI	ECOLOGICAL NRI	HOST SPECIES (continua)
Acanthocephala						
<i>Anuracanthorhynchus</i> sp.	2.6%	35	4	0.860	0.781	Nb*, St*, Hc*, Hh*
Centrorhynchidae	4.6%	30	7	-1.395	0.258	Pb, Ri, Ih, Sp, Bf, Bb, Lc, Hb
Annelida						
<i>Dero</i> sp.	0.4%	5	2	0.895	0.148	Bc*, Sp*
Nematoda						
Atractidae						
<i>Schrankiana formosula</i>	4.1%	5817	2	-1.476	-0.248	Ln, Ih
Cosmocercidae						
<i>Aplectana</i> sp.1	0.2%	13	1	-	-	Os
<i>Aplectana macintoshii</i>	3.3%	100	2	0.421	2.478	Ro, Pb
<i>Cosmocerca brasiliensis</i>	10.6%	270	4	-1.227	0.848	Ih, Ln, Pb, Ro
<i>Cosmocerca parva</i>	5.3%	187	9	0.562	-0.384	Bs*, Sl*, Po*, Aa, Bc, Hh, Ro, Sc, Ln
<i>Cosmocerca cf. podicipinus</i>	1.9%	14	2	0.060	-0.610	Bb, Ss

PARASITES	COMMUNITY PREVALENCE	ABUNDANCE	HOSTS	PHYLOGENETIC NRI	ECOLOGICAL NRI	HOST SPECIES (continuação)
<i>Raillietnema simplex</i>	2.4%	2111	2	0.072	-0.899	Bf, Ln*
Kathlaniiidae						
<i>Oxyascaris cf. caudacutus</i>	8.9%	131	3	0.871	0.153	Bb, Bc, Ln
<i>Oxyascaris oxyascaris</i>	2.6%	86	1	-	-	Bf
<i>Oxyascaris</i> sp.	6.7%	71	9	0.544	-0.627	Bs*, Sl*, Ssu*, Sp, Ll, Ro, Hh, Bb, Sc
Molineidae						
<i>Oswaldocruzia mazzai</i>	0.7%	71	1	-	-	Ri
<i>Oswaldocruzia</i> sp.1	2.9%	252	1	-	-	Bf
<i>Oswaldocruzia</i> sp.2	0.2%	2	1	-	-	Asp
<i>Oswaldocruzia</i> sp.3	0.2%	2	1	-	-	Bb
<i>Oswaldocruzia</i> sp.4	0.7%	5	1	-	-	Ss
<i>Oswaldocruzia</i> sp.5	0.7%	50	1	-	-	Bc
<i>Oswaldocruzia</i> sp.6	0.7%	10	1	-	-	Hb
<i>Oswaldocruzia</i> sp.7	1.4%	19	1	-	-	lh
<i>Oswaldocruzia</i> sp.8	4.6%	297	1	-	-	Pb
<i>Oswaldocruzia</i> sp.9	7.2%	539	1	-	-	Ro
<i>Oswaldocruzia</i> sp.10	0.4%	5	1	-	-	Pm*

PARASITES	COMMUNITY PREVALENCE	ABUNDANCE	HOSTS	PHYLOGENETIC NRI	ECOLOGICAL NRI	HOST SPECIES (continuação)
Physalopteridae						
Physalopteridae gen. sp.1	3.1%	38	3	-0.370	-0.774	Ro, Hh, Sp
Physalopteridae gen. sp.2	1.4%	45	2	2.553	-0.912	Bf, Bb
Physalopteridae	1.2%	10	4	-0.307	-0.797	St*, Hc*, Pm*, Pb
Rhabdiasidae						
<i>Rhabdias elegans</i>	4.1%	45	1	-	-	Ln
<i>Rhabdias fueleborni</i>	13.5%	210	8	0.362	-0.043	Bb, Bc, Bs*, lh, LI, Ri, Ro, Sp
<i>Rhabdias</i> sp.1	0.2%	3	1	-	-	Bf
<i>Rhabdias</i> sp.2	2.4%	18	1	-	-	Pb
<i>Rhabdias</i> sp.3	0.2%	1	1	-	-	Cl
<i>Rhabdias</i> sp.4	0.2%	2	1	-	-	Ss
<i>Rhabdias</i> sp.5	0.2%	1	1	-	-	Hc*
<i>Rhabdias</i> sp.6	5.5%	113	1	-	-	Pb
<i>Rhabdias</i> sp.7	1.9%	27	1	-	-	Bb
<i>Rhabdias</i> sp.8	4.3%	67	1	-	-	Hh
Strongyloidae						
<i>Strongyloides</i> sp.1	0.2%	5	1	-	-	Hh*
<i>Strongyloides</i> sp.2	0.2%	61	1	-	-	LI

PARASITES	COMMUNITY PREVALENCE	ABUNDANCE	HOSTS	PHYLOGENETIC NRI	ECOLOGICAL NRI	HOST SPECIES (conclusão)
Cestoda						
<i>Cylindrotaenia</i> sp.	0.4%	32	2	0.111	1.240	Ss*, Ro
Unidentified Cestode larvae	3.8%	104	6	0.076	-0.025	Ro*, Pb*, Aa, Hh, Ss, Bb
Trematoda						
<i>Gorgoderina</i> cf. <i>diaster</i>	0.7%	30	2	-0.479	0.190	Hc*, LI
<i>Gorgoderina</i> cf. <i>darwini</i>	0.4%	8	1	-	-	Hc*
<i>Haematoloechus</i> cf. <i>arequipensis</i>	0.2%	4	1	-	-	LI
Plagiorhynchidae	0.4%	3	1	-	-	Pm*

*Aa: *Aplastodiscus albosignatus*; Am: *Adenomera marmorata*; An: *Adenomera nana*; Asp: *Adenomera* sp. ; Bb: *Boana bischoffi*; Bc: *Bokermannohyla circumdata*; Bf: *Boana faber*; Bs: *Boana semilineata*; Bls: *Boana semilineata*; Cl: *Chiasmocleis leucosticta*; Cr: *Cycloramphus rhyakonastes*; Hb: *Haddadus binotatus*; Hc: *Hylodes cardosoi*; Hh: *Hylodes heyeri*; Ih: *Ischnocnema henselii*; Ll: *Leptodactylus latrans*; Ln: *Leptodactylus notoaktites*; Nb: *Nyctimantis bokermanni*; Pb: *Proceratophrys boiei*; Pl: *Physalaemus lateristriga*; Pm: *Physalaemus maculiventris*; Po: *Physalaemus offersi*; Ps: *Parathelmatobius segallai*; Ri: *Rhinella icterica*; Ro: *Rhinella ornata*; Sc: *Scinax catharinae*; Sl: *Scinax littoralis*; Sp: *Scinax perereca*; Ss: *Scythrophrys sawayae*; Ssu: *Sphaenorhynchus surdus*; St: *Scinax tymbamirim*; *New registers.

FONTE: O autor (2024).

The helminths *Cosmocerca parva* (n = 9), *Rhabdias fuelleborni* (n = 8 associations) and *Cosmocerca brasiliensis* (n = 4) had the highest number of associations with different host species. Three taxa associated with several host species (*Cosmocercidae* gen. n = 28; *Oxyascaris* sp. n = 9; *Oswaldocruzia* sp. n = 8) were also observed. However, each of these taxa may correspond to more than one species, as identification was made only down to the family or genus level. This is due to the presence of only female specimens in the sample — which makes a more precise morphological identification difficult, given the absence of important characteristics for taxonomy that are only presented by males of these families. Considering the entire host community, we observed a higher prevalence of the lung parasite *Rhabdias fuelleborni* (13.5%), and the gut parasites *C. brasiliensis* (10.6%) and *C. parva* (5.3%). For other intestinal parasites, the highest prevalence was observed in species from the Molineidae family (*Oswaldocruzia* sp. 9, 7%) and Kathlaniidae family (*Oxyascaris cf. caudacutus*, 8%). Therefore, despite most anuran hosts presented relatively high parasite infection rates (Table 1), parasite species prevalence were generally low because we considered a wide universe of infection possibilities (all sampled hosts).

3.2. INTERACTION PATTERNS

Species such as *Rhinella ornata*, *Boana bischoffi*, *Boana faber*, *Hylodes heyeri*, *Leptodactylus notoaktites*, and *Proceratophrys boiei* presented the highest parasite richness (Table 1). The same result was observed for the abundance of parasites in anurans, since the same species that exhibited the highest richness also had the highest total abundance of parasites — *Rhinella ornata* (n = 962 parasites),

Boana bischoffi (n = 2108), *Boana faber* (n = 2067), *Bokermannohyla circumdata* (n = 2155), *Scinax perereca* (n = 1546), *Leptodactylus notoaktites* (n = 9147), and *Proceratophrys boiei* (n = 3728). Thus, the larger the anurans, and the more individuals collected, the greater the richness of parasites found (Figure 2), and this was shown in the phylogenetic linear model (Table 3). However, contrary to our expectations, anurans habit did not influence parasite richness (Table 3).

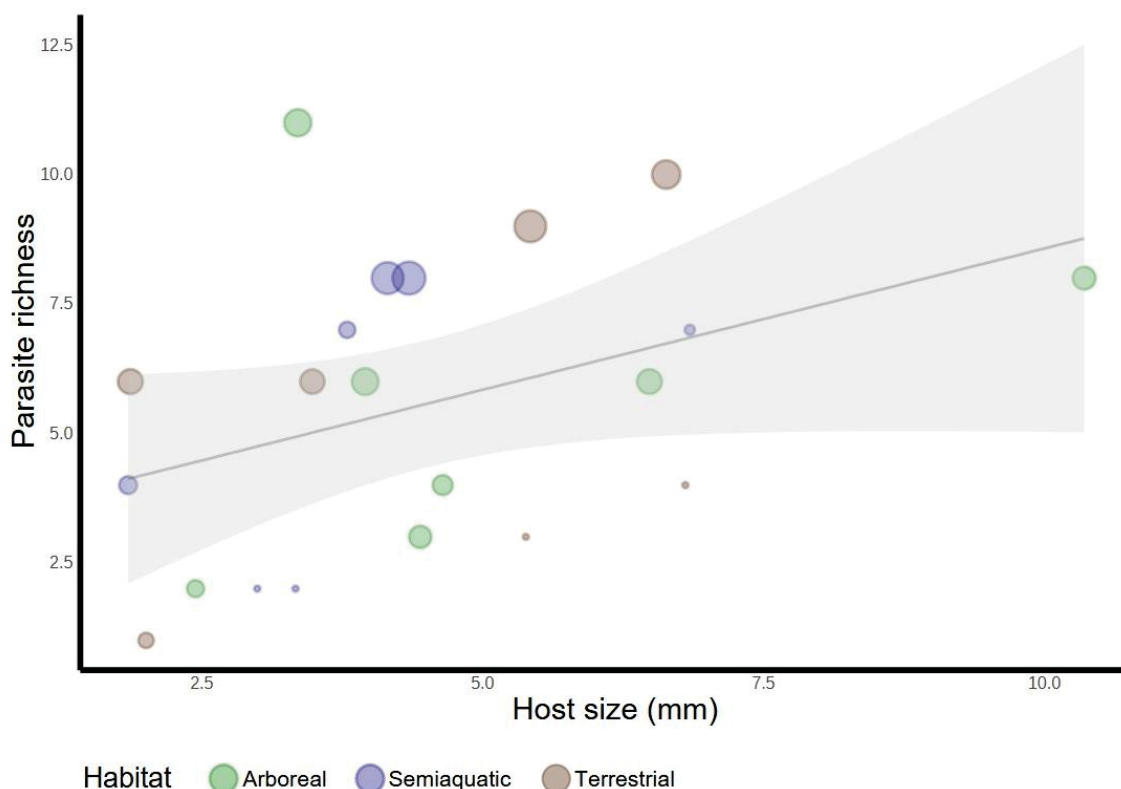
TABLE 3 – FACTORS RELATED TO PARASITE SPECIES RICHNESS IN ANURANS FROM ATLANTIC FOREST AREAS. THE PHYLOGENETIC GENERALIZED LEAST SQUARES (PGLS) ANALYSIS CONSIDERS THE RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE PREVALENCE AND HOST SIZE, HABIT, AND SAMPLING EFFORT.

FACTOR	ESTIMATE	STD.ERROR	T VALUE	PR(> T)
Anuran size	0.502046	0.204788	2.4515	0.026
Sampling effort	0.149648	0.032893	4.5496	0.0003
Arboreal habit	0.185849	1.382882	0.1344	0.8947680
Terrestrial habit	0.476934	0.909467	0.5244	0.6071827
Semiaquatic habit	1.382477	1.521167	0.9088	0.3769284

Bold values indicate statistical significance

FONTE: O autor (2024).

FIGURE 2 – PATTERNS OF INTERACTION BETWEEN 49 TAXA OF PARASITES AND THE ANURAN SPECIES FROM DIFFERENT LOCALITIES IN THE ATLANTIC FOREST, BRAZIL. THE GRAPH ILLUSTRATES THE RELATIONSHIP BETWEEN PARASITE RICHNESS AND AVERAGE ANURAN SIZE AND SAMPLING EFFORT. EACH CIRCLE SHOWS THE SAMPLING EFFORT. THE FITTED LINEAR CURVE (BLUE LINE) AND THE 95% CONFIDENCE INTERVAL (GRAY AREA) ARE ALSO SHOWN.



FONTE: O autor (2024).

The phylogenetic specificity of the host varied between -1.395 and 2.553, with parasite species occurring on phylogenetically close hosts (e.g., *Oxyascaris* cf. *caudacutus*) and parasite species occurring on phylogenetically distant hosts (e.g. *Schrankiana formosula*). The same pattern was observed for ecological host specificity, as some species occurred on ecologically close hosts such as *Aplectana macintoshii* with an ecological NRI of 2.478, while others occurred on ecologically distant hosts such as *Raillietnema simples* with an ecological NRI of -0.025 (Table 2).

The prevalence of parasites in the host community was related to the number of host species associated with each parasite species, and to the abundance of parasites (Table 4), in the analyses accounting for all parasites. This means that the most abundant parasites are apparently also the most generalist, i.e. they make more connections with different host species, achieving greater prevalence among various anuran species within the community (Figure 3). In analyses of only multi-host parasites, we did not observe a relationship between prevalence and the number of hosts. Contrary to our expectations, no parasite metric correlated with the functional and phylogenetic specificity indices.

TABLE 4 – FACTORS RELATED TO THE PREVALENCE OF ANURAN PARASITES IN THE ATLANTIC FOREST AREA. GENERALIZED LINEAR MODEL (GLM) ANALYSIS CONSIDERING THE CORRELATION OF PARASITE PREVALENCE WITH THE NUMBER OF INFECTED HOSTS, ABUNDANCE, AND PHYLOGENETIC AND ECOLOGICAL INDICES (NRI) FOR ALL PARASITES AND MULTI-HOST PARASITES AT THE COMMUNITY.

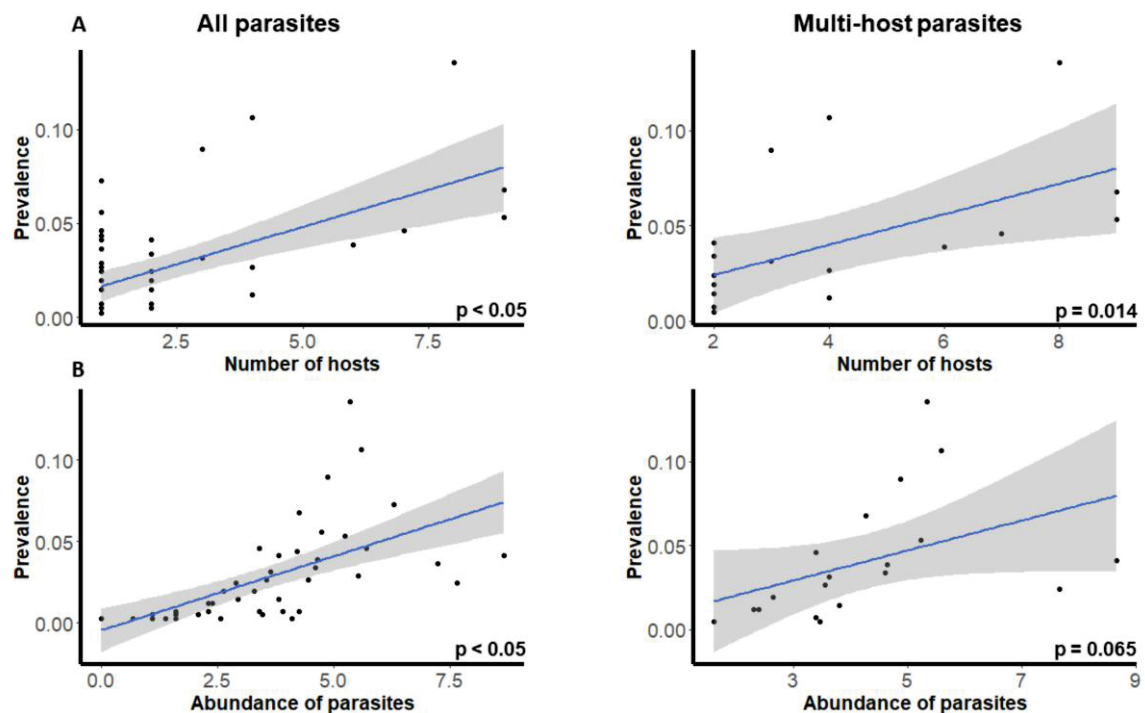
ALL PARASITES	ESTIMATE	STED. ERROR	Z VALUE	P (> Z) (continua)
Community prevalence				
(Intercept)	-5.24334	0.23851	-21.983	<0.05
Nº of host species	0.17481	0.03081	5.673	<0.05
Abundance	0.28276	0.04541	1.625	<0.05
Phylogenetic NRI	0.03184	0.13257	0.240	0.810
Ecological NRI	0.23483	0.14451	6.226	0.104
Multi-host parasites	Estimate	Sted. Error	Z value	p (> Z)
(Intercept)	-5.10057	0.48694	-10.475	<0.05

ALL PARASITES	ESTIMATE	STED. ERROR	Z VALUE	P (> Z) (conclusão)
Abundance	0.22711	0.07824	2.903	<0.05
Phylogenetic NRI	-0.02896	0.14969	-0.193	0.8466
Ecological NRI	0.22513	0.16735	1.345	0.1786

Bold values indicate statistical significance

FONTE: O autor (2024).

FIGURE 3 – RELATIONSHIP BETWEEN THE PREVALENCE OF PARASITE SPECIES IN THE HOST COMMUNITY AND THE (A) NUMBER OF HOST SPECIES, AND (B) RELATIONSHIP BETWEEN THE PREVALENCE AND ABUNDANCE OF PARASITE SPECIES IN THE HOST COMMUNITY. THE GRAPHS ON THE LEFT CONSIDER ALL PARASITE SPECIES AND THOSE ON THE RIGHT CONSIDER ONLY PARASITES FOUND IN MORE THAN ONE HOST SPECIES (MULTI-HOST). THE P-VALUES ARE SHOWN IN THE BOTTOM RIGHT CORNER OF EACH GRAPH. THE FITTED LINEAR CURVE (BLUE LINE) AND THE 95% CONFIDENCE INTERVAL (GRAY AREA) ARE ALSO ILLUSTRATED.



FONTE: O autor (2024).

4. DISCUSSION

This study revealed a great diversity of parasites associated with 33 species of anurans, contributing to our knowledge of the parasite diversity of anurans in the Atlantic Forest. Knowledge of parasitic fauna is significant because these organisms are known as ecosystem engineers and play crucial roles to the functioning and maintenance of natural ecosystems (Hatcher *et al.*, 2012; Lymbery and Smit, 2023). The results obtained here indicate that the richness of parasites is associated with the size and sampling effort of the hosts. As for parasites, the prevalence of infection was related to the number of host species that parasites are associated with, and to their abundance.

Host body size is a known predictor of parasite diversity in the literature and is essential for understanding species richness patterns (Kamiya *et al.*, 2014; Poulin, 2004a). Size is a characteristic associated with various aspects of host history, such as ecology, spatial distribution, and abundance (Poulin, 1999; Poulin and Justine, 2008). The observed results show that the largest hosts had the highest parasite richness (Figure 2). The anuran species *Rhinella ornata*, *Boana faber* and *Leptodactylus latrans* had the largest body size among the collected species, and consequently had the highest number of parasite species (Table 1). This pattern can be explained by the fact that larger hosts have a larger contact surface, which in turn provides a higher chance of interaction during infective stages of the parasite (Campião *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*, 2014; Poulin, 1998). Larger hosts also live longer (allowing longer exposure to different parasites (Campião *et al.*, 2015)) and consume more food (facilitating infection by trophic parasites), thus increasing the likelihood of being parasitized by a greater diversity and quantity of parasites

(Kamiya *et al.*, 2014). Our results corroborate the findings of other studies (Campiã *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*, 2014; Poulin, 1998, 1999).

The lack of correlation between parasite richness and host habit was an unexpected result. Host habitats can limit infection for different phyla or species of parasites (Johnson *et al.*, 2016). For example, hosts that spend more time in contact with the soil would be more likely to be infected by a greater number of parasites, since most of the parasite species we found are nematodes whose infective forms are associated with the soil (Anderson, 2000). However, some arboreal hosts (Hadad *et al.*, 2013), such as *Boana bischoffi* and *Boana faber*, had high richness of directly transmitted nematodes. This may be due to, despite being mainly arboreous, these hosts generally occupy other habitats; during reproduction, for example, the individuals may spend relatively long periods in contact with the soil, which can increase the chance of infection by parasites present in this environment (Euclides *et al.*, 2021). This wider use of habitat may help to understand the lack of correlation between habitat use and parasite richness, since previous findings show a significant relation to habitat use and parasite diversity (Euclides *et al.*, 2021).

Considering that our analyses encompassed the entire sampled community, parasite community prevalence values were relatively low for each parasite taxa, and the parasites with more associations with different anuran species were also the most prevalent. This pattern was clearly observed in the nematode species *Rhabdias fuelleborni*, *Cosmocerca brasiliensis* and *Cosmocerca parva* (Table 2). These results are opposite to the dilution effect hypothesis, which states that the more diverse a host community is, the lower transmission success of the parasite in different hosts will result in lower prevalence (Civitello *et al.*, 2015; Johnson and Hoverman, 2012). This is because the transmission efficiency of some parasites may

be associated with their ability to circumvent the host's immune system (Gupta, 2005). However, the observed pattern here can be explained by the fact that as parasites associate with more hosts, more infective stages are released into the environment, consequently infecting more hosts (Keesing *et al.*, 2006). The high number of parasitized individuals in the community can also increase the opportunity for contact with a wide range of hosts (regardless of species), increasing prevalence.

We observed a correlation between prevalence and parasite abundance, and this was consistent in all models (Table 4). Morand and Guégan (2000) and Hellgren *et al.* (2009) also found a relationship between the prevalence and abundance of parasites, associating this pattern with high rates of reproduction, dispersal, and establishment among the hosts. The access and permanence of a parasite in different host species can increase the dispersal and, consequently, the probability of this parasite to colonize other hosts (Hellgren *et al.*, 2009). The relationship between the prevalence of parasites and their abundance could also be the result of more opportunities (D'Bastiani *et al.*, 2020). Due to the high number of parasites, the probability of contact with a wide range of hosts can also increase, thus raising their prevalence. This aspect may also be a reflection of stochastic processes, which ultimately increase the encounter probability (Budischak *et al.*, 2016). This corroborates that parasite's distribution and abundance can be determined by processes such as passive dispersal, ecological drift, and random interactions between parasites and hosts (Hubbell, 2001; Poulin, 2004b).

We did not observe any correlation between the parasitic metrics we used and the functional and ecological specificity indices. We expected that parasite prevalence would be higher in hosts that were closely related, either phylogenetically or ecologically. Unlike the findings of Fecchio *et al.* (2021) and Euclides *et al.*

(2022), which reported a correlation between parasite prevalence and the hosts' ecological NRI, we observed that ecological traits of hosts were not related to parasite prevalence. Further research is needed, as variation in specificity remains a challenge for parasitology and may suggest that ecological aspects of hosts are important in parasitic infection (Fecchio *et al.*, 2021).

The lack of specific identification for some taxa is a limitation in our study. Many species we encountered were discerned as unique taxonomic entities but remained unassigned to a species, such as *Oswaldocruzia* spp. and *Rhabdias* spp., which may potentially represent new species. Similarly, certain taxa were only identified to the family level, such as the nematodes of Physalopteridae and acanthocephalans of Centrorhynchidae, which were found in larval stages. These taxa may either comprise multiple species or each represent a generalist species, given the larval stages of parasites with trophic transmission tend to inhabit numerous hosts (Bellay *et al.*, 2013; Benesh, 2016; Lamberton *et al.*, 2010), which can be potentialized by the opportunistic foraging habits of anurans. This lack of taxonomic resolution is a common challenge in parasitological studies (Poulin and Leung, 2010), which can potentially lead to an underestimation of parasite diversity and an overestimation of parasite specificity metrics in our study. Indeed, nematodes of Cosmocercidae, which were highly prevalent and abundant, were removed from all analysis due to their considerable morphological variability that indicated the existence of different species within the group. We highlight that the lack of taxonomic resolution poses challenges to parasite diversity knowledge and further ecological analyses, but it does not undermine the overall validity and significance of the results and the data itself.

5. CONCLUSION

Here we contribute with a comprehensive dataset of parasite diversity in anurans from the Brazilian Atlantic Forest, and the patterns observed in their interactions with hosts. We concluded that host characteristics, such as body size, are important determinants of parasite species richness. We also conclude that parasite prevalence may be associated with infection opportunity, host sampling effort, and high parasite abundance. Most of our findings corroborate patterns observed in other studies. However, we also observed some unexpected patterns. For instance, the absence of correlation between parasite richness and host habit or the lack of a dilution effect when observing that parasites with more associations are the most prevalent. Thus, we believe that adding data and analyzing different scales can still unveil unexpected patterns in host-parasite relationships.

REFERENCES

- AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. p. 26, 2010.
- AMIN, O. M. Classification of the Acanthocephala. In: Crompton, D.W.T. & Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of Acanthocephala*. **Cambridge: Cambridge University Press**, p. 27–72, 1985.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. 2nd ed ed. Wallingford, Oxon, UK; New York, NY: CABI Pub, 2000.
- ANDERSON R.C.; CHABAUD A.G.; WILLMOTT S. Commonwealth Institute of Helminthology (eds), **Keys to the nematode parasites of vertebrates**. Archival volume. CABI, Wallingford. 2009.
- BELLAY, S.; DE OLIVEIRA, E. F.; ALMEIDA-NETO, M.; et al. Developmental Stage of Parasites Influences the Structure of Fish-Parasite Networks. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75710, 2013.
- BENESH, D. P. Autonomy and integration in complex parasite life cycles. **Parasitology**, v. 143, n. 14, p. 1824–1846, 2016.
- BLOMBERG, S. P.; GARLAND, T.; IVES, A. R. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. **Evolution**, v. 57, n. 4, p. 717, 2003.
- BUDISCHAK, S. A.; HOBERG, E. P.; ABRAMS, A.; JOLLES, A. E.; EZENWA, V. O. Experimental insight into the process of parasite community assembly. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 5, p. 1222–1233, 2016.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575, 1997.
- CAMPIÃO, K. M.; MORAIS, D. H.; DIAS, O. T.; et al. Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. **Zootaxa**, v. 3843, n. 1, p. 1, 2014.
- CAMPIÃO, K. M.; RIBAS, A. C. DE A.; MORAIS, D. H.; SILVA, R. J. DA; TAVARES, L. E. R. How Many Parasites Species a Frog Might Have? Determinants of Parasite Diversity in South American Anurans. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140577, 2015.
- CAMPIÃO, K. M.; DA SILVA, I. C. O.; DALAZEN, G. T.; PAIVA, F.; TAVARES, L. E. R. Helminth Parasites of 11 Anuran Species from the Pantanal Wetland, Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 92–100, 2016.
- CIVITELLO, D. J.; COHEN, J.; FATIMA, H.; et al. Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 8667–8671, 2015.
- D'BASTIANI, E.; CAMPIÃO, K. M.; BOEGER, W. A.; ARAÚJO, S. B. L. The role of ecological opportunity in shaping host–parasite networks. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1452–1460, 2020.
- DOBSON, A.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M.; HECHINGER, R. F.; JETZ, W. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. supplement_1, p. 11482–11489, 2008.
- DRAY, S.; DUFOUR, A.-B. The **ade4** Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. **Journal of Statistical Software**, v. 22, n. 4, 2007. Disponível em: <<http://www.jstatsoft.org/v22/i04/>>. Acesso em: 7/2/2023.
- DUDCZAK, A. C.; DE LA TORRE, G. M.; EUCLYDES, L.; CAMPIÃO, K. M. The roles of anurans in antagonistic networks are explained by life-habit and body-size. **Integrative Zoology**, v. 17, n. 4, p. 530–542, 2022.

- EUCLYDES, L. Anuran's habitat use drives the functional diversity of nematode parasite communities. **Parasitol Research**, v.120, p. 993–1001, 2021.
- EUCLYDES, L.; DE LA TORRE, G. M.; DUDCZAK, A. C.; MELO, F. T. DE V.; CAMPIÃO, K. M. Ecological specificity explains infection parameters of anuran parasites at different scales. **Parasitology**, p. 1–8, 2022.
- FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; BELL, J. A.; et al. Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 9, p. 719–728, 2021.
- FERRARI, S.; CRIBARI-NETO, F. Beta Regression for Modelling Rates and Proportions. **Journal of Applied Statistics**, v. 31, n. 7, p. 799–815, 2004.
- FRITZ, S. A.; PURVIS, A. Selectivity in Mammalian Extinction Risk and Threat Types: a New Measure of Phylogenetic Signal Strength in Binary Traits. **Conservation Biology**, v. 24, n. 4, p. 1042–1051, 2010.
- FROST D.R. Amphibian Species of the World 2024: an Online Reference. Version 6.2. Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001. Acessado em 28 sep. 2023.
- GUPTA, S. Parasite immune escape: new views into host–parasite interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 428–433, 2005.
- HADAD, C.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C.; et al. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia / Guide to the amphibians of the Atlantic Forest: diversity and biology**. 2013.
- HATCHER, M. J.; DICK, J. T.; DUNN, A. M. Diverse effects of parasites in ecosystems: linking interdependent processes. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 10, n. 4, p. 186–194, 2012.
- HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J.; BENSCH, S. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. **Ecology**, v. 90, n. 10, p. 2840–2849, 2009.
- HUBBELL, S. P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 2001.
- JETZ, W.; PYRON, R. A. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 5, p. 850–858, 2018.
- JOHNSON, P. T. J.; HOVERMAN, J. T. Parasite diversity and coinfection determine pathogen infection success and host fitness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 9006–9011, 2012.
- JOHNSON, P. T. J.; WOOD, C. L.; JOSEPH, M. B.; et al. Habitat heterogeneity drives the host-diversity-begets-parasite-diversity relationship: evidence from experimental and field studies. **Ecology Letters**, v. 19, n. 7, p. 752–761, 2016.
- KAMIYA, T.; O'DWYER, K.; NAKAGAWA, S.; POULIN, R. What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts: Determinants of parasite species richness. **Biological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 123–134, 2014.
- KEESING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology Letters**, v. 9, n. 4, p. 485–498, 2006.
- KHALIL L.F.; JONES A.; BRAY R.A. Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. Wallingford: CAB International. 1994.
- KRASNOV, B.; POULIN, R. Ecological properties of a parasite: species-specific stability and geographical variation. 2010.

- LAMBERTON, P. H. L.; NORTON, A. J.; WEBSTER, J. P. Propagule Behavior and Parasite Transmission. **Encyclopedia of Animal Behavior**, p. 786–791, 2010.
- LEUNG, T. L. F.; KOPRIVNIKAR, J. Nematode parasite diversity in birds: the role of host ecology, life history and migration. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1471–1480, 2016.
- LEUNG, T. L. F.; KOPRIVNIKAR, J. Your infections are what you eat: How host ecology shapes the helminth parasite communities of lizards. **Journal of Animal Ecology**, v. 88, n. 3, p. 416–426, 2019.
- LYMBERG, A. J.; SMIT, N. J. Conservation of parasites: A primer. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 21, p. 255–263, 2023.
- MORAND, S.; GUÉGAN, J.-F. Distribution and abundance of parasite nematodes: ecological specialisation, phylogenetic constraint or simply epidemiology? **Oikos**, v. 88, n. 3, p. 563–573, 2000.
- PAVOINE, S.; BONSALE, M. B. Measuring biodiversity to explain community assembly: a unified approach. **Biological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 792–812, 2011.
- POULIN, R. Large-scale patterns of host use by parasites of freshwater fishes. **Ecology Letters**, v. 1, n. 2, p. 118–128, 1998.
- POULIN, R. Body size vs abundance among parasite species: positive relationships? **Ecography**, v. 22, n. 3, p. 246–250, 1999.
- POULIN, R. Parasites and the neutral theory of biodiversity. **Ecography**, v. 27, n. 1, p. 119–123, 2004a.
- POULIN, R. Macroecological patterns of species richness in parasite assemblages. **Basic and Applied Ecology**, v. 5, n. 5, p. 423–434, 2004b.
- POULIN, R. Are there general laws in parasite ecology? **Parasitology**, v. 134, n. 6, p. 763–776, 2007.
- POULIN, R. Host specificity in phylogenetic and geographic space. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, 2011.
- POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 9, p. 581–589, 2014.
- POULIN, R.; JUSTINE, J.-L. Linking species abundance distributions and body size in monogenean communities. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 187–193, 2008.
- POULIN, R.; KRASNOV, B. R.; MORAND, S. Patterns of host specificity in parasites exploiting small mammals. In: S. Morand; B. R. Krasnov; R. Poulin; **Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management**. p.233–256, 2006. Tokyo: Springer Japan. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-4-431-36025-4_13>.
- POULIN, R.; LEUNG, T. L. F. Taxonomic resolution in parasite community studies: are things getting worse? **Parasitology**, v. 137, n. 13, p. 1967–1973, 2010.
- POULIN, R.; MORAND, S. The Diversity of Parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–293, 2000.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022. <<https://www.R-project.org/>>. Acessado em 28 aug. 2023.
- SOUSA, W. P.; GROSHOLZ, E. D. The influence of habitat structure on the transmission of parasites. In: S. S. Bell; E. D. McCoy; H. R. Mushinsky (Orgs.); **Habitat Structure**. p.300–324, 1991. Dordrecht: Springer Netherlands. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-3076-9_15>. Acesso em: 5/5/2024.

WEBB, C. O. Exploring the Phylogenetic Structure of Ecological Communities: An Example for Rain Forest Trees. **The American Naturalist** v. 156, n. 2, 2000.

WEBB, C. O.; ACKERLY, D. D.; KEMBEL, S. W. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2098–2100, 2008.

ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; WALKER, N.; SAVELIEV, A. A.; SMITH, G. M. **Mixed effects models and extensions in ecology with R**. New York, NY: Springer New York, 2009.

**CAPÍTULO 2 – O MULTIVERSO DAS *Rhabdias* (RHABDIASIDAE):
DIVERSIDADE, FILOGENIA E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE PARASITOS
PULMONARES DE ANUROS**

RESUMO

Identificar e distinguir organismos têm sido um grande desafio desde os primórdios científicos. A existência de espécies crípticas e a escassez de especialistas dificultam ainda mais o avanço em identificações, principalmente de parasitos, como Nematoda, que tem algumas características morfológicas uniformes, o que pode impactar negativamente estudos de filogenia e ecologia. *Rhabdias* é um gênero de Nematoda que parasita pulmões e exemplifica bem esta dificuldade de diferenciar espécies unicamente pela morfologia. O objetivo deste estudo é descrever a diversidade de parasitos pulmonares (*Rhabdias* spp.) de anuros da Mata Atlântica e sintetizar sua variabilidade morfológica na região Neotropical; integrar informações taxonômicas e geográficas; propor uma hipótese filogenética e delimitar as espécies. Realizamos análises morfológicas, sequenciamos dos genes Citocromo c Oxidase I (COI) e *Internal Transcribed Spacer* (ITS), e realizamos um levantamento de dados bibliográficos sobre a distribuição e uso de hospedeiros por de espécies de *Rhabdias*. Juntamente com dados da literatura e do Genbank, propomos uma filogenia com três genes (COI, ITS e 28S) e realizamos a delimitação de espécies do grupo apenas com o COI. Identificamos morfológicamente 10 espécies de *Rhabdias*, incluindo algumas já conhecidas, como *Rhabdias fuelleborni* e *Rhabdias elegans*. Quando utilizamos dados moleculares e filogenéticos observamos que algumas das espécies que identificamos inicialmente como *Rhabdias fuelleborni* (utilizando apenas com dados morfométricos), na realidade podem ser uma nova espécie que forma um complexo de espécies, podendo ser explicado por apresentar uma diversidade críptica. Observamos que algumas *Rhabdias* spp. podem apresentar plasticidade fenotípica, pois a morfologia é distinta, mas os dados moleculares são idênticos. Destacamos a importância de combinar dados diversos e o potencial do gene COI para detectar espécies crípticas. A síntese das informações sobre *Rhabdias* spp. revela a necessidade de colocar e adicionar mais dados, contribuindo para entender melhor este grupo.

Palavras-chave: Espécies crípticas; Plasticidade fenotípica; Citocromo c Oxidase I; Variabilidade morfológica; Taxonomia

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, identificar e distinguir os organismos tem sido um dos grandes desafios de naturalistas, taxonomistas e sistematas (Mayr, 1969). Uma das principais causas que podem dificultar a identificação e distinção das espécies, é o uso unicamente de características morfológicas para descrever as espécies (Bickford *et al.*, 2007). Além disso, a existência de espécies crípticas e a escassez de pesquisadores especialistas na área, podem dificultar o avanço do conhecimento da diversidade de organismos (Poulin *et al.*, 2020). Organismos com modo de vida parasitário exemplificam bem essa problemáticas taxonômicas (Poulin e Morand, 2000), são organismos crípticos e, por vezes, as novidades evolutivas associadas ao modo de vida resultam em uniformização de algumas características morfológicas (Blasco-Costa e Poulin, 2017). A limitação que existe para a identificação de grupos com características morfológicas uniformes, pode impactar estudos importantes sobre filogenia e ecologia comprometendo nossa compreensão da biodiversidade e das interações nos ecossistemas (Hebert *et al.*, 2003; Wheeler, 2004).

As identificações morfológicas de parasitos do filo Nematoda são baseadas em características como a morfologia cefálica, presença e quantidade de lábios assim como presença ou não de estruturas anexas como as papilas ou espinhos (Anderson, 2000). Para alguns grupos, estruturas de indivíduos machos são essenciais para a identificação das espécies como espículo, gubernáculo, plectanas e papilas, além de outras medidas morfométricas (Bursey e Goldberg, 2007; Bursey *et al.*, 2015; Kuzmin, 2013). Entretanto, apenas o uso destas características

morfológicas pode dificultar a distinção de linhagens das espécies e dificultando a resolução dos problemas taxonômicos (Kuzmin, 2013).

Quando falamos em identificação de parasitas, algumas espécies possuem descrições mais antigas e são conhecidas exatamente a partir dessas primeiras descrições como as feitas por Travassos (1926) para a fauna helmintológica brasileira. Em alguns casos as descrições antigas (século XX) podem não contemplar detalhes morfológicos devido à precisão limitada dos equipamentos de observação disponíveis na época. Essa limitação tecnológica resultou em descrições que podem dificultar a comparação com trabalhos de identificação mais recentes, que se beneficiam de tecnologias avançadas, como microscopia eletrônica e técnicas de imagem digital (Kuzmin *et al.*, 2015a). Além disso, podem existir diversas espécies crípticas que podem não ser identificadas apenas pela diferenciação morfológica, e que têm implicações negativas para estimar sua diversidade (Bickford *et al.*, 2007; Hebert *et al.*, 2003; Padial e Miralles, 2010).

Identificar espécies crípticas corretamente é importante para a biologia evolutiva e conservação de espécies, visto que cada dia são identificadas mais espécies a partir das análises de espécies crípticas (Bickford *et al.*, 2007; Singhal *et al.*, 2018). Consequentemente, a ausência de conhecimento dessas espécies crípticas pode implicar em perdas significativas de diversidade, ou causar confusões, subestimando ou superestimando a diversidade (Struck *et al.*, 2018). Além disso, existem alguns desafios na hora de distinguir/delimitar espécies, como o quanto de divergência é necessário para diferenciar de forma satisfatória, e consequentemente nomear as linhagens de interesse? Esta questão pode acabar tornando esse processo arbitrário (Singhal *et al.*, 2018).

1.1. DIVERSIDADE DE *Rhabdias*

Um grupo que descreve muito bem a dificuldade em diferenciar espécies através unicamente da morfologia, por apresentar características uniformes são as espécies de *Rhabdias*. *Rhabdias* são parasitos pulmonares de anuros e alguns répteis, presentes em todos os continentes com exceção da Antártica (Kuzmin *et al.*, 2022; Müller *et al.*, 2018). Este grupo tem uma característica interessante relacionado ao seu ciclo de vida: a maioria das espécies de *Rhabdias* tem um ciclo de vida heterogônico, composto por uma fase parasito (fêmeas) e uma fase de vida livre (machos) (Kuzmin, 2013; Melo *et al.*, 2016). Apenas as fêmeas são encontradas nos hospedeiros, então todas as descrições são baseadas nas características de fêmeas (Kuzmin, 2013; Müller *et al.*, 2018). A fase parasita é hermafrodita e produz ovos que são levados ao intestino onde é eliminado no ambiente através das fezes. No ambiente os ovos eclodem iniciando sua fase de vida livre, onde existem formas infectantes que parasitam os hospedeiros através da penetração na pele e se estabelecem nos pulmões se alimentando de sangue (Baker, 1979; Langford e Janovy, 2009).

Considerando o ciclo de vida com fase de vida livre e transmissão através do contato com o solo, as características morfológicas e ecológicas dos hospedeiros podem representar facilitadores ou limitantes no sucesso de infecção (Campião *et al.*, 2015; Euclides *et al.*, 2021; Kamiya *et al.*, 2014). Espécies de *Rhabdias* têm sido encontradas em uma ampla gama de anuros, sendo conhecidos cerca de 50 hospedeiros parasitados (Campião *et al.*, 2014; Kuzmin, 2013; Müller *et al.*, 2023). Entre os hospedeiros infectados podemos observar diversas espécies pertencentes a diferentes famílias e linhagens evolutivas, de forma que ainda não é bem

compreendido se existem determinadas linhagens ou características dos hospedeiros associadas à infecção pelas espécies de *Rhabdias* (Poulin e Keeney 2008).

Atualmente existem mais de 93 espécies de *Rhabdias* conhecidas, sendo 23 na região neotropical, e 13 no Brasil (Euclydes *et. al.* 2024 *in press*; Müller *et. al.* 2023). Considerando a diversidade de espécies hospedeiras na região Neotropical e especialmente no Brasil, o número de espécies deve ser muito maior. Além disso, a diversidade pode ser substancialmente maior devido à uniformidade das características morfológicas utilizadas para identificação e às descrições taxonômicas históricas e existência de espécies crípticas. Nesse sentido, a inclusão de ferramentas e dados moleculares e filogenéticos permite uma avaliação mais robusta e precisa, melhorando significativamente as estimativas de diversidade.

1.2. FERRAMENTAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E DELIMITAÇÃO DE *Rhabdias*

O surgimento da Biologia Molecular, possibilitou melhorar a resolução taxonômica e encontrar espécies crípticas (Carstens *et al.*, 2013). Nos anos 90 e início do século XXI muitas limitações foram começando a ter uma resolução devido a biologia molecular. Com a utilização dos dados genéticos dos organismos, a primeira evidência apontada é que ao se tratar de delimitação de espécies, modificações genéticas são obrigatórias, pois é a partir dessas modificações que são determinadas as modificações morfológicas, ecológicas e fisiológicas (De Queiroz, 2007; Rannala e Yang, 2020).

A incorporação de dados moleculares está ajudando a desvendar a diversidade de parasitos pulmonares (Müller *et al.*, 2018; Tkach *et al.*, 2014). O uso de diferentes dados e análises (moleculares, morfológicos, filogenia, ecologia, taxonomia), têm auxiliado na problemática da identificação e delimitação. Genes como Citocromo oxidase I (COI), 28S, ITS, 18S e 12S (mitocondrial e 4 nucleares), estão sendo utilizados com sucesso em parasitos, especialmente em *Rhabdias* (Dare *et al.*, 2008; Langford e Janovy, 2013; Tkach *et al.*, 2014). O COI foi estabelecido como DNA *barcoding* universal (Hebert *et al.*, 2003). A escolha do COI foi devida a sua ampla aplicação na identificação e delimitação de diferentes grupos taxonômicos, inclusive grupos mais complexos (Frézal e Leblois, 2008).

2. OBJETIVOS

Nossos objetivos são 1) Descrever espécies de parasitos pulmonares (*Rhabdias spp.*) de anuros da Mata Atlântica com dados morfológicos e moleculares; 2) Sintetizar e variabilidade morfológica das espécies de *Rhabdias* na região Neotropical; 3) Integrar informações taxonômicas aos dados de distribuição geográfica e repertório de hospedeiros associados as espécies de *Rhabdias* na região Neotropical; 4) Propor uma hipótese filogenética e delimitar as espécies de *Rhabdias*, com base em dados coletados e de dados provenientes de bancos de dados moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DE DADOS

Realizamos um levantamento na literatura abrangendo as espécies de *Rhabdias* encontradas na região Neotropical (Tabela 1). Utilizamos os buscadores *Google Scholar* e *Pubmed* as palavras chave *Rhabdias*, *description of Rhabdias* e *anuran parasites*. A partir dos artigos encontrados, reunimos informações sobre a morfologia, distribuição geográfica e repertório de hospedeiros para cada espécie.

Realizamos também coletas de campo na unidade de conservação Mananciais da Serra (25°29'30.1"S, 48°59'34.7"O), no Parque Estadual Pico Marumbi (25°26'42.2"S, 48°54'57.1"O), Parque Estadual do Palmito (25°34'46.2"S, 48°32'12.2"O) e Cachoeira do Saci (25°14'20.3"S, 48°46'36.7"O). Para a coleta dos anuros utilizamos a técnica de busca visual e auditiva (Crump e Scott Jr., 1994). Coletamos 17 espécies de anuros, levamos os anuros coletados imediatamente para o laboratório, no qual eutanasiamos com Lidocaína 4%, seguindo a legislação vigente no Conselho Federal de Biologia (CFBIO - Resolução 308). Realizamos as necropsias com abertura de uma incisão longitudinal no eixo antero posterior para a coleta dos parasitos. Examinamos principalmente os pulmões, e também todos os órgãos do trato gastrointestinal, rins, bexiga e cavidade abdominal dos hospedeiros para estudos futuros. Todos os espécimes de anuros foram fixados e depositados no Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brasil. A nomenclatura dos anuros foi de acordo com Frost (2023).

Os parasitos encontrados nos órgãos foram fixados em etanol absoluto (PA Merck). Uma parcela dos espécimes foi separada e mantida refrigerada para as

análises moleculares. A segunda parte dos parasitos foi utilizada para extração de dados morfométricos. Os espécimes separados para a morfologia, foram fixados e clarificados com lactofenol de Aman para a confecção de lâminas temporárias (descrito por Amato e Amato, 2010), medimos estruturas de valor taxonômico para identificação. Utilizamos o sistema para a captura de imagens *QCapture* 2.9.12 e *ImageJ* 2 para obter as medidas para identificação.

3.2. MORFOLOGIA DAS ESPÉCIES DE *Rhabdias*

Analizamos dados morfométricos de importância taxonômica dos espécimes de *Rhabdias* coletados neste estudo, como: morfologia cefálica, presença/ausência, quantidade e disposição dos lábios e pseudolábios assim como de papilas e anfídeos, morfologia da cauda, tamanho e formato do esôfago, medidas da cápsula, dilatações cefálicas, posição do anel nervoso, posição da vulva e presença/ausência de certas estruturas cuticulares (espinhos, poros ou cristas) (Kuzmin *et al.*, 2015b; Müller *et al.*, 2018; Tkach *et al.*, 2014). Para observar a morfologia apical como o número de lábios realizamos cortes manualmente com navalha.

3.3. ANÁLISES MOLECULARES

Para a coleta de dados moleculares e construção da filogenia sequenciamos os genes COI (*Citocromo c oxidase subunit I*) e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos parasitos coletados. Os genes COI e ITS já são bem caracterizados para identificação de espécies de *Rhabdias*, juntamente com as características morfológicas (do Nascimento *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2018). Para a extração do

DNA dos parasitos seguimos o manual do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Em seguida, o DNA purificado foi submetido a uma PCR convencional com os primers previamente desenhados e a análise dos fragmentos foram obtidos por meio de um gel de agarose. Após a confirmação da amplificação conforme o tamanho dos fragmentos visualizados no gel, essas amostras foram submetidas a uma PCR para o sequenciamento. Em seguida, o DNA foi precipitado e sequenciado pelo método Sanger (*ABI PRISM 3500 Genetic Analyser*). Para analisar os eletroferogramas utilizamos o software *FinchTV* Versão 1.4.0. As análises moleculares foram feitas em parceria com o Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos (LME) do departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

3.4. ALINHAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Realizamos uma busca por sequências dos 2 genes com o algoritmo *BLASTn* no banco de dados do *NCBI*, para investigar a existência de alguma sequência identifica as que obtemos. Para os alinhamentos das sequências utilizamos as sequências obtidas das espécies que coletamos juntamente com as sequências disponíveis no banco de dados *GenBank*, com a ferramenta online *MAFFT* no servidor *Guidance2* (<http://guidance.tau.ac.il/>). O primeiro alinhamento compreendeu as 8 sequências de COI obtidas dos sequenciamentos que realizamos, juntamente com 60 sequências de espécies neotropicais obtidas do *Genbank*. O segundo alinhamento compreendeu as 8 sequências do ITS e incluímos mais 50 sequências de *Rhabdias* disponíveis no *Genbank* do gene ITS. Para o gene 28S o alinhamento foi realizado apenas com as 49 espécies de *Rhabdias* extraídas do *Genbank*. Por

fim concatenamos os dados dos três genes para as análises. Para as inferências filogenéticas, incluímos como grupos externos *Serpentirhabdias viperidicus* Morais, Aguiar, Müller, Narciso, Silva e Silva, 2017 (KX350054) e *Serpentirhabdias lamothei* Martínez-Salazar e León-Règagnon 2007) (KC130747), assim como Muller *et al.* (2018, 2023).

Após os alinhamentos das sequências, cortamos as extremidades de acordo com a menor sequência de cada gene analisado no *Geneious V. 4*. Também avaliamos a saturação de substituição com o índice *I_{ss}* no software *DAMBE 7* Xia (2018). Obtivemos as estimativas de erro padrão utilizando um processo de *bootstrap* com 2000 réplicas. Por fim, para as análises de cálculo de estimativas e erro padrão utilizamos o *Kimura 2-parameter model* (Material suplementar Tabelas S1, S2 e S3) usando o pacote de software *MEGA 11* (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2021).

O modelo de evolução foi selecionado de acordo com critério de *Akaike* (AIC) no software *IQ-Tree 2.2.0* (Minh *et al.*, 2020). Para a inferência de máxima verossimilhança (MV) utilizamos valores de *Bootstrap* de 1000 repetições, além disso, apenas nós com valores acima de 70%, foram considerados suportados estatisticamente, utilizamos o software *IQ-Tree 2.2.0* (Minh *et al.*, 2020). Para as inferências bayesiana (IB) utilizamos o software *MrBayes 3.2.7* (Ronquist *et al.*, 2003), para a busca Markov Chain Monte Carlo (MCMC), foram executadas cadeias com 50.000.000 de gerações para os genes COI, ITS e 28S com os seguintes parâmetros: COI seguindo as configurações *Iset applyto=(1), nst=6 rates=invgamma* correspondendo o modelo GTR+F+I+G4; ITS seguindo *Iset applyto=(2), nst=2 rates=gamma* que corresponde o modelo HKY+F+R2; e o gene 28S com as configurações *Iset applyto=(3) nst=2 rates=propinv* que representa o modelo K2P+I.

Na IB considerados bem suportados apenas nós com probabilidade posterior superiores a 90%. Para as inferências filogenéticas analisamos primeiramente cada gene separadamente e depois concatenamos os dados. Para visualização e edição das árvores utilizamos o *FigTree* v1.4.4 (Rambaut 2009).

3.5. DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

Para a delimitação das espécies, utilizamos o *General mixed Yule-coalescent* (GMYC), que é um método de delimitação de espécies crípticas com dados de *loci* único (Costa-Silva *et al.*, 2015). O GMYC é um método probabilístico que busca identificar espécies em evolução independente a partir de dados de sequências de DNA (*locus* único) que podem indicar a formação de novas espécies/agrupamentos (Fujisawa e Barraclough 2013). O método é baseado em um modelo que combina dois processos fundamentais de evolução biológica: a coalescência de genealogias (Yule) e a especiação (Yule com mistura). Esses processos são integrados em um modelo estatístico que busca identificar os pontos na árvore filogenética (ultramétrica) onde uma espécie pode ter se dividido em duas devido a eventos de especiação (Fonseca *et al.*, 2021). Esta análise foi utilizada para o gene COI, para isto, obtivemos então uma árvore ultramétrica no *Beast 2* com os seguintes parâmetros: filogenia bayesiana com relógio *log-normal* relaxado, *GRT* com distribuição *gamma* como modelo de evolução dos nucleotídeos e processo de especiação nascimento-morte com escala de tempo arbitrária. Determinamos um total de 50.000.000 de gerações e amostragem de uma árvore a cada 100 gerações e descartamos os 10% iniciais. Após a obtenção da árvore ultramétrica usamos para a análise GMYC no *software R* com o pacote “*splits*” (Ezard *et al.*, 2009).

4. RESULTADOS

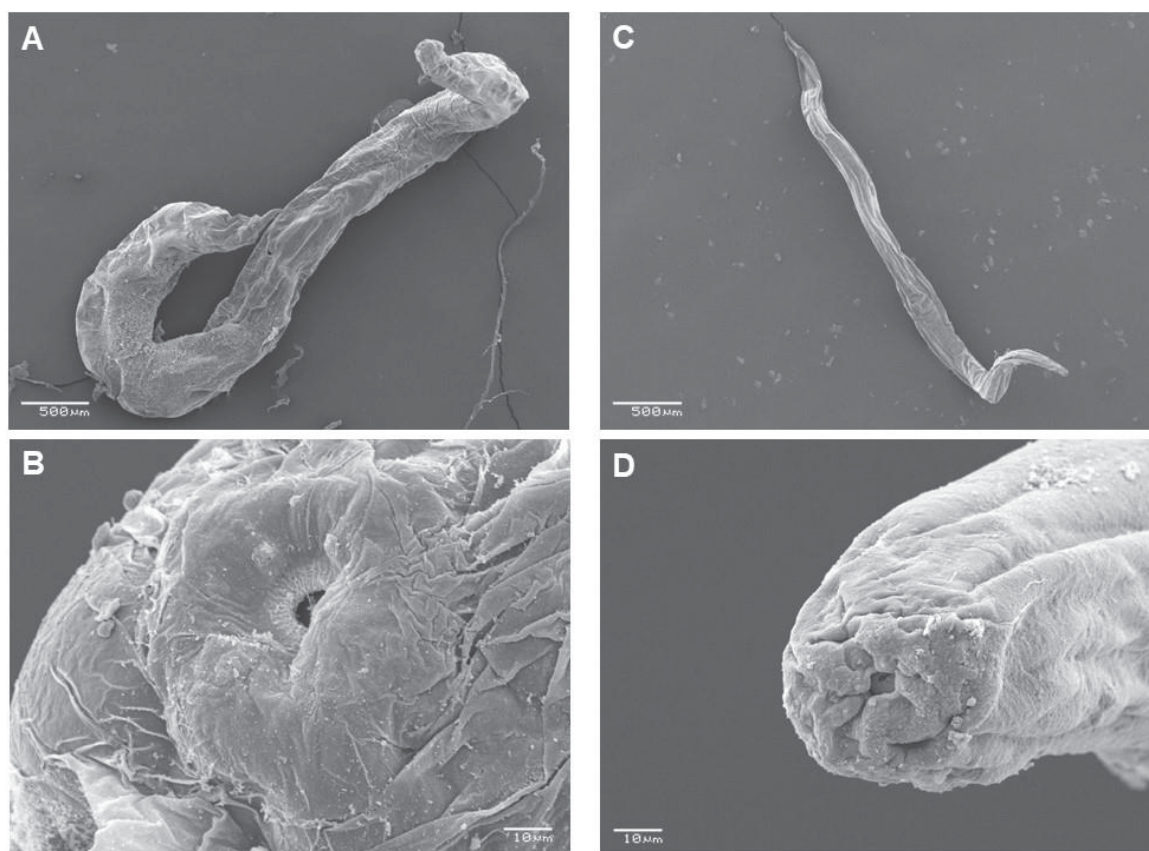
4.1. VARIABILIDADE MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES *Rhabdias*

Morfologicamente foi possível diferenciar 10 morfoespécies de *Rhabdias*, entre elas algumas já descritas como *R. fuelleborni* e *R. elegans*, *R. megacephala* (*In press*), além de 7 morfotipos que podem ser novas espécies como *R. taquariensis* (em processo de descrição). Observamos que características como a dilatação cefálica, cápsula bucal, quantidade e disposição dos lábios foram as características mais significativas para a diferenciação das espécies de *Rhabdias*. A dilatação cefálica também foi uma característica importante para a identificação de espécies novas como *Rhabdias megacephala* que se diferenciou das demais espécies por apresentar uma dilatação cefálica bem evidente, e por ter quatro lábios. Os espécimes de *Rhabdias* que encontramos em *Boana bischoffi*, *Boana semiguttata*, *Bokermannohyla circumdata*, *Scinax perereca*, *Ischnocnema henselii*, *Rhinella icterica* e *Rh. ornata*, apesar de terem algumas diferenças na morfometria (principalmente tamanho do corpo) são muito semelhantes a *Rhabdias fuelleborni* (Tabela 1).

Rhabdias sp.2 tem uma dilatação cefálica semelhante a *R. androgyna*, porém outras medidas como cápsula bucal não são parecidas (diâmetro e profundidade da cápsula bucal: *Rhabdias* sp.2 10 x 11 vs *R. androgyna* 19–27 x 7–9). *Rhabdias* sp.7 encontrada em *B. bischoffi* tem uma cápsula bucal com largura e profundidade muito maior que as espécies que são conhecidas, caracterizando com uma possível nova espécie (Figura 1 A e B). *Rhabdias* sp.8 presente em *H. heyeri* foi a única espécie que coletamos que não apresenta cápsula bucal, uma característica nunca

relatada antes (Figura 1 C e D). Com base nas medidas morfométricas também identificamos mais de um morfotipo de *Rhabdias* parasitando uma mesma espécie de anuro. Por exemplo, encontramos duas espécies em *Proceratophrys boiei*: *R. megacephala* (*In press*) e *Rhabdias* sp.2. De forma similar, encontramos dois morfotipos distintos do parasito pulmonar em *B. bischoffi*, sendo uma espécie nova (*Rhabdias* sp.7 em processo de descrição) e outra que identificamos morfologicamente como *R. af. fuelleborni* (Figura 2).

FIGURA 1 – IMAGENS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA DE *Rhabdias* spp. (A) VISÃO GERAL DO CORPO E (B) VISÃO DA ABERTURA BUCAL E ESTRUTURAS ACESSÓRIAS DE *Rhabdias* sp.7. (C) VISÃO DO CORPO E (D) VISÃO DA ABERTURA BUCAL DE *Rhabdias* sp.8.



FONTE: O autor (2024).

Dentre as morfoespécies não identificadas, a obtenção de determinadas medidas morfológicas e morfométricas não foi viável em alguns exemplares (Tabela

1), por terem sido acidentalmente danificadas no momento da necropsia e/ou pelo baixo número de exemplares (Tabela 2). O baixo número de exemplares coletados limita a análise do número de lábios, que é feita de forma invasiva. Dessa forma não foi possível analisar todos os caracteres morfológicos de *Rhabdias* sp.3 e *Rhabdias* sp.5 por exemplo.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS ESPÉCIES DE *Rhabdias* NEOTROPICAIS.

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSIÇÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (continua)
<i>Rhabdias megacephala</i>	8.1-9.9	416-623	4	22-34	11-23	630-799	152-503	Equatorial	248-338	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias taquariensis</i>	4.5–5.1	316–378	6	13–15	6–9	330–398	148–164	Pré- equatorial	186-224	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> af. <i>elegans</i>	4.237-7.193	361		6-8	6-7	375	203	Equatorial	238	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> af. <i>fuelleborni</i>	7.203-13.242	467-680	6	28	25	416-432	202-283	Pré- equatorial	114-381	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> af. <i>fuelleborni</i>	11.018-11.349	588	6	9	0.010	557-561	256-275	Pré equatorial	358-359	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	7.33		6	10	16	521-568	236-295	Pré- equatorial		Não	Este estudo
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	7390-10.323	412-562	6	8	10	516-564	194-253	Equatorial	336-338	Não	Este estudo
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	3.578-6.153	222-386	6	11-15	13-14	497-481	274-281	Pós- equatorial	218-283	Não	Este estudo
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	7.453-9.209	374-381	6	15-18	11-12	473-623	263-282	Pré- equatorial	498	Não	Este estudo

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSIÇÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (continuação)
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	6.9	411	6	18	11	544	189	Pré- Equatorial	402	Não	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.1	8.6	492	-	20	8	635	195	Equatorial	381	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.2	8.572	450	-	10	11	673	203	Equatorial	332	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.4	3.983	-	-	12	7	490	-	-	-	Não	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.7	9.4	519	6	35	22	545	208	Equatorial	430	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias</i> sp.8	3.890-4.644	256-260	0	-	-	584-672	200-227	Equatorial	161-170	Sim	Este estudo
<i>Rhabdias alabialis</i>	7.7-9.3	260-328	ausente	10-10	10-15	340-445	136-167	Equatorial	278- 328	Não	Kuzmin <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhabdias androgyna</i>	9.35-13.39	269-473	6	19-27	7-9	577-618	210-300	Pré- equatorial	330- 412	Não	Kloss, 1971
<i>Rhabdias anolis</i>	4.6-7.4	191-268	6	9-13	9-13	323-360	129-144	Pré- equatorial	242- 306	Não	Bursey <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhabdias breviensis</i>	2.63-3.63	370-543	6	7-13	4-9	238-410	41-84	Pós- equatorial	139- 191	Sim	do Nascimento <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhabdias elegans</i>	4.55-9.5	270-357	ausente	7	9	314-490	45-86	Equatorial	255- 400	Sim	Gutierrez 1945; Ramallo

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSIÇÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (continuação)
<i>Rhabdias galactonoti</i>	5.60–6.04	242–268	6	14–17	10–12	419–459	165–184	Pré- equatorial	229– 333	Não	Kuzmin <i>et al.</i> , 2016
<i>Rhabdias glaurungi</i>	3.54–6.73	237–344	6	10–16	6–9	292–332	108–140	Pos- equatorial	151– 216	Sim	Wilkens <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhabdias guaianensis</i>	2.9–3.5	200.4–208.6	4 submedi al + 2 pseudol abios	13–14	11–14	266.9–274.6	112.7– 113.9	Pos- equatorial	160.4– 186.9	Sim	Alcantara <i>et al.</i> , 2023
<i>Rhabdias hermaphrodita</i>	12.9	-	-	-	-	268–663		Equatorial	226– 524	Não	Kloss, 1971
<i>Rhabdias kuzmini</i>	14.15–19.19	351–542	4 submedi al + 2 pseudol abios	35–47	31–70	833–1008	302–407	Equatorial ou um pouco Pós- equatorial	271– 380	Não	Martínez- Salazar e León- Règagnon 2007
<i>Rhabdias leonae</i>	11.44–15.06	478–589	4 sub+2 pseudol abios	11–19	23–34	670–751	217–244	Pós- equatorial	217– 325	Não	Martínez Salazar 2008 e Martínez- Salazar 2006

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSIÇÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (continuação)
<i>Rhabdias matogrossensis</i>	2.9–3.8	231.2–301.4	4 submedi al + 2 pseudol abios	15–17	11–16	437.5–507.9	142.5– 207.9	Pós- equatorial	165.9– 229.7	Sim	Alcantara <i>et al.</i> , 2023
<i>Rhabdias mucronata</i>	juvenil	-	-	-	-	-	-	-	-	Não	Schuurmans- Stekhoven, 1952
<i>Rhabdias nicaraguensis</i>	6.6–7.2	281–421	6	11–15	11–15	536–612	134–159	Equatorial	255– 357	Não	Burse <i>et al.</i> , 2007b
<i>Rhabdias paraensis</i>	5.92–8.19	346.15–538.46	ausente	3.90–16.88	14–27	394.80– 439.61	151.30– 234.42	Pós- equatorial	266.67– 346.67	Não	Santos <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhabdias peninsularis</i>	5.84–7.28	270–334	6	15–23	15	334–430	131–201	Pós- equatorial	139– 213		Goldberg e Burse 2002; Kuzmin <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhabdias pocoto</i>	3.41–7.43	135–380	6	11–17	9–17	475–677	238–339	Equatorial	98–163	Sim	Goldberg, 2001 Morais <i>et al.</i> , 2020

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSICÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (continuação)
<i>Rhabdias savagei</i>	4.2–5.3	255–300	4 submedi al + 2 pseudol abios	18–24	12–18	366–415	116–134	Pos- equatorial	171– 201	Não	Bursey e Goldberg, 2005
<i>Rhabdias</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sim	Müller <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhabdias</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sim	Müller <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhabdias</i> sp. (EU836868-70)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sim	Dubey e Shine, 2008
<i>Rhabdias</i> cf. <i>stenocephala</i>	6.9–8.1	325–439	6	15–18	8–11	385–442	192–225	Pós- equatorial	266– 339	Sim	Müller <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhabdias</i> <i>tobagoensis</i>	7.34–7.56	0.408–0.476*	6	18–21	6–8	476–530	177	Pré- ou pós- equatorial	0.210– 0.276	Não	Moravec e Kaiser, 1995
<i>Rhabdias waiapi</i>	3.36–4.91	171–267	6	16–19	8–8	405–533	145–187	Pós- equatorial	173– 274	Sim	Tavares- Costa <i>et al.</i> , 2022

PARASITOS	COMPRIMENT O DO CORPO (MM)	LARGURA NA REGIÃO DA VULVA	Nº DE LÁBIOS	DIÂMETRO CÁPSULA BUCAL	PROFUNDIDA DE CÁPSULA BUCAL	COMPRIME NTO DO ESÔFAGO	ANEL NERVOS O (ATÉ A REGIÃO ANTERIO R)	POSIÇÃO DA VULVA	COMPR IMENT O DA CAUDA	DADOS MOLECULA RES	REFERÊNCIA (conclusão)
<i>Rhabdias truncata</i>	2.92	133	-	-	-	-	-	-	-	Não	Schuurmans- Stekhoven, 1952

TABELA 2 – PARÂMETROS DE INFECÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Rhabdias* ASSOCIADAS AOS ANUROS COLETADOS.

PARASITOS	PREVALÊNCIA	INTENSIDADE MÉDIA	HOSPEDEIROS	FAMÍLIA	Nº HOSPEDEIROS COLETADOS	HÁBITO (SEGUNDO HADADD ET AL., 2013) (continua)
<i>Rhabdias</i> af. <i>elegans</i>	40%	2,8 (± 0,52)	<i>Leptodactylus</i> <i>notoaktites</i>	Leptodactylidae	40	Terrestre
<i>Rhabdias</i> af. <i>fuelleborni</i>	40%	3,6 (± 0,48)	<i>Boana bischoffi</i> ; <i>Boana</i> <i>semigutatta</i>	Hylidae	42	Arbóreo
<i>Rhabdias fuelleborni</i>	35%	3,7 (± 0,23)	<i>Leptodactylus</i> <i>latrans</i> , <i>Scinax</i> <i>perereca</i> , <i>Ischnocnema</i> <i>henselii</i> , <i>Rhinella</i> <i>ornata</i> , <i>Bokermannohyla</i> <i>circumdata</i> <i>Rhinella icterica</i>	Leptodactylidae, Hylidae, Brachycephalida, Bufonidae	110	Semiaquático, Arbóreo, Terrestre
<i>Rhabdias</i> <i>megacephala</i>	60%	4,9 (± 0,25)	<i>Proceratophrys</i> <i>boiei</i>	Odontophrynidae	40	Terrestre

PARASITOS	PREVALÊNCIA	INTENSIDADE MÉDIA	HOSPEDEIROS	FAMÍLIA	Nº HOSPEDEIROS COLETADOS	HÁBITO (SEGUNDO HADADD ET AL., 2013)
<i>Rhabdias</i> sp.1	5%	3	<i>Boana faber</i>	Hylidae	19	Arbóreo
<i>Rhabdias</i> sp.2	25%	1,8 (± 0,5)	<i>Proceratophrys boiei</i>	Odontophrynidae	40	Terrestre
<i>Rhabdias</i> sp.3	100%*	1	<i>Chiasmocleis leucosticta</i>	Microhylidae	1	Fossorial
<i>Rhabdias</i> sp.4	4%	2	<i>Scythrophrys sawayae</i>	Leptodactylidae	23	Terrestre
<i>Rhabdias</i> sp.5	11%	1	<i>Hylodes cardosoi</i>	Hylodidae	9	Semiaquático
<i>Rhabdias</i> sp.7	28%	3,4 (± 0,73)	<i>Boana biscoffii</i>	Hylidae	28	Arbóreo
<i>Rhabdias</i> sp.8	42%	3,7 (± 0,49)	<i>Hylodes heyeri</i>	Hylodidae	43	Semiaquático

*considerar baixo esforço amostral dos hospedeiros

FONTE: O autor (2024).

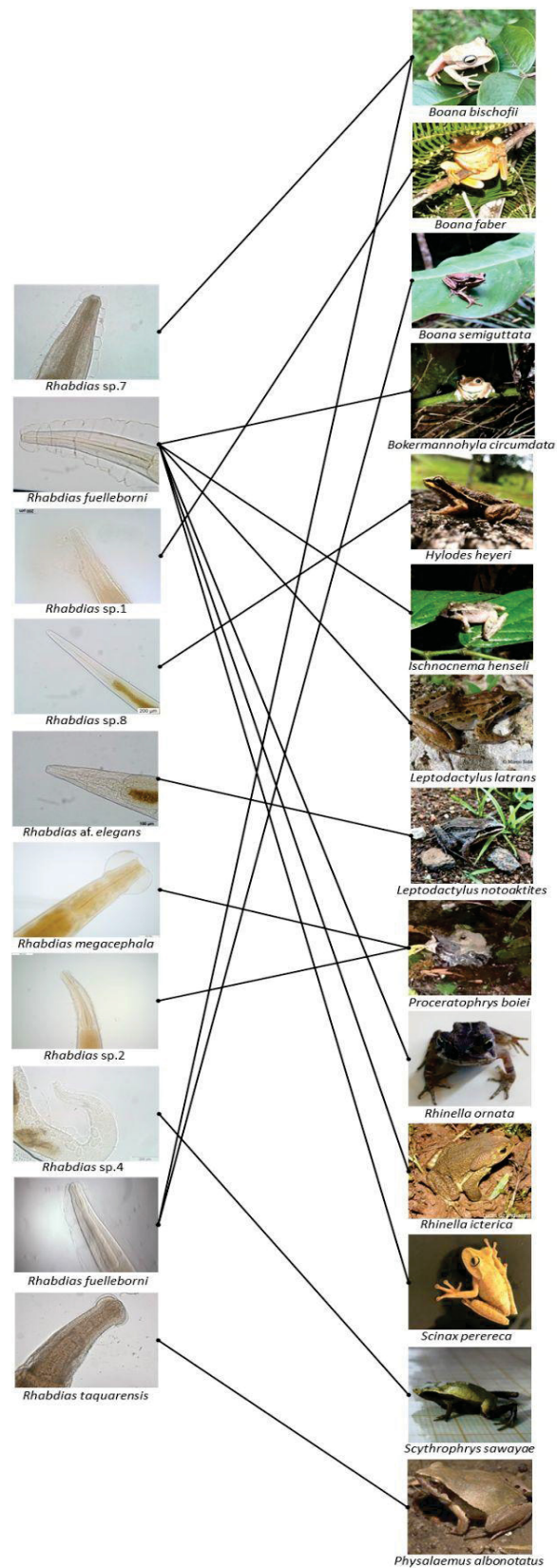
TABELA 3 – REPERTÓRIO DE HOSPEDEIROS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE *Rhabdias* NA REGIÃO NEOTROPICAL.

PARASITOS	HOSPEDEIROS	LOCALIZAÇÃO	REFERÊNCIA (continua)
<i>Rhabdias breviensis</i>	<i>Leptodactylus petersii</i> , <i>Leptodactylus fuscus</i> , <i>Proceratophrys aridus</i> , <i>Rhinella granulosa</i> , <i>Scinax fuscovarius</i> , <i>Leptodactylus podicipinus</i> , <i>Rhinella diptycha</i> , <i>Leptodactylus macrosternum</i>	Brasil (AM, CE, PI, SP)	Do Nascimento et al., 2013; Müller et al., 2023
<i>Rhabdias</i> cf. <i>stenocephala</i>	<i>Leptodactylus macrosternum</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> , <i>Leptodactylus pentadactylus</i> , <i>Leptodactylus paraenses</i>	Brasil (CE)	Müller et al., 2023
<i>Rhabdias fueleborni</i>	<i>Rhinella diptycha</i> <i>Hypsiboas prasinus</i> , <i>Ischnocnema guentheri</i> , <i>Leptodactylus vastus</i> , <i>Rhinella dorbignyi</i> , <i>Rhinella icterica</i> , <i>Scinax ruber</i>	Argentina, Brasil (BA, CO, MG, PR, RJ, RS, SC, SP)	Campião et al., 2014; Müller et al., 2023
<i>Rhabdias glaurungi</i>	<i>Hypsiboas raniceps</i> , <i>Rhinella marina</i> , <i>Rhinella diptycha</i> , <i>Rhinella major</i>	Brasil (PA)	Willkens et al., 2020
<i>pseudosphaerocephala</i>	<i>Rhinella diptycha</i>	Costa Rica, Brasil (AM, CE, PI, PR, SP), Nicaragua	Kuzmin et al., 2007; Müller et al., 2023
<i>Rhabdias</i> sp.4	<i>Rhinella diptycha</i>	Brasil (SP)	Müller et al., 2023
<i>Rhabdias</i> sp.5	<i>Norops brasiliensis</i>	Brasil (CE)	Müller et al., 2023
<i>Rhabdias</i> sp. (EU836868-70)	<i>Rhinella schneideri</i>	Brasil (SP)	Dubey e Shine, 2008
<i>Rhabdias matogrossensis</i>	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Brasil (MT)	Alcantara et al., 2023

PARASITOS	HOSPEDEIROS	LOCALIZAÇÃO	REFERÊNCIA (conclusão)
<i>Rhabdias kuzmini</i>	<i>Incilius occidentalis</i>	México	Martínez-Salazar e Leon-Regagnon, 2007
<i>Rhabdias leonae</i>	<i>Norops megapholidotus</i>	México	Martínez-Salazar, 2006
<i>Rhabdias manantlanensis</i>	<i>Craugastor occidentalis</i>	México	Martínez-Salazar, 2008
<i>Rhabdias nicaraguensis</i>	<i>Norops capito</i>	Nicarágua	Burseý et al., 2007
<i>Rhabdias paraensis</i>	<i>Rhinella marina</i>	Brasil (PA)	Santos et al., 2011
<i>Rhabdias savagei</i>	<i>Lithobates forreri</i>	Costa Rica	Burseý e Goldberg, 2005
<i>Rhabdias galactonoti</i>	<i>Adelphobates galactonotus</i>	Brasil (PA)	Kuzmin et al., 2016
<i>Rhabdias truncata</i>	<i>Telmatobius schreiteri</i>	Argentina	Schuurmans Stekhoven, 1952
<i>Rhabdias mucronata</i>	<i>Leptodactylus latrans</i>	Argentina	Schuurmans Stekhoven, 1952
<i>Rhabdias tobagoensis</i>	<i>Dendropsophus microcephalus</i>	Tobago	Moravec et Kaiser, 1995
<i>Rhabdias peninsularis</i>	<i>Pseudacris hypochondriaca</i>	México	Martínez-Salazar et al., 2013

FONTE: O autor (2024).

FIGURA 2 – DIVERSIDADE DE *Rhabdias* spp. COLETADAS NESTE TRABALHO, AS LINHAS REPRESENTAM AS INTERAÇÕES COM AS ESPÉCIES DE HOSPEDEIROS ANUROS.



FONTE: O autor (2024).

4.2. ANÁLISES MOLECULARES E DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Analizamos marcadores moleculares de 8 dentre os 10 morfotipos de *Rhabdias* analisados morfologicamente. Para o gene COI, quatro das nossas espécies (*Rhabdias* sp.2, *Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* af. *fuelleborni*, *Rhabdias* af. *fuelleborni*) têm uma distância significativa de 11% com *Rhabdias* sp.2 (KC130737 e KC130740) de *Rana* sp. (Prosser *et al.*, 2013). As *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 são mais distantes do complexo de espécies *Rhabdias* cf. *stenocephala* 14.6% e mais próximas de *Rhabdias* sp.3 (KC130741) de *Rh. marina* (Prosser *et al.*, 2013) com 10% de distância (Material suplementar Tabela S1).

Considerando todas as espécies neotropicais com dados disponibilizados no *Genbank*, por serem genes mais conservados, as divergências do ITS e do 28S são menores quando comparamos com o COI. Observamos que todas as espécies apresentaram divergência abaixo de 1%. As *Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* sp.2, *Rhabdias* sp.7, *R. af. fuelleborni* e *R. megacephala*, coletadas neste estudo, são próximas de *Rhabdias* sp. (EU836869) e *Rhabdias* sp.4 (MH516091) coletadas em São Paulo com 0.2% e 0.4% de divergência, respectivamente. *Rhabdias* sp.8 é menos divergente de algumas espécies do complexo de espécies *Rhabdias pseudosphaerocephala* e de *Rhabdias* sp.5 (MH516092 e MH516093) (11% - 13%) (Müller *et al.*, 2018, 2023).

4.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O alinhamento concatenado compreendeu dados dos genes ITS, COI e 28S (sendo este último apenas para os parasitos encontrados no *GenBank*) somando

1259 pares de bases e 73 sequências da região neotropical. A filogenia apresentou dois clados principais A e B. O clado A tem alto valor de suporte e apresenta 3 subdivisões A1, A2 e A3. A subdivisão A1 tem valor de suporte significativo e é composto pelo complexo de espécies *R. pseudosphaerocephala*, *Rhabdias glaurungi* (MK820652) e *Rhabdias pocoto* (MW041239) e *Rhabdias* sp.3 (KC130736, KC130738, KC130739, KC130741) como grupo mais externo desse clado. O segundo clado de A apresenta as subdivisões A2 e A3. O clado A2 tem baixo valor de suporte e é composto pelas *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 deste estudo e *Rhabdias* sp.2 (KC130737 e KC130740) como grupo irmão. Por fim temos a subdivisão A3 (baixo suporte) dividida em A3' e A3'' composto pela maioria das espécies de *Rhabdias*, porém com baixo suporte estatístico. Observamos em A3 as espécies *Rhabdias waiapi* (OL689010–OL689012) e *Rhabdias* sp.5 (MH548292 e MH548293) como grupo irmãos. Na divisão A3' é possível observar o complexo de espécies *Rhabdias* cf. *stenocephala* (MH548271–MH548277) e como grupo mais externos *Rhabdias guaianensis* (OP971526, OP971527 e OP971529). *Rhabdias megacephala* (PP291576), *R. af. fuelleborni* e *Rhabdias* sp.1 e 2 (deste estudo) estão presentes na divisão A3'', juntamente com *R. elegans* (KF999604), *R. fuelleborni* (OP651882–OP651884 e OP654198), *Rhabdias* sp. (EU836869 e EU836870), *Rhabdias* sp.1 (KC130697) e *R. af. elegans* (deste estudo). O clado B é representado pelo complexo de espécies *R. breviensis* (MH548260–MH548270 e KC512382) e pela *R. matogrossensis* (OP971524, OP971525 e OP971528) que estão relacionados e têm alto valor de suporte (Figura 3).

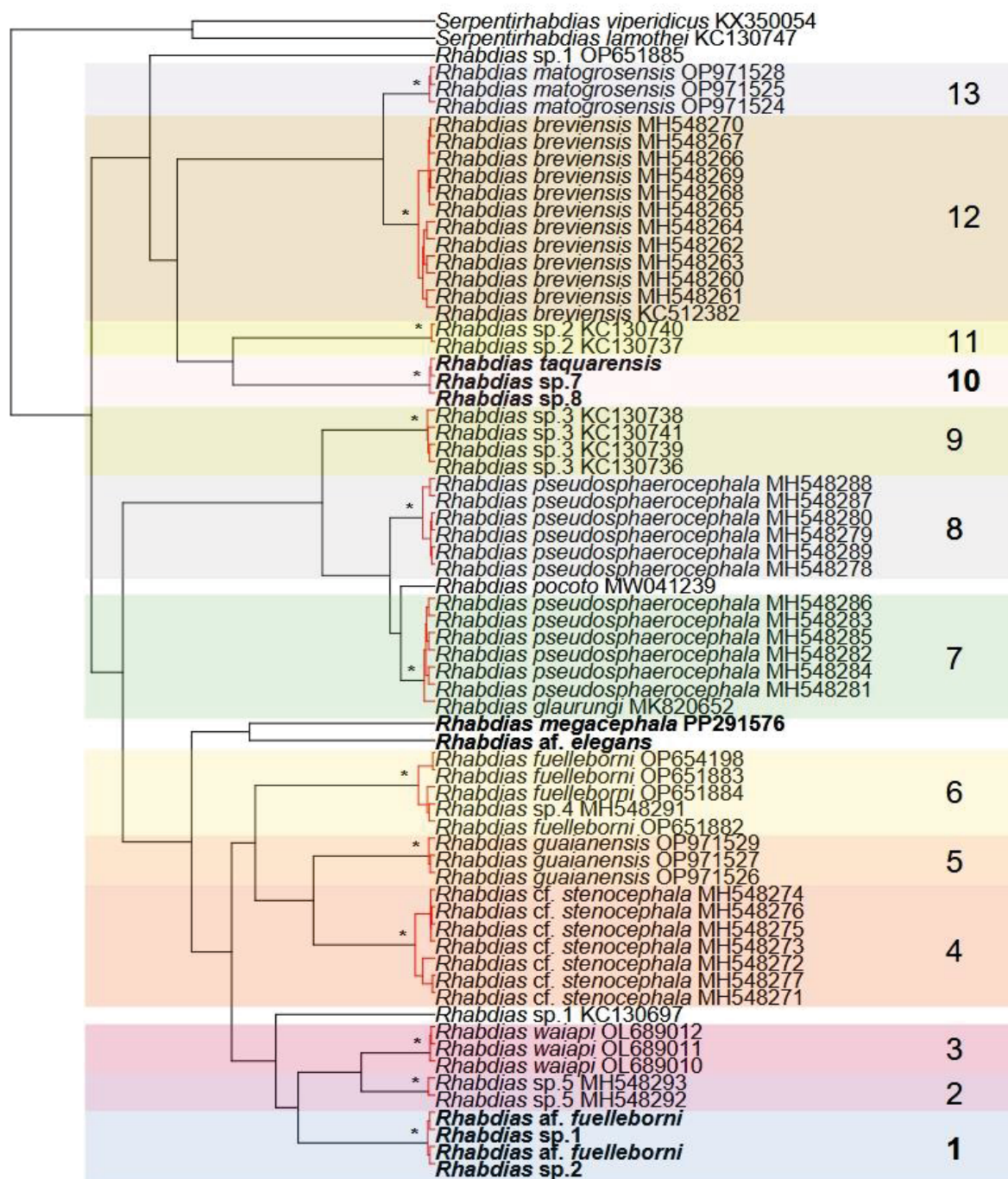
Entre as espécies que sequenciamos e analisamos, observamos um agrupamento formado pelos espécimes *Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* sp.2 e *R. af. fuelleborni*, sendo próximas de *R. elegans* (KF999604) com alto valor de suporte (72

de bootstrap), e com *R. megacephala* como grupo mais externo. O agrupamento formado por *Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* sp.2, *Rhabdias* af. *fuelleborni* e *R. elegans* (KF999604) tem como grupo irmão *R. fuelleborni*, *Rhabdias* sp.4 e *Rhabdias* sp. (EU836869 e EU836870). Com esse resultado podemos propor que *R. af. fuelleborni* deste estudo se assemelha morfologicamente, mas não é a mesma *R. fuelleborni* descrita e depositada no *Genbank*. No clado A2 observamos que *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 são espécies irmãs e tem um suporte de quase 100%. Observamos também que as espécies que sequenciamos parecem ser mais derivadas dentro da hipótese filogenética proposta.

4.4. DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES COM O GENE COI

A análise de *GMYC* utilizando o gene COI indicou a identificação de 13 agrupamentos com um intervalo de confiança que varia entre 13-14 entidades (Figura 4). O *GMYC* também indicou que o conjunto de dados utilizado representa 20 espécies. O tempo limite foi -0.004583209

FIGURA 4 – ÁRVORE BAYESIANA GERAL GMYC DE *Rhabdias* spp. COM DADOS DO GENE CITOCROMO OXIDASE I (COI). OS ASTERISCOS REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES SUPERIORES A 90%. OS RAMOS VERMELHOS MOSTRAM OS 13 CLUSTERS QUE ESTÃO NUMERADOS DE ACORDO COM ANÁLISE. AS *Rhabdias* SEM ID DO GENBANK SÃO AS ESPÉCIES COLETADAS NESTE ESTUDO (EXCETO *R. megacephala*).



FONTE: O autor (2024).

Três espécies (*Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* sp.2 e *R. af. fueleborni*) que identificamos morfologicamente como distintas neste estudo formaram um complexo

de espécies. As espécies deste complexo 1 foram encontradas em diferentes espécies de hospedeiros (Tabela 2). Esse complexo de espécies formado por *R. af. fuelleborni* ficou como grupo externo das espécies *Rhabdias stenocephala* (MH548271–MH548277) e *Rhabdias guaianensis* (OP971526, OP971527 e OP971529) e *R. fuelleborni* (OP651882–OP651884 e OP654198) + *Rhabdias* sp.4 (MH548291), apontando mais uma vez para a possibilidade de *R. af. fuelleborni* ser uma possível nova espécie e não *R. fuelleborni* já descrita. De forma semelhante ao complexo 1, *R. taquariensis* (em processo de descrição), *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 (complexo 10) coletadas em *P. albonotatus*, *B. bischoffi* e *H. heyeri* respectivamente, foram morfoespécies que formaram uma mesma entidade na delimitação molecular. Além disso, as outras espécies que encontramos, *R. af. elegans* e *Rhabdias megacephala* (*In press*), ficaram como grupos irmãos e indivíduos únicos (ramos únicos).

Algumas sequências das espécies extraídas do *GenBank* mantiveram basicamente as mesmas entidades que os encontrados na literatura, como *Rhabdias stenocephala*, *Rhabdias* sp.5 (MH548292–MH548293). Os espécimes de *R. matogrossensis* foram considerados uma única entidade, assim como e *R. guaianensis*, e *R. waiapi* que são espécies que anteriormente não tinham sido analisadas. *Rhabdias psedosphaerocephala* ficou separada em 2 entidades, de acordo com a literatura as espécies são provenientes das regiões norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil, formando assim um complexo de espécies. Entretanto em *R. psedosphaerocephala* uma das entidades agrupou com *R. glaurungi* (7), possivelmente por ter uma distância molecular baixa menor que 1% (Material suplementar tabela S1) e a outra entidade (8) formada apenas por *R.*

pseudosphaerocephala. *Rhabdias breviensis* formou uma entidade única pela análise, diferente do que foi encontrado em trabalhos anteriores.

4.5. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, REPERTÓRIO DE HOSPEDEIROS E A INFECÇÃO PELAS ESPÉCIES *Rhabdias*

Observamos que *Rhabdias stenocephala* tem sua distribuição conhecida mais restrita, encontrada apenas para as regiões norte e nordeste do Brasil (PA e CE). Da mesma forma, *R. matogrossensis* tem registro de ocorrência apenas para o Mato Grosso, *R. waiapi* é encontrada no Amapá e *R. guaianensis* ocorre em São Paulo e Mato Grosso. Por outro lado, os complexos de espécies *R. pseudosphaerocephala* e *R. breviensis* que tem sua distribuição conhecida mais ampla, que abrange desde o Norte até o sul do Brasil (Tabela 3).

Os hospedeiros mais utilizados pelas espécies *Rhabdias* são na sua maioria bufonídeos do gênero de *Rhinella* e esse gênero tem uma distribuição ampla (Miller *et. al.*, 2018; 2023). *Rhabdias pseudosphaerocephala*, por exemplo, talvez seja a espécie mais amplamente distribuída do gênero, ela está associada a que são *Rhinella marina* e *Rhinella diptycha*, e estão distribuídos nos estados do Amapá, Piauí, Ceará, São Paulo e Paraná (além de estar presente na Costa Rica, Nicarágua e Austrália).

As espécies de *Rhabdias* que encontramos, foram todas coletadas no Paraná (exceto por *R. taquariensis*) e ficaram próximas na filogenia de espécies como *R. fuelleborni*, *Rhabdias* sp. (EU836869 e EU836870), *Rhabdias* sp.4 (MH549291) e *Rhabdias* sp.1 (KC130697) que ocorrem na região sudoeste, São Paulo e Rio de Janeiro. Além disso, a *R. af. fuelleborni*, espécie que coletamos, têm proximidade

com *R. elegans* que têm ampla distribuição na região Neotropical (Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil, Equador) (Tabela 3).

Analizamos hospedeiros que são descritos como arbóreos, terrestres, semiaquáticos e reofílicos. Embora essa classificação indique o hábito principal, estes hospedeiros fazem, na prática, amplo uso de habitat. Por exemplo, mesmo sendo classificados como arbóreos, as espécies *B. bischoffi*, *S. perereca* e *B. circumdata* são frequentemente encontradas em contato com o solo, e tiveram prevalências de infecção relativamente altas (Tabela 2). Porém, considerando o esforço amostral representativo na coleta dos hospedeiros, o valor mais alto de prevalência foi observado no anuro terrestre *P. boiei* (Tabela 2).

A tendência de associação com hospedeiros de hábito terrestre pode ser observada em espécies como *R. fuelleborni*, *R. pseudosphaerocephala* e *R. breviensis*, frequentemente associadas a hospedeiros da família Bufonidae. Porém, nossos resultados indicam que o hábito do hospedeiro parece não limitar a infecção, uma vez que vemos hospedeiros de hábitos distintos frequentemente associados a diferentes espécies de *Rhabdias*. Além disso, algumas *Rhabdias* foram observadas parasitando espécies de Leptodactylidae que tem hábitos terrestres, aquáticos e/ou semiaquáticos, como *R. stenocephala*, *R. matogrossensis*, *R. guaianensis* e *R. pocoto*. No entanto, também foram encontradas *R. pseudosphaerocephala* e *R. breviensis* em hospedeiros que, de acordo com a literatura, são predominantemente arbóreos, como espécies de *Scinax* e *Boana*.

Dentre as espécies que coletamos, a maioria das morfoespécies foi observada em um único hospedeiro. Porém, *R. fuelleborni* foi uma das mais prevalentes, associada a diferentes espécies de hospedeiros. Esse padrão é também observado nos resultados da nossa revisão bibliográfica (Tabela 3), assim

como *R. breviensis* e *R. elegans*, esta última também encontrada no hospedeiro *L. notoakitites* analisados neste estudo (Tabela 2, Tabela 3)

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados ampliaram o conhecimento sobre a distribuição geográfica e o repertório de hospedeiros de espécies já conhecidas, e revelou uma diversidade de potenciais novas espécies, a partir de características morfológicas de importância taxonômica, dados moleculares e ecológicos. Morfologicamente identificamos dez morfoespécies, das quais sequenciamos oito para as análises moleculares, que mostraram uma diversidade maior, refutando as identificações que realizamos utilizando apenas as características morfológicas. Por exemplo, observamos que algumas espécies que inicialmente foram identificadas como *R. fuelleborni* (*R. af. fuelleborni*) possivelmente sejam outra espécie. A proposta filogenética não manteve a estrutura de todos os clados como as propostas anteriores (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2018, 2023), mas trouxe a novidade como *R. breviensis* sendo grupo irmão com baixo suporte de *R. matogrossensis* e a inclusão de espécies anteriormente só incluídas em filogenias com o COI (*R. waiapi*, *R. pocoto*, *R. glaurungi*). A inclusão de informações acerca da distribuição geográfica e da ecologia dos hospedeiros contribuiu para a delimitação e melhor compreensão das hipóteses taxonômicas, especialmente quando dados morfológicos e moleculares não foram uníssomos. Na delimitação também observamos algumas novidades como os agrupamentos que foram delimitados como espécies distintas *R. guaianensis*, *R. matogrossensis* e *R. waiapi* que não tinham sido analisadas anteriormente.

5.1. MORFOLOGIA

Um resultado interessante, obtido através da análise morfológica, foi a ausência da cápsula bucal em *Rhabdias* sp.8. A presença de cápsula bucal é uma característica diagnóstica do gênero, e se fôssemos nos basear apenas nela, *Rhabdias* sp.8 ficaria morfológicamente mais próxima de *Serpenterhabdias* (parasitos pulmonares de serpentes), gênero que tem como característica diagnóstica não apresentar esta estrutura (Kuzmin *et al.*, 2014). Entretanto, dados moleculares indicam que a sp8 que encontramos é de fato *Rhabdias*, e é possível que a ausência de cápsula bucal seja uma convergência. Dados moleculares de *Serpenterhabdias* do sul da Mata Atlântica são escassos, e seria interessante, em todo caso, comparar a morfologia e sequências de ambas amostras.

Apesar da importância das características taxonômicas, as fêmeas de *Rhabdias* spp. possuem poucas características morfológicas que podem ser usadas para comparação de espécies (Alcantara *et al.*, 2023), e esse é um fator limitante na delimitação. A qualidade dos dados e detalhamento das análises são também fatores importantes. Por exemplo, mesmo em nossas análises a escassez de material disponível para a realização de cortes destinados à coleta de medidas na região anterior também levanta questões sobre a identificação específica das espécies como *Rhabdias* sp.3, *Rhabdias* sp.4 e *Rhabdias* sp.5 (que podem representar espécies novas).

As características morfológicas usadas para caracterização e diferenciação das espécies de *Rhabdias*, abrem a discussão de que, mesmo sendo importantes para uma identificação inicial, o uso unicamente de características morfológicas pode ser insuficiente (Fouquet *et al.*, 2007). O uso apenas de características

morfológicas pode gerar erros na identificação em grupos como as *Rhabdias* superestimando ou subestimando espécies. Superestimar ou subestimar espécies pode gerar consequências para a conservação e compreensão da diversidade, como erros em análises ecológicas e evolutivas, falta de precisão taxonômica ou impacto na gestão de recursos para conservação (Bickford *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2007). A partir dessas informações fica evidente a importância do uso de diferentes dados assim como um número maior de dados para identificar espécies, realizar análises ecológicas, propor hipóteses filogenéticas e/ou delimitação de espécies.

5.2. ANÁLISES MOLECULARES E DISTÂNCIA GENÉTICA

A identificação e diferenciação de espécies utilizando dados moleculares, em especial o gene mitocondrial COI, tem mostrado um grande potencial na revelação de espécies ocultas (Hebert *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2018). Conseguimos observar diferenças na resolução da identificação de espécies com dados moleculares. Observamos que algumas espécies que identificamos inicialmente apenas com dados morfométricos, podem na verdade pertencer a outras espécies. Um bom exemplo foram os espécimes de *R. af. fuelleborni*, que apresentaram variações de tamanho entre os hospedeiros (Tabela 1) mas eram morfológicamente muito semelhantes a *R. fuelleborni*. Porém as análises do gene COI, indicaram uma diferenciação de 8% entre as sequências de *R. af. fuelleborni* que analisamos e as sequências de *R. fuelleborni* depositadas no *Genbank* (Müller *et al.*, 2023). Essa diferença da sequência do COI de *R. af. fuelleborni*, pode indicar que se trata de um clado distinto formando um complexo de espécies. Os outros espécimes de *R.*

fuelleborni encontrados *L. latrans*, *S. perereca*, *B. circumdata*, *I. henselii*, *Rh. ornata* e *Rh. icterica* podem pertencer ao mesmo clado *R. af. fuelleborni*, porém precisamos sequenciar e analisar as sequências de DNA para uma hipótese mais robusta.

A *R. af. elegans* que coletamos ficou muito distante da *R. elegans* (KF999604) do México, indicando que coletamos uma espécie diferente, pois além de ter uma distribuição geográfica bem distinta, apresentou uma grande distância na filogenia. Porém não podemos confirmar totalmente a identificação dessa espécie, pois não existem dados do COI de *R. elegans*, para realizar a delimitação (apenas o ITS). Como o gene ITS utilizado na filogenia é bem conservado, ele, por si só, não apresenta diferenças moleculares significativas (Álvarez *et al.*, 2003). Assim podemos destacar a importância de estudos com dados moleculares como o COI, considerado um *barcoding*, por sua ampla aplicação na identificação de diferentes grupos taxonômicos, inclusive grupos mais complexos (Frézal e Leblois, 2008). Além disso, é importante a inclusão de mais genes diferentes como o ITS e 28S, juntamente com o COI para melhorar a resolução taxonômica e tornar a identificação de espécies, assim como propostas de hipóteses filogenéticas e delimitação de espécies mais robustas (Hebert *et al.*, 2003).

Uma possível explicação para a morfologia semelhante e dados moleculares divergentes entre as *R. af. fuelleborni* que coletamos com *R. fuelleborni* encontrada na literatura, assim como para *R. elegans*, é a existência de espécies crípticas. Espécies crípticas são duas ou mais espécies que foram ou são classificadas como espécie única nominal porque são, ao menos superficialmente, indistintas morfologicamente (Bickford *et al.*, 2007; Struck *et al.*, 2018)). Entre *Rhabdias* spp. a existência de espécies crípticas pode ser recorrente, uma vez que é um grupo que possui características morfométricas muito semelhantes (Müller *et al.*, 2018). A cada

dia, mais espécies crípticas são descobertas através de análises detalhadas de dados moleculares (Bickford *et al.*, 2007; Singhal *et al.*, 2018), ressaltando a importância desse processo.

5.3. PROPOSTA FILOGENÉTICA

Na proposta filogenética construída com base nos três genes (COI, ITS e 28S) observamos uma ramificação composta por quatro espécies de *Rhabdias* que coletamos, *Rhabdias* sp.1, *Rhabdias* sp.2 e duas *R. af. fuelleborni*, formando um complexo de espécies. Esse clado tem valor de suporte e é próximo de *R. elegans*, também bem suportado por *bootstrap*, e tem *R. megacephala* como grupo externo, porém sem suporte estatístico. O clado que é formado pelas quatro espécies tem como grupo irmão *R. fuelleborni*, porém esta posição não tem suporte na filogenia. Essa distância na filogenia pode ser mais uma evidência de que não coletamos *R. fuelleborni* e que possivelmente a espécie aqui identificada morfologicamente como *R. af. fuelleborni* seja uma espécie nova. Também observamos que *Rhabdias* sp.8 e *Rhabdias* sp.7 formam um clado com quase 100% de suporte, esse resultado foi coerente com o resultado da distância molecular. Essa relação próxima entre *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 na filogenia é um indicativo de plasticidade fenotípica em uma mesma entidade taxonômica (Pigliucci *et al.*, 2006).

A posição filogenética da maioria das demais espécies de *Rhabdias* (analisadas a partir de dados do *Genbank*) variou quando comparada com as filogenias já propostas em outros estudos apenas com os genes ITS e 28S, como *R. cf. stenocephala* agrupada com espécies da América do Norte (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2018, 2023). Variações como essas podem ser explicadas pelo

uso de genes diferentes e de dados diferentes. Por exemplo, nós utilizamos apenas espécies neotropicais enquanto Müller *et al.* (2018, 2023) utilizaram espécies do mundo todo, porém mesmo com as diferenças, recuperamos posições de algumas espécies como suporte estatístico como *R. fuelleborni* + *Rhabdias* sp.4 + *Rhabdias* sp. (EU836869, EU836870). Observamos também na filogenia proposta de alguns clados semelhantes aos da literatura, como a posição de *R. breviensis* como grupo irmão de *R. matogrosensis* e *R. guaianensis* próximo de *R. nicaraguensis* (KF999605). Mesmo com as diferenças entre as filogenias com o uso dos três genes (COI, ITS e 28S) conseguimos suporte estatístico em ramos que anteriormente não existia (Figura 3). Nossas análises também indicaram que *Rhabdias* sp.4 pode ser *R. fuelleborni*, entretanto esta hipótese é baseada apenas em análises moleculares e filogenéticas e o mais adequado seria ter os dados morfológicos para uma análise integrativa.

5.4. INTEGRANDO DIFERENTES ABORDAGENS

Observamos diferenças morfológicas entre *R. taquariensis*, *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 analisadas aqui, como dilatação cefálica interna proeminente, a cápsula bucal maior e ausência da cápsula bucal respectivamente, morfologia discrepante assim como os hospedeiros aos quais estão associadas (*P. albonotatus*, *B. bischoff* e *H. heyeri* respectivamente), porém as sequências do COI foram idênticas. Considerando apenas *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8, podemos assumir este resultado como uma possível variação na expressão fenotípica, pois as espécies apresentaram alterações em seu fenótipo em diferentes condições ambientais, aqui representada por hospedeiros de famílias diferentes (Hylidae e

Hylodidae) (Fusco e Minelli, 2010; Pigliucci *et al.*, 2006), sem sofrer alterações genéticas (Brooks *et al.*, 2006). Essa flexibilidade morfológica que o parasito apresenta, assim como o conservadorismo filogenético, é importante para a adaptação dos organismos a novas condições (Agosta e Klemens 2008). A plasticidade fenotípica pode superestimar a diversidade de organismos, influenciando em uma compreensão distorcida da diversidade e ecologia dos organismos de interesse (Pfennig *et al.*, 2010). Porém, diferente de *Rhabdias* sp.7 e *Rhabdias* sp.8 e *R. taquariensis* não compartilha o mesmo ambiente (foi coletada no Pantanal enquanto as outras na Floresta Atlântica do Paraná). Neste caso acreditamos que mais dados moleculares, como diferentes marcadores e sequências maiores, são necessários para avaliar a proximidade genética entre os espécimes.

Nas espécies que coletamos, observamos um padrão que *Rhabdias* spp. são predominantemente encontradas em hospedeiros terrestres, como *R. pseudosphaerocephala*, *R. elegans*, *R. breviensise* e *Rhabdias megacephala*. Hospedeiros do gênero *Rhinella* (Bufonidae) em particular são hospedeiros notáveis das espécies de *Rhabdias*. Esses anuros são cosmopolitas, no Brasil por exemplo, tem registro de ocorrência de espécies do norte ao sul. A ampla distribuição de *Rhinella* spp. pode ter contribuído para a dispersão e contato com diferentes hospedeiros. Além disso, as espécies de *Rhinella* na sua maioria estão associadas ao hábito terrestre, assim como as larvas infectantes de *Rhabdias*, o que as tornam eficazes na transmissão nematóides como *Rhabdias* spp. Baker (1979). Espécies de *Rhinella* são ancestrais na filogenia dos anuros, podendo ser um importante grupo na transmissão e dispersão das espécies de *Rhabdias*. Uma vez que as espécies de *Rhinella* geralmente tem grande tamanho corpóreo e se deslocam por grandes

distâncias (Fouquet *et al.*, 2024), elas podem promover grande oportunidade de encontro entre os estágios infectantes das spp. de *Rhabdias* e outras espécies de anuros. Essas características comportamentais e ecológicas de *Rhinella* spp., as indicam com um papel importante na transmissão e persistência dos parasitos em diversas espécies de hospedeiros (Kamiya *et al.*, 2014).

No entanto, também identificamos várias *Rhabdias* spp. infectando hospedeiros classificados como arbóreos. Por exemplo, encontramos *R. fuelleborni* em *S. perereca* e *B. circumdata*, *Rhabdias* sp.1 em *B. faber* e *R. fuelleborni* e *Rhabdias* sp.7 em *B. bischoffi* que são espécies arbóreas. Entretanto, foi possível observar que estes hospedeiros fazem amplo uso de habitat, por exemplo, mesmo sendo classificados como arbóreos, as espécies *B. bischoffi*, *B. faber*, *B. circumdata* e *S. perereca* são frequentemente encontradas em contato com o solo. Além disso, encontramos *R. af. elegans* em *L. notoaktites*, uma espécie semiaquática, mas que também observamos comportamentos terrestres durante as coletas. Isso indica que um dos grandes determinantes da infecção é a oportunidade de contato, que é contato com os estágios infectantes no solo.

Considerando que o ambiente do parasito é primariamente o hospedeiro, diferentes espécies de hospedeiros podem fornecer recursos similares. Nesse sentido, os parasitos podem se estabelecer em um novo hospedeiro sem ter altos custos de adaptação (*ecological fitting*) se houver oportunidade (Agosta e Klemens, 2008; Araujo *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2006). Observamos nas espécies que coletamos que algumas *Rhabdias* spp. como *R. af. fuelleborni* e *R. fuelleborni* tiveram a capacidade de se associar com diferentes espécies de hospedeiros (ex: *B. bischoffi*, *Rh. ornata*, *I. henselii*, *L. latrans*), o mesmo ocorre com *R. breviensis* que foi encontrada em hospedeiros de famílias distintas (Bufonidae, Hylidae,

Leptodactylidae e Odontophrynidae). A utilização de diferentes hospedeiros pelos parasitos pode ser um fator impulsionador na diversificação e na especiação, e o estudo da diversidade e repertório de hospedeiros das espécies de *Rhabdias* pode auxiliar na compreensão de dinâmicas evolutivas.

A hipótese da oscilação, que postula a existência de períodos de alta e baixa diversificação, influenciados por uma variedade de fatores ambientais e biológicos (Janz e Nylin, 2008), e o pulso taxonômico que se refere a um rápido surto de diversificação taxonômica devido a eventos ambientais significativos (Erwin, 1985) podem ajudar na compreensão da diferenciação de espécies. Por meio dos processos de expansão e isolamento que podem ocorrer entre os diferentes hospedeiros, esses mecanismos promovem o isolamento e a diversificação de espécies parasitas, fornecendo insights valiosos sobre como as espécies se diferenciam ao longo do tempo e em diferentes contextos ambientais (Agosta *et al.*, 2010; Janz e Nylin, 2008). Esses processos de diferenciação podem nos ajudar a entender um pouco mais sobre a diferenciação das espécies de *Rhabdias* (Agosta *et al.*, 2010). O processo de pulso taxonômico pode estar associado ao entendimento de complexos de espécies na filogenia como potenciais espécies novas, como *R. pseudosphaerocephala*, pois a eventual ‘troca’ de hospedeiro por parte do parasito pode isolar estas espécies reprodutivamente, e em algum momento levar a um processo de especiação.

Poucos dados moleculares são conhecidos para grande maioria das *Rhabdias*. Podemos observar quando realizamos o levantamento de dados de *Rhabdias* para a região neotropical que das 30 espécies relatadas, apenas 12 tem dados moleculares e desses 12, temos três morfotipos que não tem dados morfométricos (Tabela 1). Temos nos bancos de dados moleculares sequências de

DNA de *Rhabdias* encontradas em poucos ou um único hospedeiros, mas que na literatura existem registros dessas espécies em diversos hospedeiros como ocorre com *R. fuelleborni* (*Boana prasinus*, *Ischnocnema guentheri*, *Leptodactylus vastus*, *Rhinella dorbignyi*, *Rhinella ictérica* e *Rhinella diptycha*) e *R. breviensis* (*Leptodactylus petersii*, *Proceratophrys aridus*, *Rhinella granulosa*, *Leptodactylus fuscus*, *Scinax fuscovarius*, *Rhinella schneideri*) (Camião et al., 2014). Essa falta de dados limita propostas filogenéticas mais robustas.

Os resultados das análises moleculares, filogenéticas e de delimitação, destacam a importância de combinar dados morfológicos, moleculares, filogenéticos e da ecologia dos hospedeiros de forma integrativa para obtenção de resultados robustos. Além disso, demonstram o potencial do gene COI como uma ferramenta eficaz na detecção de espécies crípticas, que não podem ser diferenciadas apenas por características morfológicas. Outro resultado importante foi a síntese das informações existentes das *Rhabdias* spp. neotropicais, para saber o que de fato temos de informações desse grupo e o que ainda precisamos buscar conhecer. Na hipótese filogenética, ficou evidente que a escassez de dados é um obstáculo significativo para a construção de hipóteses sólidas. O desenvolvimento deste trabalho nos propiciou uma perspectiva mais abrangente sobre a variação, quantidade e qualidade das informações morfológicas e moleculares disponíveis para espécies de *Rhabdias*. Além disso, pudemos investigar detalhes relacionados à distribuição geográfica e ao uso de hospedeiros pelas espécies em estudo. Assim, esperamos que esses dados contribuam para o avanço na compreensão da diversidade de parasitos pulmonares do gênero *Rhabdias* e da complexidade das interações parasito-hospedeiro em ambientes naturais.

REFERÊNCIAS

- AGOSTA, S. J.; JANZ, N.; BROOKS, D. R. How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 2, p. 151–162, 2010.
- AGOSTA, S. J.; KLEMENS, J. A. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution: Ecological fitting. **Ecology Letters**, v. 11, n. 11, p. 1123–1134, 2008.
- ALCANTARA, E. P.; MÜLLER, M. I.; ÚNGARI, L. P.; et al. Integrative taxonomy in the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 from anuran in Brazil, description of two new species and phylogenetic analyses. **Parasitology International**, v. 93, p. 102714, 2023.
- ÁLVAREZ I.J.F.W.; WENDEL J. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 29, n. 3, p. 417–434, 2003.
- ARAUJO, S. B. L.; BRAGA, M. P.; BROOKS, D. R.; et al. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- BAKER, M. R. The free-living and parasitic development of *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) in amphibians. **Canadian Journal of Zoology**, v. 57, n. 1, p. 161–178, 1979.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.
- BLASCO-COSTA, I.; POULIN, R. Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 647–656, 2017.
- BROOKS, D. R.; LEÓN-RÉGAGNON, V.; MCLENNAN, D. A.; ZELMER, D. Ecological fitting as a determinant of the community structure of Platyhelminth parasites of anurans. **Ecology**, v. 87, n. sp7, p. S76–S85, 2006.
- BURSEY, C.; GOLDBERG, S. A new species of Aplectana (Nematoda, Cosmocercidae) in *Platymantis boulengeri* (Anura, Ceratobatrachidae) from Papua New Guinea. **Acta Parasitologica**, v. 52, n. 4, 2007. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11686-007-0049-5/html>>. Acesso em: 7/2/2023.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineoidae), new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), and other helminths in *Rana* cf. *forreri* (Anura: Ranidae) from Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 600–605, 2005.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R.; SILER, C. D.; BROWN, R. M. A new species of *Cosmocerca* (Nematoda: Cosmocercidae) and other helminths in *Cyrtodactylus gubaot* (Squamata: Gekkonidae) from the Philippines. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/ap.2015.60.issue-4/ap-2015-0096/ap-2015-0096.xml>>. Acesso em: 7/2/2023.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R.; TELFORD, S. R. *Rhabdias anolis* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from the lizard, *Anolis frenatus* (Sauria: Polychrotidae), from panama. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 1, 113–117, 2003.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R.; VITT, L. J. New species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) and other helminths from *Norops capito* (Sauria: Polychrotidae) from Nicaragua. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, 129–131, 2007.
- CAMPIÃO, K. M.; MORAIS, D. H.; DIAS, O. T.; et al. Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. **Zootaxa**, v. 3843, n. 1, p. 1, 2014.

- CAMPIÃO, K. M.; RIBAS, A. C. DE A.; MORAIS, D. H.; SILVA, R. J. DA; TAVARES, L. E. R. How Many Parasites Species a Frog Might Have? Determinants of Parasite Diversity in South American Anurans. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- CARSTENS, B. C.; PELLETIER, T. A.; REID, N. M.; SATLER, J. D. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.
- DE CÁSSIA SILVA DO NASCIMENTO, L.; GONÇALVES, E. C.; DE VASCONCELOS MELO, F. T.; et al. Description of *Rhabdias breviensis* n. sp. (Rhabditoidea: Rhabdiasidae) in two Neotropical frog species. **Systematic Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 69–75, 2013.
- COSTA-SILVA, G. J.; RODRIGUEZ, M. S.; ROXO, F. F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.
- DARE, O. K.; NADLER, S. A.; FORBES, M. R. Nematode lungworms of two species of anuran amphibians: Evidence for co-adaptation. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 14, p. 1729–1736, 2008.
- DE QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.
- DO NASCIMENTO E.R.; CORREIA I.; RUIZ-ESPARZA J.M.; GOUVEIA S.F. Disentangling phylogenetic from non-phylogenetic functional structure of bird assemblages in a tropical dry forest. **Oikos**, v. 127, n. 8, p. 1177–1185, 2018. <https://doi.org/10.1111/oik.04910>.
- DYER W.G. Augmented Description of *Aplectana travassosi* (Nematoda: Cosmocercidae) from Leptodactylid Frogs of Ecuador. **The Journal of Parasitology** v. 76, n. 5, p. 639, 1990. <https://doi.org/10.2307/3282974>.
- ERWIN, T. L. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. in **Taxonomy, phylogeny, and zoogeography of beetles and ant: A volume dedicated to the memory of Philip Jackson Darlington Jr.** 1904-1983, 437–472, 1985.
- EUCLYDES, L. Anuran's habitat use drives the functional diversity of nematode parasite communities. **Parasitol Research**, v.120, p. 993–1001, 2021.
- FONSECA, E. M.; DUCKETT, D. J.; CARSTENS, B. C. P2C2M.GMYC: An R package for assessing the utility of the Generalized Mixed Yule Coalescent model. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 487–493, 2021.
- FOUQUET, A.; FERRÃO, M.; RODRIGUES, M.; et al. Integrative species delimitation and biogeography of the *Rhinella margaritifera* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae) suggest an intense diversification throughout Amazonia during the last 10 million years. **Systematics and Biodiversity**, v. 22, 2024.
- FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; et al. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, p. e1109, 2007.
- FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.
- FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. **Systematic Biology**, v. 62, n. 5, p. 707–724, 2013.
- FUSCO, G.; MINELLI, A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1540, p. 547–556, 2010.

- GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R. Helminth parasites of seven anuran species from northwestern Mexico. **Western North American Naturalist**, v. 62, n. 2, p. 160–169, 2002.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- JANZ, N.; NYLIN, S. The Oscillation Hypothesis of Host-Plant Range and Speciation. in Kelley Tilmon (ed.), **Specialization, Speciation, and Radiation: The Evolutionary Biology of Herbivorous Insects**. 2012.
- KAMIYA, T.; O'DWYER, K.; NAKAGAWA, S.; POULIN, R. What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts: Determinants of parasite species richness. **Biological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 123–134, 2014.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.
- KUZMIN, Y. Review of Rhabdiasidae (Nematoda) from the Holarctic. **Zootaxa**, v. 3639, n. 1, p. 1, 2013.
- KUZMIN, Y.; DE VASCONCELOS MELO, F. T.; DOS SANTOS, J. N. A new species of *Serpentirhabdias* Tkach, Kuzmin & Snyder, 2014 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitic in the brown ground snake *Atractus major* Boulenger (Reptilia: Serpentes: Dipsadidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 101–106, 2014.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L. H.; JUNKER, K. Some nematodes of the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitising amphibians in French Guiana. **Folia Parasitologica**, v. 62, 2015a. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2015.031.html>>. Acesso em: 5/5/2024.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L.; NEL, T.; SVITIN, R. Three new species of *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitic in *Ptychadena* spp. (Amphibia: Anura: Ptychadenidae) and an identification key to *Rhabdias* spp. from Afrotropical anurans. **Parasitology International**, v. 91, p. 102649, 2022.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L. H.; JUNKER, K. Some nematodes of the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitising amphibians in French Guiana. **Folia Parasitologica**, v. 62, 2015b. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2015.031.html>>. Acesso em: 13/2/2023.
- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; BROOKS, D. R. Two new species of *Rhabdias* from the marine toad, *Bufo marinus* (L.) (Lissamphibia: Anura: Bufonidae), in Central America. **The journal of parasitology**, v. 93, n. 1, 2007.
- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; SNYDER, S. D. The Nematode Genus *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from Amphibians and Reptiles of the Nearctic. **Comparative Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 101–114, 2003.
- KUZMIN, Y.; VASCONCELOS MELO, F. T. DE; FILHO, H. F. DA S.; NASCIMENTO DOS SANTOS, J. Two new species of *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) from anuran amphibians in Para, Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 63, 2016. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2016.015.html>>. Acesso em: 7/2/2023.
- LANGFORD, G. J.; JANOVY, J. Comparative Life Cycles and Life Histories of North American *Rhabdias* Spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): Lungworms from Snakes and Anurans. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 1145–1155, 2009.

- LANGFORD, G. J.; JANOVY, J. Host Specificity of North American *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): Combining Field Data and Experimental Infections with a Molecular Phylogeny. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, 2013.
- MARTÍNEZ SALAZAR, E. A. Una especie nueva de rhabdiásido de Craugastor occidentalis (Anura: Brachycephalidae) de la sierra de Manantlán, Jalisco, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 79, n. 001, 2008. Disponível em: <<http://www.revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/535>>. Acesso em: 7/2/2023.
- MARTÍNEZ-SALAZAR, E. A. A new Rhabdiasid species from Norops megapholidotus (Sauria: Polychrotidae) from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1325–1329, 2006.
- MARTÍNEZ-SALAZAR, E. A.; LEÓN-RÈGAGNON, V. New species of Rhabdias (Nematoda: Rhabdiasidae) from Bufo occidentalis (anura: bufonidae) from Sierra Madre del Sur, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 5, p. 1171–1177, 2007.
- MELO, F. T. DE V.; NASCIMENTO, L. DE C. S. DO; MACEDO, L. C.; SANTOS, J. N. DOS; KUZMIN, Y. The morphology of free-living stages and immature parasites of Rhabdias paraensis (Nematoda: Rhabdiasidae), a parasite of Rhinella marina (Anura: Bufonidae) in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 61, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/ap.2016.61.issue-1/ap-2016-0004/ap-2016-0004.xml>>. Acesso em: 7/2/2023.
- MINH, B. Q.; SCHMIDT, H. A.; CHERNOMOR, O.; et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020.
- MORAIS, D. H.; MÜLLER, M. I.; MELO, F. T. V.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pseudopaludicola pocoto* (Anura: Leptodactylidae) from north-eastern Brazil: description and phylogenetic analyses. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e209, 2020.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; DA COSTA, L. F. S. T.; et al. Revisiting the taxonomy of *Rhabdias fuelleborni* Travassos, 1928 (Nematoda, Rhabdiasidae) with approaches to delimitation of species and notes on molecular phylogeny. **Parasitology International**, v. 92, p. 102692, 2023.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; COSTA-SILVA, G. J.; et al. Diversity in the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae): Evidence for cryptic speciation. **Zoologica Scripta**, v. 47, n. 5, p. 595–607, 2018.
- NASCIMENTO, E. R.; CORREIA, I.; RUIZ-ESPARZA, J. M.; GOUVEIA, S. F. Disentangling phylogenetic from non-phylogenetic functional structure of bird assemblages in a tropical dry forest. **Oikos**, v. 127, n. 8, p. 1177–1185, 2018.
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A. R. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 16, 2010.
- PFENNIG, D. W.; WUND, M. A.; SNELL-ROOD, E. C.; et al. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 8, p. 459–467, 2010.
- PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2362–2367, 2006.
- POULIN, R.; KEENEY, D. B. Host specificity under molecular and experimental scrutiny. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 1, 2008.

- POULIN, R.; MORAND, S. The Diversity of Parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–293, 2000.
- POULIN, R.; PRESSWELL, B.; JORGE, F. The state of fish parasite discovery and taxonomy: a critical assessment and a look forward. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 10–11, p. 733–742, 2020.
- PROSSER, SEAN. W. J.; VELARDE-AGUILAR, MARIA. G.; LEÓN-RÉGAGNON, VIRGINIA.; HEBERT, PAUL. D. N. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a-n/a, 2013.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Species Delimitation. In: Scornavacca, C and Delsuc, F and Galtier, N, (eds.) **Phylogenetics in the Genomic Era**. 2020.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; TESLENKO, M.; ZHANG, C.; NYLANDER, J. A. A. MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. 2003.
- SINGHAL, S.; HOSKIN, C. J.; COUPER, P.; POTTER, S.; MORITZ, C. A Framework for Resolving Cryptic Species: A Case Study from the Lizards of the Australian Wet Tropics. **Systematic Biology**, v. 67, n. 6, p. 1061–1075, 2018.
- STRUCK, T. H.; FEDER, J. L.; BENDIKSBY, M.; et al. Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, n. 3, p. 153–163, 2018.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.
- TAVARES-COSTA, L. F. S.; REBÊLO, G. L.; MÜLLER, M. I.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pristimantis chiastonotus* (Anura: Strabomantidae) from the Brazilian Amazon: description and phylogenetic analyses. **Parasitology Research**, v. 121, n. 1, p. 155–166, 2022.
- TKACH, V. V.; KUZMIN, Y.; SNYDER, S. D. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 273–284, 2014.
- TRAVASSOS L. Contribuições para o conhecimento da fauna helminthologica brasileira: XX. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 19, p. 31-125, 1926.
- WHEELER, Q. D. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 571–583, 2004.
- WILLKENS, Y.; REBÊLO, G. L.; SANTOS, J. N.; et al. *Rhabdias glaurungi* sp. nov. (Nematoda: Rhabdiasidae), parasite of *Scinax* gr. *ruber* (Laurenti, 1768) (Anura: Hylidae), from the Brazilian Amazon. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e54, 2020.
- XIA, X. DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1550–1552, 2018.

CAPÍTULO 3 – A NEW SPECIES OF LUNGWORM FROM THE ATLANTIC

FOREST: *Rhabdias megacephala* n. sp. PARASITE OF THE ENDEMIC ANURAN

Proceratophrys boiei

ABSTRACT

Rhabdias are lung-dwelling parasites of anurans and some reptiles. Currently, approximately 91 species are known that occur worldwide. The identification of *Rhabdias* species is based mainly on morphological traits of hermaphroditic females that generally have a very conserved morphology. However, different approaches, such as the combination of morphological, molecular, and ecological data, have provided advances in identifying and delimiting rhabdiasid species. Here, we describe a new species of *Rhabdias* from the South of Brazil, with morphological and molecular data. The new species is distinguished from its congeners by having an elongated body, evident cephalic dilation, larger buccal capsule, and large esophagus. Besides the morphological characteristics, we observed genetic a significant divergence among the COI sequence of new species and other *Rhabdias fuelleborni* (10.24%-10.87%). Additionally, phylogenetic reconstructions based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene indicate that the new species represents a different lineage, representing an outgroup of the species complexes *Rhabdias* cf. *stenocephala* and *Rhabdias fuelleborni* with *Rhabdias* sp. 4. Thus, *Rhabdias megacephala* is the 23rd nominal species of the Neotropical region, the 13th Brazilian, and the fourth species described from South of Brazil.

Keywords: Species diversity; taxonomy; molecular; parasitism; Atlantic Forest.

1. INTRODUCTION

Rhabdias Stiles and Hassall, 1905 are lung-dwelling parasites of amphibians and some reptiles (Kuzmin *et al.*, 2007, 2016), distributed worldwide, except for Antarctica (Kuzmin *et al.*, 2003, 2022). The genus is composed of 91 species, with 19 found parasitizing Neotropical hosts (Marcaida *et al.*, 2022; Müller *et al.*, 2023). In Brazil, eleven species of *Rhabdias* have been reported (da Silva *et al.*, 2013), which is a low number when compared to the diversity of known anurans for the region (137 species) (Santos-Pereira *et al.*, 2018).

Rhabdias species are very similar morphologically, and most species' descriptions were based mainly on morphological characteristics. Thus, the current identification and delimitation of species is still an issue and makes the taxonomic resolution difficult in most species inventories and ecological studies (Kuzmin, 2013; Tavares-Costa *et al.*, 2022). However, different approaches, combining morphological and molecular analyses, have contributed to the recognition and identification of new species (Langford & Janovy, 2013; Müller *et al.*, 2018; Tkach *et al.*, 2014). These studies point to the taxonomy of *Rhabdias* lungworms as a rising venue for research that may preclude the understanding of the diversification and phylogeography of such a fascinating group of organisms.

Proceratophrys boiei Wied-Neuwied, 1824 is a median-sized, nocturnal, and terrestrial anuran, found in the leaf litter of primary and secondary forests and also in degraded areas (Prado and Pombal Jr., 2008). This species is endemic in the Brazilian Atlantic Forest, occurring from southern Espírito Santo, southern and western Rio de Janeiro state into south São Paulo, and eastern Paraná to eastern Santa Catarina (Frost, 2024). Until now, six species of helminth parasites are known

for *Proceratophrys boiei*: *Aplectana delirae* (Fabio, 1971), *Cosmocerca parva* Travassos 1925, *Oxyascaris oxyascaris* Travassos, 1920, *Physaloptera* sp., Centrorhynchidae gen. sp., Physalopteridae gen. sp.1 (Camião *et al.*, 2014; Euclides *et al.*, 2022; Klaion *et al.*, 2011).

Euclides *et al.* (2021) report a species of *Rhabdias* parasitizing *P. boiei* that did not correspond to any known congeneric species. Thus, based on this material, we describe a new species of *Rhabdias* found in *Proceratophrys boiei* based on morphological, molecular, and phylogenetic data using the cytochrome oxidase subunit I (COI) DNA sequences of the mitochondrial DNA.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. HOST SAMPLING, PARASITE COLLECTION AND IDENTIFICATION

Between October 2018 and January 2019, 27 individuals of *Proceratophrys boiei* were collected in Marumbi State Park, municipality of Piraquara, Paraná State, Brazil (Mananciais da Serra - 25°30'22 "S; 45°01'41 "W) (Euclides *et al.*, 2021). The Marumbi State Park features a subtropical climate composed of forests with typical Atlantic Forest formations, consisting mainly of *Araucaria angustifolia*, the dominant tree species that characterizes this type of forest (Bergamini & Thomas 2011; Reginato & Goldenberg 2007). The anurans were euthanized with Lidocaine (4%) topically applied, and then the specimens were necropsied by a longitudinal incision in the anteroposterior axis on the ventral region of the body.

The lungs of the hosts were examined, and nematodes found were rinsed in saline solution, heat-killed, and stored in 70% alcohol for morphological identification.

Some specimens were preserved in 100% alcohol for molecular analysis. For morphological analysis, the nematodes were rehydrated in distilled water, cleared in lactophenol, mounted on temporary slides, and examined under an Olympus BX41 microscope coupled with a drawing tube. We also analyzed the morphology of the apical region of the anterior end, by manual sections using a razor blade, and posterior end face observations. The taxonomic illustrations were made using line drawings handmade and posteriorly prepared in CorelDraw 2018 and processed with Photoshop Version 21.0.2.

The measurements of the specimens are presented as the values of the holotype followed by the mean and range for the entire type series, both values in parentheses (reported in micrometers unless otherwise indicated). We deposited the type series of the new species in the Invertebrate collection of the Federal University of Paraná (Accession numbers: DZUP 541909-541913).

2.2. MOLECULAR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

The specimens preserved in absolute alcohol were sectioned in the anterior end (close to the esophagus-intestinal junction) and just after the posterior portion of the female reproductive system. The anterior and posterior parts were stored in absolute alcohol and deposited as the hologenophore (see, Pleijel *et al.*, 2008) in the parasitological section of the Invertebrate collection of the Federal University of Paraná.

We performed DNA extraction from the middle part of the parasite body using the Wizard® Genomic DNA extraction kit (Promega, Madison, USA), following the manufacturer's instructions. Then, the extracted DNA was submitted to a

conventional PCR with the previously designed primers (LCO1490/Foward - 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' and HC02198/Reverse - 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAA 3') (described by Folmer *et al.*, 1994), and the analysis of these amplified fragments was performed using 0.75% agarose gel electrophoresis. The fragments were visualized with ultraviolet light, and the corresponding fragments were cut and purified with the PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermofisher). After purification, the samples were submitted to PCR for sequencing, using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). These samples were analyzed by an ABI PRISM 3500 Genetic Analyser sequencer.

The sequences obtained were analyzed and assembled in the software The FinchTV Version 1.4.0. A search was carried out in BLASTn using the sequence obtained to investigate the existence of similar sequences in the NCBI database, considering only sequences with more than 90% similarity. Using the default parameters, we aligned the sequences in MAFFT v. 7 (Katoh & Standley, 2013). We cut the alignment ends and checked the stop codons in Geneious V.4.7. We evaluated the substitution saturation with the Iss index by testing the alignment data in DAMBE 7.3.32 software (Xia, 2018). We calculated the number of base substitutions between sequences. For the analyses to calculate estimates and standard error, we used the Kimura 2-parameter model using the MEGA 11 software package (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2021).

For phylogenetic analysis, we ran our aligned matrix using the software jModelTest 2.1.10 (Posada, 2008). The evolution model selected was GTR + I + G according to the Akaike Information Criterion (AIC). We performed phylogenetic reconstructions using Maximum Likelihood (ML) in the software IQ-Tree (Minh *et al.*,

2020) and Bayesian Inference (BI) in the program MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2003).

The ML inference used support values of 1000 repetitions (bootstrap), and only nodes with bootstrap values greater than 70% were considered supported. The BI was performed using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) search, with the following parameters: lset nst=6, rate=invgamma, ngammacat=4. Chains with 50,000,000 generations were executed, saving only 1,000 generations. On the burn-in of the first 25% of the generations, only nodes with posterior probability greater than 90% were considered well supported. As an outgroup, we chose *Serpentirhabdias viperidicus* Morais, Aguiar, Muller, Narciso, Silva and Silva, 2017 (KX350054), as used in other studies (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2018; Willkens *et al.*, 2020). We used FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2009), and Adobe Illustrator to visualize and edit the trees.

3. RESULTS

3.1. SYSTEMATICS

Family: Rhabdiasidae Railliet, 1915

Genus: *Rhabdias* Stiles and Hassall, 1905

Species: *Rhabdias megacephala* n. sp. Euclides, Melo & Campião, 2024

Taxonomic Summary

Type host: *Proceratophrys boiei* (Haddad, Pombal, and Bastos, 1996) (Amphibia: Odontophrynidae).

Type locality: Pico Marumbi State Park (Mananciais da Serra), Piraquara, Paraná, Brazil (25°29'23" S; 48°58'37" W).

Site of infection: Lungs

Numbers of specimens/hosts, prevalence, mean infection intensity and range: 87 nematodes were found in 27 frogs, P = 66.6%; 3.2 (1-14).

Type material: Holotype (DZUP: 541909) and 7 paratypes (DZUP: 541910-541913) were deposited in the Invertebrate collection of the Federal University of Paraná

GenBank, accession numbers: PP291576

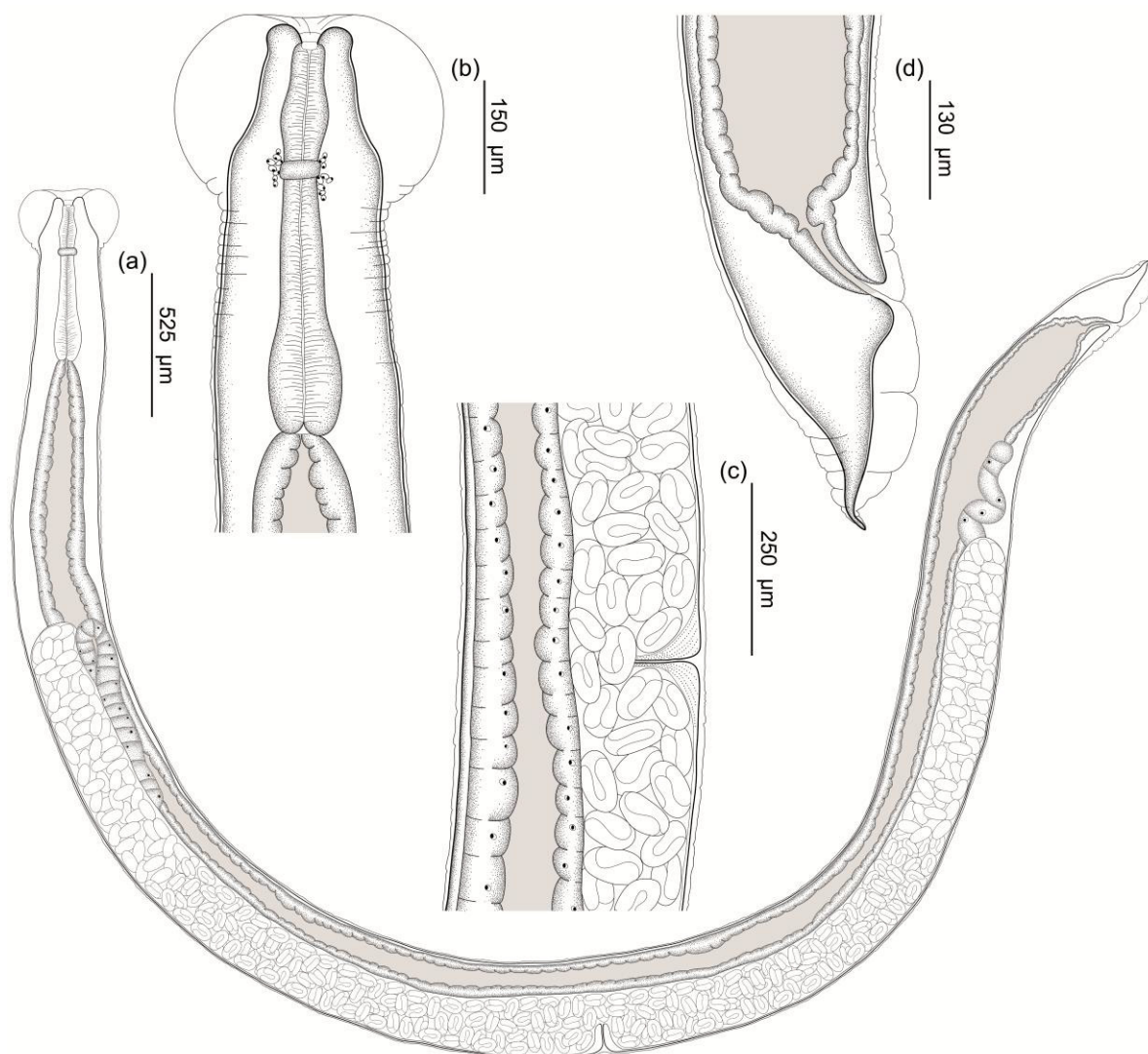
ZooBank Registration: The Life Science Identifier for *R. megacephala* n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:pub:C18FED99-0255-412A-AE0C-4A308282D919

Etymology: The specific name *megacephala* refers to the new species' highly distinguishing morphological feature, namely the prominent cuticular inflation around the cephalic end.

Description (Figure 1 and 2) - (Based on holotype and 7 paratypes, all gravid hermaphrodites). Body slender, long, 9.7 (9.1; 8.1–9.9) mm in length. Body surface covered by apparent cuticular inflation in anterior and posterior regions, discrete along entire body. Very prominent cuticular inflation in cephalic region 503 (508; 466–570) in width. Cephalic inflation rounded terminating at its connection to body wall at level of shoulder-like broadening of the body. Cuticular inflation close to shoulder-like broadening with two to three cuticular folds. Lateral pores arranged in two lines along cuticular inflation, connected by ducts with body wall. Cuticular inflation of tail prominent, with one large fold posterior to anus aperture, with second large fold reaching mid-length of tail, and followed by minor folds decreasing in size. Body width at vulva 502 (513.8; 416–623), at esophagus-intestine junction 355

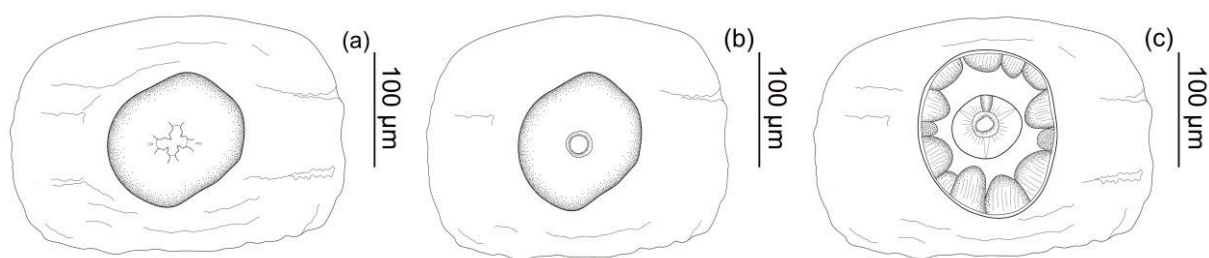
(359.8; 280–465). Oral opening with four enlarged and equidistant lips, situated very close to oral opening; each lip with terminal papilla on its inner edge; two amphids located laterally at some distance from oral opening. Vestibule circular in apical view, with narrow lumen. Buccal capsule cup-shaped 23 (15.2; 11–23) deep and 22 (26.3; 22–34) wide, with 1.04 (0.58; 0.46–1.04) depth/width ratio. Buccal capsule walls consisting of anterior part, with irregular internal surface and posterior one with smooth internal wall. Buccal capsule close to entrance of esophageal lumen with serrated surface. Entrance of esophagus lumen triangular, with serrated edges and esophageal gland located in dorsal region. Esophagus length 683 (722; 630–799), representing 7% (7.9%; 7–9%) of total body length, claviform, rounded apex and dilation at anterior muscular region. Width of anterior end of esophagus 78 (73.7; 60–88), width of anterior dilatation of esophagus 75 (75.7; 60–91), width posterior dilation of the esophagus 98 (98; 83–112), width of bulb 162 (154.8; 124–176). Nerve ring around esophagus after anterior dilatation at 152 (297.7; 152–503) from anterior region. Excretory pore not observed. Intestine thick-walled. Rectum short, funnel-shaped, lined with cuticle. Contents of intestine brown throughout length. Genital system amphidelphic, transverse vagina, slightly pos-equatorial vulva located 5.1 (4.7; 4.2–5.2) mm from anterior end, representing 52.2% (51.2%; 45.2–53.6%) of total body length. Uteri with thin walls and numerous eggs (>100), with larvated eggs close to the vulva. Egg size 103 (104.2; 86–114) x 51 (52.8; 40–61) (total of 24 eggs; tree eggs measured in each holotype and paratypes). Tail 293 (287.6; 244–338), represents 3% (3.1%; 2.6–3.8%) of body. Phasmid were not observed.

FIGURE 1 – LINE DRAWINGS OF *Rhabdias megacephala* n. sp. FROM *Proceratophrys boiei*. A - ENTIRE BODY, LATERAL VIEW. B - ANTERIOR END OF THE BODY, LATERAL VIEW. C - VULVA REGION, LATERAL VIEW. D - CAUDAL END, LATERAL VIEW.



FONTE: Euclides *et al.*, 2024 (*In press*)

FIGURE 2 – LINE DRAWINGS OF CROSS SECTIONS OF ANTERIOR END AND FACE VIEW OF *Rhabdias megacephala* n. sp. FROM *Proceratophrys boiei*. A - ANTERIOR EXTREMITY END FACE VIEW. B - OPTICAL SECTION THROUGH ANTERIOR PART OF BUCCAL CAPSULE. C - OPTICAL SECTION THROUGH POSTERIOR PART OF BUCCAL CAPSULE.



FONTE: Euclides *et al.*, 2024 (*In press*)

3.2. REMARKS

Rhabdias megacephala n. sp. belongs to the genus *Rhabdias* because it has the following morphological characteristics: buccal capsule, inflated external cuticle, amphidelphic genital system, conical tail, and it is a parasite of the lungs of an anuran (Kuzmin *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2018; Tavares-Costa *et al.*, 2022). *Rhabdias megacephala* n. sp. has a unique set of morphological characters: a prominent cephalic cuticular dilatation, distinct from the other species, position of the nerve ring located at the anterior end of the esophagus, depth and diameter of the buccal capsule and length of the esophagus.

The morphology of the apical region of *Rhabdias* spp. and the host biogeographical distribution are helpful in species differentiation. *Rhabdias megacephala* presents an oral opening surrounded by four lips, similar to *Rhabdias leonae* Martínez-Salazar, 2006 and *Rhabdias savagei* Bursey & Goldberg, 2005 found in the Neotropical region. *Rhabdias leonae* is found in the lizard *Anolis megapholidotus* Smyth, 1933 from Mexico differs from *R. megacephala* n. sp. by having a deeper buccal capsule (*R. leonae* 23–34 vs *R. megacephala* n. sp. 11–23) and smaller width (*R. leonae* 11–19 vs *R. megacephala* n. sp. 22–34) (Martínez-Salazar, 2006).

Rhabdias savagei described in *Rana* cf. *forreri* collected in Costa Rica (Boulenger, 1883), despite having four lips like *R. megacephala* n. sp., differs by having a much smaller body (*R. savagei* 4.2–5.3 mm vs *R. megacephala* n. sp. 8.1–9.9 mm). Additionally, its buccal capsule is also smaller (*R. savagei* 18–24x 12–18 vs *R. megacephala* n. sp. 22–34 x 11–23) (Bursey & Goldberg, 2005).

Rhabdias hermaphrodita Kloss, 1971, is a Neotropical species that has no information regarding the oral structures arrangement, with scarce morphological information, mainly concerning the presence/absence and arrangement of lips or pseudolabia. *Rhabdias hermaphrodita* was described in *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821). Some morphological measurements can be compared to differentiate it from *R. megacephala* n. sp., such as the body can measure up to 12 mm, which is larger than that of *R. megacephala* n. sp. (8.1–9.9 mm). The tail of *R. hermaphrodita* is also larger, measuring up to 524 and *R. megacephala* n. sp. between 244–338. *Rhabdias hermaphrodita* has no evident dilatation like *R. megacephala* n. sp. (Kloss, 1971).

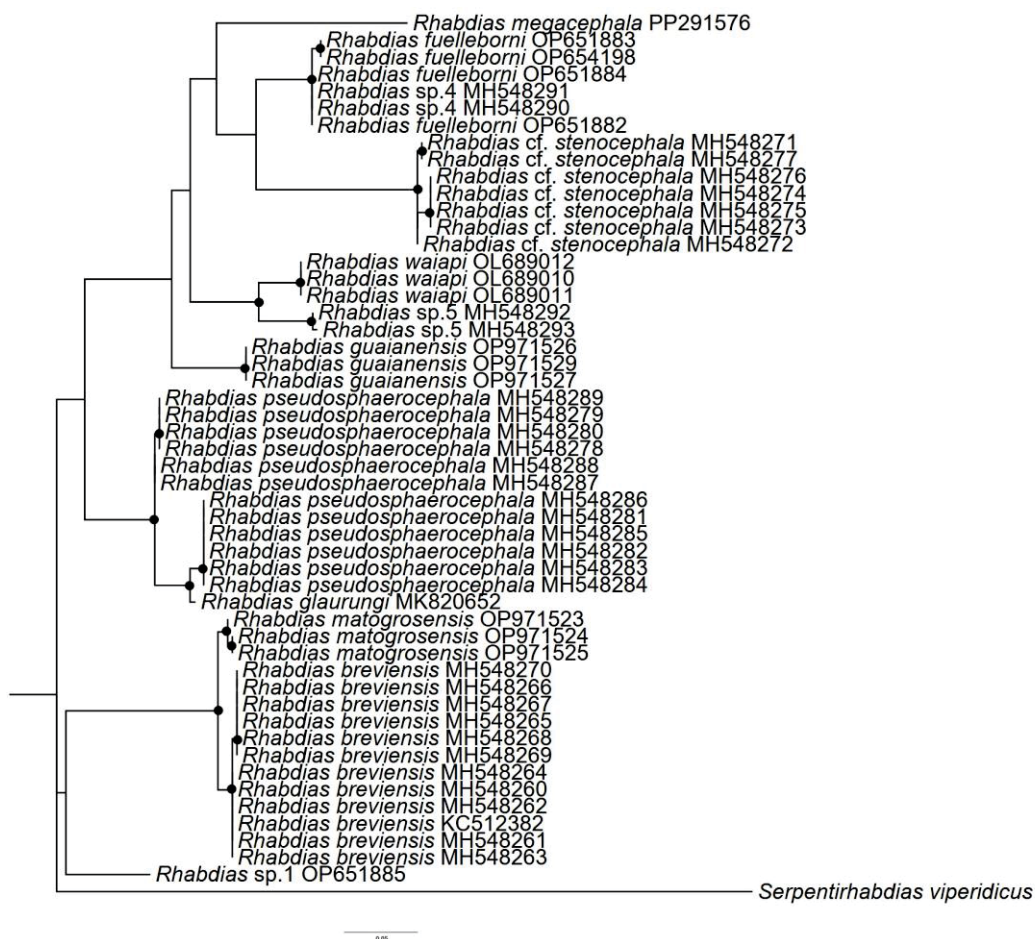
The most important characteristic of *R. megacephala* regarding its prominent cephalic expansion is similar to *R. androgyna* (*R. megacephala* n. sp. 466–570 x *R. androgyna* 273–706). *Rhabdias androgyna* Kloss, 1971 described in *Rhinella* gr. *margaritifera* (Laurenti, 1768) is similar to *R. megacephala* n. sp. in the shape of the cuticle dilation around the cephalic region. However, *R. androgyna* differs from *R. megacephala* n. sp. in having a cephalic dilation that divides into outer and inner layers, whereas *R. megacephala* n. sp. lacks this division and is formed by a single layer. Additionally, *R. androgyna* exhibits a cephalic dilation more oriented towards the apical region, while *R. megacephala* n. sp. presents a distinctly rounded cephalic dilation. Moreover, for species differentiation, we considered molecular data to make the distinction more integrative, given the well-conserved morphology of *Rhabdias*. (Kloss, 1971).

3.3. MOLECULAR ANALYSIS AND PHYLOGENETIC STUDY

We obtained a sequence of 630 bases pairs from the COI of *R. megacephala* n. sp. After comparing the new sequence with previously deposited in GenBank using the BLASTn (available at NCBI), we found no other sequence with 100% of similarity. Genetic distances indicated that *R. megacephala* n. sp. is closest to the species *Rhabdias fuelleborni* (OP651882, OP651884) from *Rhinella diptycha* and *Rhinella icterica*, Paraty, Brazil (Müller *et al.*, 2023), with a genetic divergence of 10.24% (see Supplementary Table S1).

After aligning our sequence and GenBank sequences, we obtained a database with 52 sequences of 380 bases pairs in length (Supplementary material). The Iss index indicated no saturation in transitions or transversions and Iss.c values were greater than Iss values. The phylogenetic inferences of maximum likelihood and Bayesian inference showed similar topologies, as did the bootstrap support values (B) and posterior probability (PP). The *R. megacephala* n. sp. sequence is grouped with species complex *Rhabdias* cf. *stenocephala* (MH548271–MH548277) and the species complex formed by *R. fuelleborni* (OP651882–OP651884, OP654198) and *Rhabdias* sp. 4 (MH548291–MH548292), representing an outgroup of this clade formed by the two species complex (Figure 3). The phylogenetic position of *R. megacephala* n. sp. was not well-supported by the values of B (58) and PP (56). However, we found other well-supported lineages: *R. matogrossensis* + *R. breviensis* species complex, *R. fuelleborni* + *Rhabdias* sp. 4, *R. waiapi* + *Rhabdias* sp. 5 and *R. pseudosphaerocephala* species complex, which indicates that more data is need for a robust phylogenetic hypothesis.

FIGURA 3 – PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION TOPOLOGY RECOVERED BY MAXIMUM LIKELIHOOD (ML) AND BAYESIAN INFERENCE (BI) RHABDIAS SPP. USING PARTIAL COI GENE AND SHOWING THE POSITION OF *Rhabdias megacephala* n. sp. (IN BOLD). *Serpentirhabdias viperidicus* IS THE OUTGROUP. BLACK CIRCLES DEPICT SUPPORT VALUES OF POSTERIOR PROBABILITY <0.90 (BI) AND BOOTSTRAP <70 (ML). IT IS NOTEWORTHY THAT THE TOPOLOGIES ARE IDENTICAL.



FONTE: Euclides *et al.*, 2024 (In press)

4. DISCUSSION

Rhabdias megacephala n. sp. is the 23th species of *Rhabdias* from the Neotropical region. The new species is distinguished mainly by evident cephalic dilatation and size of the buccal capsule. Characteristics of apical structures arrangement of *Rhabdias* are important for species differentiation, such as the presence/absence of lips or pseudolabia, as well as the arrangement of these

structures (Kuzmin *et al.*, 2007; Tkach *et al.*, 2014; Travassos, 1930). Species from the neotropical region can be split into three different groups based on the arrangement of apical structures: without lips or pseudolabia, with 4 submedial lips and two lateral pseudolabia and with 6 lips (Müller *et al.*, 2018; Tkach *et al.*, 2014).

Bursey & Goldberg (2005) identified a group of *Rhabdias* characterized by having four lips, of which only two species, *Rhabdias leonae* and *Rhabdias savagei*, have been described in the Neotropical region. *Rhabdias megacephala* n. sp. shares this distinctive feature, marking the third Neotropical species exhibiting the presence of these four lips. However, it differs in having a circular shaped vestibule in apical view, which does not have papillae around the oral opening. Another feature used in distinguishing species of the genus is the external cuticular inflation (Müller *et al.*, 2023).

The sequence of *R. megacephala* n. sp. showed a high degree of divergence 13.09% (11.9%) compared to the most divergent species, *R. cf. stenocephala*, and compared to the other 52 sequences (12 species) analyzed (see Supplementary Table S1). Available phylogenies of *Rhabdias* have been proposed based on short sequences of the COI gene, and in this paper, we used a similar analysis. (Figure 3) (Morais *et al.*, 2020; Tavares-Costa *et al.*, 2022). In fact, the phylogenetic inferences, *R. megacephala* n. sp. remained, with low support, as an outgroup of two clades formed by the species complex *Rhabdias cf. stenocephala*, and the species *R. fuelleborni* and *Rhabdias* sp. 4. The low support might be related to the geographic distance between *Rhabdias* species and could also be a consequence of using short COI sequences.

Willkens *et al.* (2020) pointed out that for species from Brazil, more than geographical distance is needed to explain the high divergence in the sequences

and, consequently, in the absence of phylogenetic support. However, one hypothesis to explain the high divergence of *R. megacephala* n. sp. from the other species from Brazil is the fragmentation of the Pan-Amazonian area in the early Pleistocene (Hoorn *et al.*, 2010; Sobral-Souza *et al.*, 2015; Tavares-Costa *et al.*, 2022). Pan-Amazonian fragmentation may have caused species to suffer different selective pressures according to the biome they were exposed to, enough time to distance *Rhabdias* species, forming a phylogenetic gap. Additional molecular sequences are necessary for more robust phylogenetic hypotheses, ideally with a larger number of base pairs. Furthermore, increased specimen collections from a broader range of locations are also essential.

The differentiation of species, as observed in *Rhabdias*, is a complex phenomenon that can occur through various processes. These processes involve intrinsic characteristics of the species itself or factors related to the hosts. Numerous studies have been dedicated to investigating these mechanisms, including morphological traits, genetic divergence, ecological adaptations, and functional characteristics of the parasite, providing a comprehensive understanding of parasite diversity and the elements influencing it (Kamiya *et al.*, 2014; Poulin, 2011). This pursuit is particularly crucial in the context of species descriptions, where unraveling the intricacies of differentiation processes contributes to the broader scientific knowledge of parasitology.

Rhabdias species occur on most continents, except Antarctica, and the distribution of these parasites is limited by the distribution of the hosts, both anurans and reptiles (Kuzmin *et al.*, 2015; Tkach *et al.*, 2014). In South America, *Rhabdias* species are known for more than 22 host species (Alcantara *et al.*, 2023; Campiã *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2023). Among the diversity of anuran parasites, 13 nominal

species of the family Rhabdiasidae are known in Brazil (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2023). However, when we consider the diversity of *Proceratophrys* species (43 species) and of anurans known in Brazil (1,252 species), the diversity of *Rhabdias* is still poorly known (Frost, 2024). For *P. boiei*, in addition to the record of *R. megacephala* n. sp., had been reported as host to an unidentified species of *Rhabdias* (*Rhabdias* sp.) (Aguilar *et al.*, 2018). *Rhabdias* are also known in other species of *Proceratophrys*: *R. androgyna* was reported for *Proceratophrys tupinamba* (Boquimpani-Freitas *et al.*, 2001; Prado & Pombal Jr., 2008). Other unidentified *Rhabdias* spp. have been reported in *Proceratophrys aridus* and *Proceratophrys mantiqueira* (Almeida-Santos, 2017; Müller *et al.*, 2018; Teles *et al.*, 2017). Given the description of *R. megacephala* n. sp., in comparison with other as yet undescribed species, there arises curiosity in understanding its distribution. Could *R. megacephala* n. sp. be endemic, or might the undescribed species actually be *R. megacephala* n. sp.? Aspects such as phenotypic similarities, habitat sharing, exposure to the same infective stages, and phylogenetically conserved resources among hosts may influence the exchange or share of different hosts (D’Bastiani *et al.*, 2020; Euclides *et al.*, 2022; Fecchio *et al.*, 2019).

Knowledge of *Rhabdias* diversity has increased, especially in recent years with species description, phylogenetic, and geographic studies (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2018; Tavares-Costa *et al.*, 2022). Most species were reported in the North and Midwest regions of Brazil, mainly in the Amazon region (7 species) (Müller *et al.*, 2023; Tavares-Costa *et al.*, 2022; Willkens *et al.*, 2020). The knowledge of this group of parasites in these localities may be due to a greater study effort. In the Atlantic Forest, studies show how significant the parasitic diversity of anurans is, but for *Rhabdias* species, knowledge of the diversity is still

underestimated (Euclides *et al.*, 2021; Martins-Sobrinho *et al.*, 2017). We describe the 23rd species of *Rhabdias*, the first species documented in Paraná. *Rhabdias megacephala* n. sp. is also the first described species in *P. boiei*. Discovering parasites such as *Rhabdias* is fundamental to unveiling ecosystem diversity, species evolution, and host-parasite relationship to understand more about the evolutionary history of this cosmopolitan group prevalent among anurans.

REFERENCES

- AGUIAR, A.; ANJOS, L. A.; NOMURA, H. A. Q.; et al. Helminth community structure of 13 species of anurans from Atlantic rainforest remnants, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 92, n. 4, p. 438–444, 2018. Cambridge University Press.
- ALCANTARA, E. P.; MÜLLER, M. I.; ÚNGARI, L. P.; et al. Integrative taxonomy in the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 from anuran in Brazil, description of two new species and phylogenetic analyses. **Parasitology International**, v. 93, p. 102714, 2023.
- ALMEIDA-SANTOS, M. Ecological aspects of the horned leaf-frog *Proceratophrys mantiqueira* (Odontophrynidae) in an Atlantic Rainforest area of southeastern Brazil. **Salamandra** v. 53, n. 3, 413–422, 2017.
- BERGAMINI, M.; THOMAS, C. Arboreal Diversity of the Atlantic Forest of Southern Brazil: From the Beach Ridges to the Paraná River. In: O. Grillo (Org.); **The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution**, 2011. InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/the-dynamical-processes-of-biodiversity-case-studies-of-evolution-and-spatial-distribution/arboreal-diversity-of-the-atlantic-forest-of-southern-brazil-from-the-beach-ridges-to-the-parana-riv>>. Acesso em: 7/2/2023.
- BOQUIMPANI-FREITAS, L.; VRCIBRADIC, D.; VICENTE, J. J.; BURSEY, C. R.; ROCHA, C. F. D. Helminths of the horned leaf frog, *Proceratophrys appendiculata*, from southeastern Brazil. **Journal of Helminthology** v.75, n. 3, 2001.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineoidae), new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), and other helminths in *Rana* cf. *forreri* (Anura: Ranidae) from Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 600–605, 2005.
- CAMPIÃO, K. M.; MORAIS, D. H.; DIAS, O. T.; et al. Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. **Zootaxa**, v. 3843, n. 1, p. 1, 2014.
- DE CÁSSIA SILVA DO NASCIMENTO, L.; GONÇALVES, E. C.; DE VASCONCELOS MELO, F. T.; et al. Description of *Rhabdias breviensis* n. sp. (Rhabditoidea: Rhabdiasidae) in two Neotropical frog species. **Systematic Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 69–75, 2013.
- D'BASTIANI, E.; CAMPIÃO, K. M.; BOEGER, W. A.; ARAÚJO, S. B. L. The role of ecological opportunity in shaping host–parasite networks. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1452–1460, 2020.
- EUCLYDES, L. Anuran's habitat use drives the functional diversity of nematode parasite communities. **Parasitol Research**, v.120, p. 993–1001, 2021.
- EUCLYDES, L.; DE LA TORRE, G. M.; DUDCZAK, A. C.; MELO, F. T. DE V.; CAMPIÃO, K. M. Ecological specificity explains infection parameters of anuran parasites at different scales. **Parasitology**, p. 1–8, 2022.
- FECCHIO, A.; WELLS, K.; BELL, J. A.; et al. Climate variation influences host specificity in avian malaria parasites. **Ecology Letters**, v. 22, n. 3, p. 547–557, 2019.
- FROST D.R. Amphibian Species of the World 2024: an online reference. Version 6.2 American Museum of Natural History. Available at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acessado em 13 jan. 2024.
- HADDAD C.F.B.; SAZIMA I. Anfíbios anuros da Serra do Japi, p. 188-211. In: L.P.C. Morellato (Ed.). **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Campinas, Editora Unicamp/Fapesp, p. 321, 1992.

- HADDAD C.F.B.; TOLEDO L.F.; PRADO C.P.A.; LOEBMANN D.; GASPARINI J.L.; SAZIMA I. Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia, 1st Edn. São Paulo, Brazil: Anolis, 2013.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; et al. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. **Science**, v. 330, n. 6006, p. 927–931, 2010.
- IUCN. The IUCN red list of threatened species. Version 2017-3. Available at <http://www.iucnredlist.org>, 2017. Acessado em 21 jan 2024.
- KAMIYA, T.; O'DWYER, K.; NAKAGAWA, S.; POULIN, R. What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts: Determinants of parasite species richness. **Biological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 123–134, 2014.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.
- KLAION, T.; ALMEIDA-GOMES, M.; TAVARES, L. E. R.; ROCHA, C. F. D.; SLUYS, M. V. Diet and nematode infection in *Proceratophrys boiei* (Anura: Cycloramphidae) from two Atlantic rainforest remnants in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1303–1312, 2011.
- KLOSS G.R. Alguns Rhabdias (Nematoda) de Bufo no Brasil. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia de São Paulo**, v. 24, n. 1, p. 1–52, 1971.
- KUZMIN, Y. Review of Rhabdiasidae (Nematoda) from the Holarctic. **Zootaxa**, v. 3639, n. 1, p. 1, 2013.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L. H.; JUNKER, K. Some nematodes of the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitising amphibians in French Guiana. **Folia Parasitologica**, v. 62, 2015. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2015.031.html>>. Acesso em: 5/5/2024.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L.; NEL, T.; SVITIN, R. Three new species of *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitic in *Ptychadena* spp. (Amphibia: Anura: Ptychadenidae) and an identification key to *Rhabdias* spp. from Afrotropical anurans. **Parasitology International**, v. 91, p. 102649, 2022.
- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; BROOKS, D. R. Two new species of Rhabdiasids from the marine toad, *Bufo marinus* (L.) (Lissamphibia: Anura: Bufonidae), in Central America. **The journal of parasitology**, v. 93, n. 1, 2007.
- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; SNYDER, S. D. The Nematode Genus *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from Amphibians and Reptiles of the Nearctic. **Comparative Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 101–114, 2003.
- KUZMIN, Y.; VASCONCELOS MELO, F. T. DE; FILHO, H. F. DA S.; NASCIMENTO DOS SANTOS, J. Two new species of *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) from anuran amphibians in Para, Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 63, 2016. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2016.015.html>>. Acesso em: 7/2/2023.
- LANGFORD, G. J.; JANOVY, J. Host Specificity of North American *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): Combining Field Data and Experimental Infections with a Molecular Phylogeny. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, 2013.
- MARCAIDA, A. J. B.; NAKAO, M.; FUKUTANI, K.; NISHIKAWA, K.; URABE, M. Phylogeography of *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) collected from *Bufo*

- species in Honshu, Shikoku, and Kyushu, Japan including possible cryptic species. **Parasitology International**, v. 90, p. 102612, 2022.
- MARTÍNEZ-SALAZAR, E. A. A new Rhabdiasid species from *Norops megapholidotus* (Sauria: Polychrotidae) from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1325–1329, 2006.
- MARTINS-SOBRINHO, P. M.; SILVA, W. G. D. O.; SANTOS, E. G. D.; MOURA, G. J. B. D.; OLIVEIRA, J. B. D. Helminths of some tree frogs of the families Hylidae and Phyllomedusidae in an Atlantic rainforest fragment, Brazil. **Journal of Natural History**, v. 51, n. 27–28, p. 1639–1648, 2017.
- MINH, B. Q.; SCHMIDT, H. A.; CHERNOMOR, O.; et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020.
- MORAIS, D. H.; MÜLLER, M. I.; MELO, F. T. V.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pseudopaludicola pocoto* (Anura: Leptodactylidae) from north-eastern Brazil: description and phylogenetic analyses. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e209, 2020.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; DA COSTA, L. F. S. T.; et al. Revisiting the taxonomy of *Rhabdias fuelleborni* Travassos, 1928 (Nematoda, Rhabdiasidae) with approaches to delimitation of species and notes on molecular phylogeny. **Parasitology International**, v. 92, p. 102692, 2023.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; COSTA-SILVA, G. J.; et al. Diversity in the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae): Evidence for cryptic speciation. **Zoologica Scripta**, v. 47, n. 5, p. 595–607, 2018.
- PLEIJEL, F.; JONDELIUS, U.; NORLINDER, E.; et al. Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 1, p. 369–371, 2008.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- POULIN, R. Host specificity in phylogenetic and geographic space. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, 2011.
- PRADO, G. M.; POMBAL JR., J. P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39, n. 1, p. 1, 2008.
- RAMBAUT A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. 2010.
- REGINATO, M.; GOLDENBERG, R. Análise florística, estrutural e fitogeográfica da vegetação em região de transição entre as Florestas Ombrófilas Mista e Densa Montana, Piraquara, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 34, n. 3, p. 349–360, 2007.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; TESLENKO, M.; ZHANG, C.; NYLANDER, J. A. A. MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. 2003.
- SANTOS-PEREIRA, M.; POMBAL JR., J. P.; ROCHA, C. F. D. Anuran amphibians in state of Paraná, southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032018000300203&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 13/2/2023.
- SOBRAL-SOUSA, T.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; SOLFERINI, V. N. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 643–655, 2015.

- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.
- TAVARES-COSTA, L. F. S.; REBÊLO, G. L.; MÜLLER, M. I.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pristimantis chiastonotus* (Anura: Strabomantidae) from the Brazilian Amazon: description and phylogenetic analyses. **Parasitology Research**, v. 121, n. 1, p. 155–166, 2022.
- TELES D.A.; BRITO S.V.; FILHO J.A.A.; DIAS D.Q.; ÁVILA R.W.; ALMEIDA W.O. Nematode parasites of *Proceratophrys aridus* (Anura: Odontophrynidae), endemic frog of the Caatinga domain of the Neotropical Region, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 10, p. 525–527, 2017.
- TKACH, V. V.; KUZMIN, Y.; SNYDER, S. D. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 273–284, 2014.
- WILLKENS, Y.; REBÊLO, G. L.; SANTOS, J. N.; et al. *Rhabdias glaurungi* sp. nov. (Nematoda: Rhabdiasidae), parasite of *Scinax* gr. *ruber* (Laurenti, 1768) (Anura: Hylidae), from the Brazilian Amazon. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e54, 2020.
- XIA, X. DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1550–1552, 2018.

CAPÍTULO 4 – *Rhabdias taquariensis* n. sp., EVIDÊNCIAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DE UMA NOVA ESPÉCIE DE PARASITO PULMONAR DE *Physalaemus albonotatus* DO PANTANAL

RESUMO

A diversidade de *Rhabdias* Stiles e Hassall compreende espécies que parasitam os pulmões de anuros e alguns répteis. São conhecidas aproximadamente 93 espécies distribuídas no mundo, sendo mais de 20 espécies encontradas na região Neotropical. No Brasil, existem aproximadamente 10 espécies nominais, um número baixo quando comparamos com a diversidade de hospedeiros. Espécies de *Rhabdias* têm estruturas da região cefálica como as principais características para identificação e descrição. Porém devido à semelhança morfológica entre as espécies, essa abordagem pode ser limitada, o que destaca a importância da inclusão de dados moleculares para propostas de identificações mais robustas. Descrevemos aqui uma nova espécie de *Rhabdias*, em *Physalaemus albonotatus*, com dados morfológicos, moleculares e análises filogenéticas utilizando sequências do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI). *Rhabdias taquariensis* n. sp. se diferencia das outras espécies conhecidas por apresentar o formato interno da dilatação cefálica bem evidente. Nas análises moleculares observamos que *R. taquariensis* n. sp. tem uma divergência significativa da sua sequência do COI de 13,6% com o complexo de espécies *Rhabdias* cf. *stenocephala*. Também observamos que as reconstruções filogenéticas baseadas no COI, indicam que a nova espécie representa uma linhagem diferente, externa a um clado formado por espécies como *Rhabdias fuelleborni*, *Rhabdias* cf. *stenocephala* e *Rhabdias waiapi*. *Rhabdias taquariensis* n. sp. é a 24ª espécie descrita na região Neotropical, 14ª no Brasil e 1ª espécie descrita no Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: Nematoda; Rhabdiasidae; diversidade de parasitos; taxonomia

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de *Rhabdias* é estimada em 93 espécies conhecidas no mundo, com 23 espécies identificadas na região Neotropical (Alcantara *et al.*, 2023; Marcaida *et al.*, 2022; Müller *et al.*, 2018). Quando vamos para uma escala menor, como o número de espécies no Brasil, esse número é menor ainda sendo 13 espécies nominais (Alcantara *et al.*, 2023, da Silva *et al.*, 2019). O número de *Rhabdias* com identificações específicas é muito baixa quando comparamos com a diversidade de hospedeiros anuros que existem (1189 espécies no Brasil, por exemplo) (Frost, 2024). Além disso, existem vários registros de espécies de *Rhabdias* sem descrição específica em hospedeiros distintos (Camião *et al.*, 2014; Martins-Sobrinho *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2018; Prosser *et al.*, 2013), demonstrando que são parasitos relativamente comuns. Entretanto, ainda sabemos pouco sobre aspectos como a especificidade das *Rhabdias*, dificultando a diferenciação entre espécies que possam ser generalistas, como *Rhabdias fuelleborni*, ou de espécies crípticas ainda não identificadas.

A identificação das *Rhabdias* é realizada na sua maioria através de caracteres morfológicos de adultos hermafroditas (Kuzmin 2013; Tkach *et al.*, 2014). Entretanto, a morfologia desse grupo é muito semelhante, o que pode ser um fator limitante na identificação e delimitação de espécies, além de prejudicar estudos ecológicos, subestimando ou superestimando a diversidade de *Rhabdias* (Kuzmin, 2013; Tavares-Costa *et al.*, 2022). Para evitar identificações errôneas deste grupo, a inclusão dados moleculares juntamente com dados morfológicos, auxiliam na proposta de hipóteses de espécies novas mais robustas (Langford e Janovy, 2013; Müller *et al.*, 2018; Poulin *et al.*, 2019; Tkach *et al.*, 2014).

Espécies de *Rhabdias* têm um ciclo de vida que envolve fêmeas parasitos e machos de vida livre, ciclo de vida heterogônico (Kuzmin, 2013; Tkach *et al.*, 2014). Durante o estágio parasitário, esses organismos hermafroditas produzem ovos que são expelidos no ambiente por meio das fezes do hospedeiro. Após a eclosão no ambiente, os ovos iniciam sua fase de vida livre, assim formas infectantes penetram na pele dos hospedeiros e se estabelecem nos pulmões, alimentando-se de sangue (Baker 1979; Langford e Janovy 2009). A presença de larvas infectantes no solo pode estar associada com a alta incidência de *Rhabdias* em hospedeiros que são de hábito terrestre como *Physalaemus albonotatus* (Kuzmin *et al.*, 2016).

Anuros do gênero *Physalaemus* tem uma distribuição amplamente conhecida desde o norte e centro da Argentina, leste da Bolívia, Paraguai, Uruguai, Brasil e Guianas até as planícies do sul da Venezuela e llanos do sudeste da Colômbia (Frost, 2024). *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) é uma espécie composta por indivíduos pequenos (18.6 mm - 24.1 mm) e noturnos, que ocorrem no solo, próximos a corpos d'água ou em pastagens inundadas para reprodução (IUCN, 2023). Esta espécie tem mostrado resistência a perturbações humanas no seu habitat (IUCN, 2023). Atualmente são conhecidas 12 espécies de parasitos em *P. albonotatus*, na sua maioria do filo Nematoda (Camião *et al.*, 2015, 2016; González *et al.*, 2019; González e Hamann 2012).

Neste trabalho descrevemos uma nova espécie de *Rhabdias* em *P. albonotatus* com dados morfológicos, moleculares e análises filogenéticas usando sequência de DNA do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DE HOSPEDEIROS, PARASITA E IDENTIFICAÇÃO

Coletamos 32 indivíduos de *Physalaemus albonotatus*, entre 28 e 29 de janeiro de 2018, por busca visual e auditiva (Crump & Scott Jr., 1994), no Parque Estadual das Nascentes do Rio Taquari (17°59' a 18°15'S; 53°10' a 53°26'W). O parque está localizado na transição dos biomas Cerrado e Pantanal, formando um importante corredor ecológico, a vegetação é de Savana Arbórea Densa (Cerradão) e Floresta Estacional Semidecidual (IMASUL, 2009). Os anuros coletados foram anestesiados e eutanasiados com lidocaína (4%) aplicado topicamente na região ventral do corpo, os espécimes foram eutanasiados com uma incisão na região ventral do corpo.

Examinamos os pulmões dos hospedeiros e os parasitos encontrados foram lavados em solução salina e mortos com álcool absoluto quente. Após a coleta, uma parte dos parasitos foi fixada e armazenada em álcool 70% para identificação morfológica e uma parte foi armazenada em álcool absoluto para análises moleculares. Para a coleta de dados morfológicos, reidratamos com água destilada e confeccionamos lâminas temporárias clarificando os espécimes com lactofenol e examinamos as lâminas com microscópio óptico *Olympus* BX41. Observamos a morfologia apical com cortes realizados manualmente com navalha. Preparamos ilustrações inicialmente a mão e posteriormente elaboradas no *Photoshop* Versão 21.0.2. As medidas dos corpos dos parasitos são apresentadas com os valores do holótipo, sendo a média e intervalo para toda a série de tipos, os dois valores estão entre parênteses (salvo indicação contrária, todas as medidas estão em micrômetros).

2.2. ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA

Os espécimes armazenados em álcool absoluto foram seccionados na extremidade anterior, logo após a junção com o esôfago e na porção logo após o aparelho reprodutor feminino. As partes anterior e posterior foram armazenadas e depositadas como prova de hologenóforas da espécie (ver, Pleijel *et al.*, 2008) na coleção de Invertebrados da Universidade Federal do Paraná.

Realizamos a extração de DNA da porção mediana do parasito, de acordo com o kit de extração de DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, EUA). O DNA extraído e purificado foi submetido a uma PCR convencional para amplificação do gene COI, com primers seguindo Folmer *et al.* (1994) (LCO1490/Foward - 5' GGTCAACAATCATAAAGATATTGG 3' e HC02198/Reverse - 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAA 3'), em seguida analisamos os fragmentos amplificados utilizando eletroforese em gel de agarose 0,75%. Os fragmentos amplificados foram cortados e purificados com *PureLink™ Quick Gel Extraction e PCR Purification Kit Combo* (Thermo Fisher). Após a purificação as amostras foram submetidas a uma PCR para sequenciamento com *BigDye™ Terminator v3.1* kit de sequenciamento de ciclo (*Applied Biosystems*, Warrington, Reino Unido). As amostras então foram precipitadas e sequenciadas (*ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* sequenciador).

Utilizamos o software *FinchTV* Versão 1.4.0 para análise e montagem das sequências de DNA. Buscamos no banco de dados no *NCBI (BLASTn)* a existência de sequências semelhantes a que obtivemos, considerando apenas sequência que tivessem mais de 5% para correspondência. Os alinhamentos foram feitos no *MUSCLE* implementado no *MEGA 11* (Tamura *et al.*, 2021). Cortamos as extremidades do alinhamento e verificamos os códons de parada o *UGENE* Versão

33 (Okonechnikov *et al.*, 2012). A saturação de substituição com o índice *I_{ss}* testando os dados de alinhamento foi realizada no software *DAMBE* Versão 7.3.32 (Xia, 2018). Foi calculado o número de substituições de bases entre sequências. Para as análises de cálculo de estimativas e erro padrão utilizou-se o modelo *Kimura* de 2 parâmetros utilizando o pacote de software *MEGA* 11 (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2021).

O modelo de evolução foi realizado no *software IQ-Tree 2* (Minh *et al.*, 2020), a partir da matriz de sequências alinhadas. O modelo de evolução selecionado foi GTR + I + G de acordo com o Critério de Informação de *Akaike* (AIC). As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando máxima verossimilhança (MV) no *software IQ-Tree 2* (Minh *et al.*, 2020) e Inferência Bayesiana (IB) no programa *MrBayes* 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2003).

Para a MV utilizamos valores de suporte de 1000 repetições (*bootstrap*), e consideramos como valores suportados, apenas *bootstrap* acima de 70%. Para a IB utilizamos o método de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), com os seguintes parâmetros: *Iset nst=6, rate=invgamma, ngammacat=4*. Executamos cadeias com 50 milhões de gerações, salvando apenas 1.000 gerações e os primeiros 25% das gerações foram ‘queimadas’. Consideramos como suportados apenas nós com valores superiores a 90% de probabilidade posterior. O grupo externo selecionado foi *Serpentirhabdias viperidicus* Moraes, Aguiar, Muller, Narciso, Silva e Silva, 2017 (KX350054), conforme utilizado em outros estudos (Alcantara *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2018). Para visualização e edição das filogenias utilizamos os softwares *FigTree* Versão 1.4.4 (Rambaut 2009) e *Inkscape* Versão 1.0.2.

3. RESULTADOS

3.1. SISTEMÁTICA

Família: Rhabdiasidae Railliet, 1915

Gênero: *Rhabdias* Stiles e Hassall, 1905

Espécie: *Rhabdias taquariensis* n. sp.

Resumo taxonômico

Hospedeiro tipo: *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) (Amphibia: Leptodactylidae).

Localidade tipo: Parque Estadual das Nascentes do Rio Taquari, Costa Rica, Mato Grosso do Sul, Brasil (17°59' a 18°15'S; 53°10' a 53°26'W).

Local de infecção: Pulmão

Números de espécimes/hospedeiros, prevalência e intensidade média de infecção:

Um total de 11 nematoides foi encontrado em 7 sapos, P = 22%, IMI = 0,34.

Material tipo: 1 Holótipo e 5 parátipos foram depositados na coleção de invertebrados da Universidade Federal do Paraná.

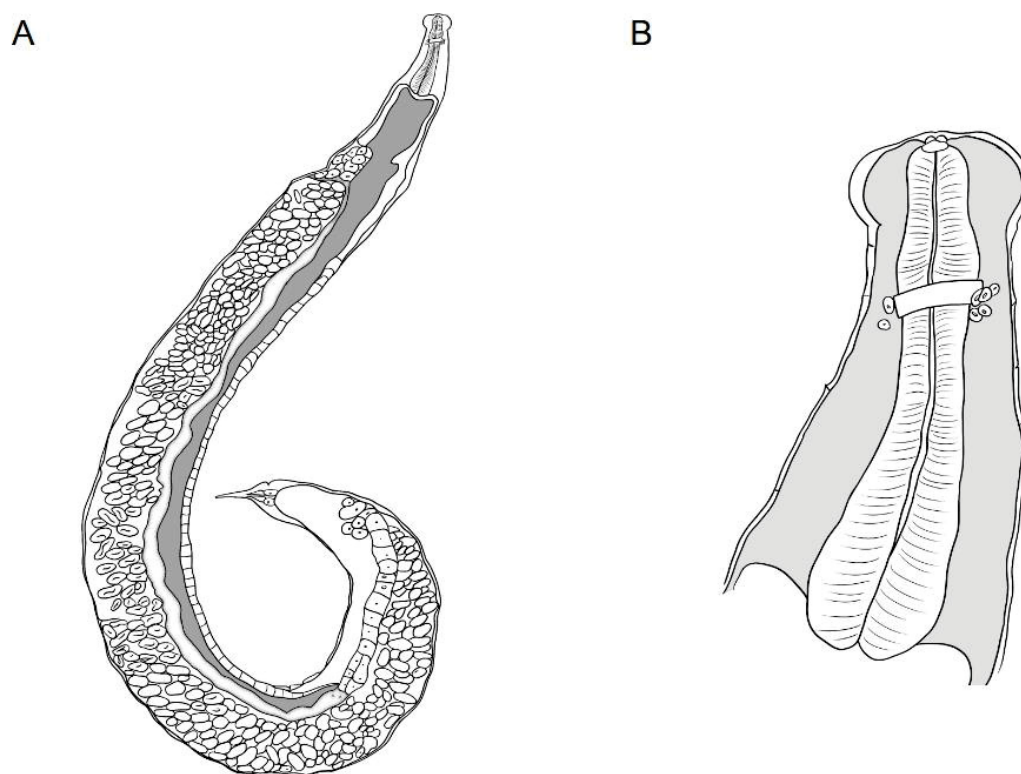
Etimologia: O nome específico *taquariensis* é uma homenagem ao Parque Estadual das Nascentes do Rio Taquari atingido pelas queimadas de 2020 que atingiram o Pantanal.

Descrição (Figura 1) - (Baseado no holótipo e em 5 parátipos, todas hermafroditas grávidas).

Corpo esguio e longo, 4.6 (4.7; 4.5–5.1) mm de comprimento. Superfície corporal coberta por aparente inflação cuticular discreta ao longo do corpo. Presença de poros e ductos laterais. Largura do corpo na altura da vulva 378 (355; 316–378),

largura na junção esôfago-intestino 181 (182; 181–185). Apresenta 6 lábios sendo 4 submediais e 2 laterais localizados próximos às bordas da abertura bucal. Cada lábio com uma papila e afídeos não observados. O Vestíbulo em visão apical tem formato circular, é cilíndrico e seu lúmen é estreito. Cápsula bucal em forma de taça com 6 (7; 6–9) de profundidade e 13 (7; 13–15) de largura, relação profundidade/largura de 0.46 (0.52; 0.46–0.6). Cápsula bucal tem superfície lisa com entrada de luz triangular e bordas arredondadas. Comprimento do esôfago 370 (366; 330–398), representando 8% (8%; 7–9%) do comprimento total do corpo, claviforme, ápice arredondado e dilatação na região muscular anterior. Largura da extremidade anterior do esôfago 41 (39; 37–71), largura da dilatação anterior do esôfago 54 (50; 49–54), largura após dilatação 40 (41; 40–44), largura do bulbo 78 (77; 75–78). Anel nervoso ao redor do esôfago após dilatação anterior localizado 148 (155; 148–164) da região anterior. Poro excretor não observado. Intestino com paredes espessas e conteúdo marrom em todo o comprimento. Reto curto, em forma de funil, revestido de cutículas. O sistema genital é anfídelfo, vagina localizada transversalmente e vulva pré-equatorial a 2.1 (1.8; 1.6–2.1) mm da extremidade anterior, que representa 62% (53%; 46–62%) do comprimento total. O útero apresenta parede finamente espessada e numerosos ovos (>100), ovos larvados próximos à vulva. Ovos medindo 92 (90; 86–92) x 46 (48; 45–52) (n = 3 ovos medidos no holótipo e parátipos). Cauda 224 (199; 186–224), representando 5% (4%, 4–5%) do corpo. Não foi possível observar fasmídeos.

FIGURA 1 – DESENHOS DE *Rhabdias taquariensis* n. sp. DE *Physalaemus albonotatus*. A - CORPO INTEIRO, VISTA LATERAL. B - EXTREMIDADE ANTERIOR DO CORPO, VISTA LATERAL.



FONTE: O autor (2024).

3.2. OBSERVAÇÕES

Rhabdias taquariensis n. sp. pertence ao gênero *Rhabdias* por apresentar dados moleculares semelhantes a outras espécies que pertencem ao gênero. Além disso, apresenta características diagnósticas como presença de cápsula bucal, cutícula externamente inflada, vulva anfidelfa e vagina transversal, apresenta também uma cauda cônica e é encontrada parasitando pulmões de hospedeiros anuros. Consideramos *R. taquariensis* n. sp. uma nova espécie por apresentar o formato interno da dilatação cefálica bem evidente como característica morfológica única e diferenciada de outras espécies.

A morfologia apical das *Rhabdias* auxilia muito na descrição e diferenciação de espécies. Neste sentido propomos uma espécie que tem 6 lábios, 4 submediais e 2 mais lateralizados, semelhante a um grupo de espécies que apresentam essa mesma característica: *Rhabdias androgyna*, *Rhabdias breviensis*, *Rhabdias fuelleborni*, *Rhabdias galactonoti*, *Rhabdias glaurungi*, *Rhabdias pocoto*, *Rhabdias tobagoensis*, *Rhabdias stenocephala* e *Rhabdias waiapi*.

Rhabdias androgyna descrita em *Rhinella* cf. *margaritifera* (Laurenti, 1768) se diferencia de *R. taquariensis* n. sp. tem um comprimento de corpo maior (*R. androgyna* 9.35–13.39 mm vs *R. taquariensis* n. sp. 4.521–5.106 mm), assim como a largura na junção do esôfafo-intestino (*R. androgyna* 269–473 vs *R. taquariensis* n. sp. 181–185). O esôfago de *R. androgyna* é mais longo (*R. androgyna* 577–618 vs *R. taquariensis* n. sp. 330–398). *Rhabdias androgyna* também diferencia de *R. taquariensis* n. sp. pelo diâmetro da cápsula bucal (*R. androgyna* 19–27 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15). A distância da vulva até a região anterior é maior em *R. androgyna* (3.7–7.2 mm vs 2.347–2.851 mm) (Kuzmin *et al.*, 2015).

Rhabdias breviensis Nascimento, Gonçalves, Melo, Giese, Furtado e Santos, 2013 de *Leptodactylus petersii* (Steindachner, 1864), tem características distintas de *R. taquariensis* n. sp. como o comprimento e diâmetro da cápsula bucal, a cápsula bucal de *R. breviensis* é ligeiramente menor que a de *R. taquariensis* n. sp. (*R. breviensis* 7–13 x 4–9 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15 x 6–9). A distância do anel nervoso à região anterior é menor em *R. breviensis* (*R. breviensis* 41–84 vs *R. taquariensis* n. sp. 148–164) (do Nascimento *et al.*, 2013).

Rhabdias fuelleborni Travassos 1926, descrito originalmente em *Rhinella diptycha* (= *Bufo marinus*) (Schneider, 1799) é maior que *R. taquariensis* n. sp. (*R. fuelleborni* 10–12 mm vs *R. taquariensis* n. sp. 4.521–5.106 mm). O diâmetro da

cápsula bucal de *R. fuelleborni* é maior que o de *R. taquariensis* n. sp. (*R. fuelleborni* 18–19 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15) (Kuzmin *et al.*, 2015).

Rhabdias galactonoti Kuzmin, Melo, da Silva Filho, e Santos, 2016 descrita em *Adelphobates galactonotus* (Steindachner, 1864) se diferencia de *R. taquariensis* n. sp. principalmente por ter o diâmetro e profundidade da cápsula bucal maior que a *R. taquariensis* n. sp. (*R. galactonoti* 14–17x10–12 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15x6–9) (Kuzmin *et al.*, 2016).

Rhabdias glaurungi Willkens, Rebêlo, Santos, Furtado, Vilela, Tkach, Kuzmin, e Melo, 2020 encontrada em *Scinax* gr. *ruber* (Laurenti, 1768) é diferente de *R. taquariensis* n. sp. com relação a dilatação cefálica interna que apenas *R. taquariensis* n. sp. apresenta. Além disso, *R. glaurungi* tem uma pequena diferença no diâmetro e profundidade da cápsula bucal (*R. glaurungi* 10–16x6–9 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15x6–9) (Willkens *et al.*, 2020).

Rhabdias pocoto Moraes, Melo, e Müller, 2020 encontrado em *Pseudopaludicola pocoto* (Magalhães, Loebmann, Kokubum, Haddad, e Garda, 2014) se diferencia da nova espécie por ter o anel nervoso mais distante da região anterior quando comparado com a *R. taquariensis* n. sp. (*R. pocoto* 238–339 vs *R. taquariensis* n. sp. 148–164). A cápsula bucal de *R. pocoto* também tem diferença no diâmetro e na profundidade (*R. pocoto* 11–17x9–17 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15x6–9) (Moraes *et al.*, 2020).

Rhabdias stenocephala Kuzmin, Melo, da Silva Filho, e Santos, 2016 encontrada em *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768) e *Leptodactylus paraensis* (Heyer, 2005) é diferente de *R. taquariensis* n. sp. por ter a cápsula maior que *R. taquariensis* n. sp. (*R. stenocephala* 15–18x8–11 vs *R. taquariensis* n. sp.

13–15x6–9). Além disso, *R. taquariensis* apresenta a dilatação cefálica interna diferente de *R. stenocephala* (Kuzmin *et al.*, 2016).

Rhabdias tobagoensis Moravec e Kaiser, 1995 descrita em *Pristimantis incertus* (Lutz, 1927) se diferencia de *R. taquariensis* n. sp. por ter o corpo mais longo (*R. tobagoensis* 7.34–7.56 mm vs *R. taquariensis* n. sp. 4.521–5.106 mm). O diâmetro da cápsula bucal de *R. tobagoensis* é maior que a de *R. taquariensis* n. sp. (*R. tobagoensis* 18–21 vs *R. taquariensis* n. sp. 15–18) (Moravec e Kaiser, 1995).

Rhabdias waiapi Tavares-Costa e Melo 2022 descrito em *Pristimantis chiastonotus* (Lynch e Hoogmoed, 1977) é diferente de *R. taquariensis* n. sp. por ter o diâmetro da cápsula maior que o de *R. taquariensis* n. sp. (*R. waiapi* 16–19 vs *R. taquariensis* n. sp. 13–15) (Tavares-Costa *et al.*, 2022).

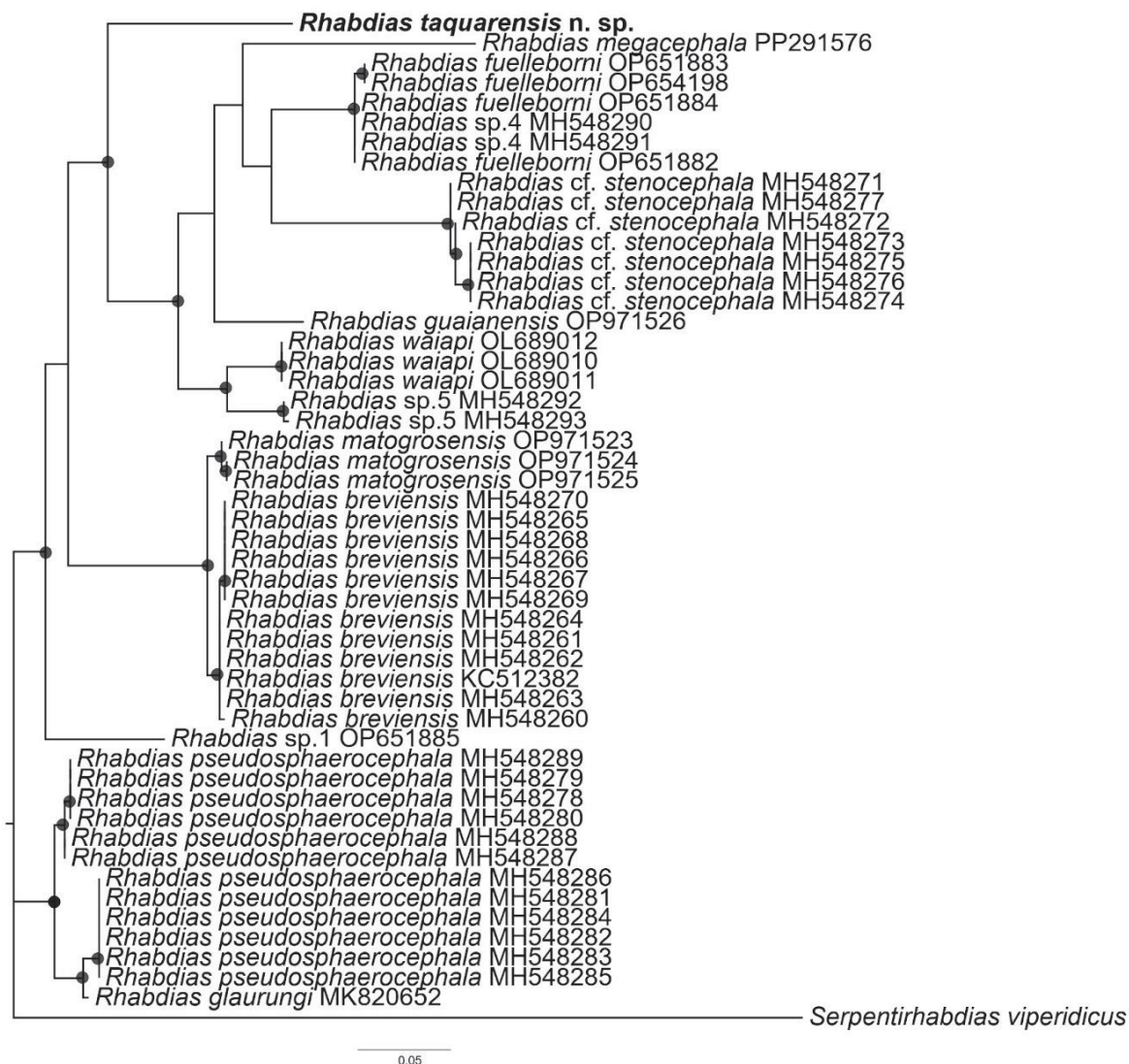
3.3. ANÁLISE MOLECULAR E ESTUDO FILOGENÉTICO

Obtivemos uma sequência de 630 pares de base do gene COI de *Rhabdias taquariensis* n. sp., esta sequência não teve correspondência com nenhuma outra sequência pesquisada no *BLASTn* (no *NCBI*). Para a realização do alinhamento, incluímos a sequência de *R. taquariensis* n. sp. juntamente com outras 50 sequências de outras espécies de *Rhabdias* do *GenBank*, e obtivemos 387 pares de base. O índice de *Iss* não indicou saturação nas transversões e transições, os valores de *Iss.c* foram maiores que os valores de *Iss.P*. *Rhabdias taquariensis* n. sp. é mais próxima de do complexo de espécies formado por *Rhabdias pseudosphaerocephala* (MH548278–MH548289) de *Rhinella marina*, *Rh. diptycha* e *Boana raniceps*, Brasil (Müller *et al.*, 2018), com uma diferença genética que varia de 9.7% à 11.5% e de *Rhabdias waiapi* (OL689010–OL689012) de *Pristimantis*

chiastonotus, Amapá, Brasil (Tavares-Costa *et al.*, 2022) com 9.9% de diferença genética (Material suplementar tabela S1).

As inferências filogenéticas de Máxima verossimilhança e bayesiana apresentaram topologia semelhante, assim como os valores de *bootstrap* (B) e probabilidade posterior (PP). Na filogenia *Rhabdias taquariensis* n. sp. fica como grupo irmão do clado formado pelos complexos de espécies formado por *Rhabdias* cf. *stenocephala*, *R. fuelleborni* + *Rhabdias* sp.4, e as espécies *R. guaianensis*, *Rhabdias waiapi* e *Rhabdias* sp.5. A posição de *Rhabdias taquariensis* n. sp. apresentou suporte de acordo com os valores de B (70) e PP (90) (Figura 2). Além disso, diversos clado analisados apresentaram suporte corroborando com a literatura: *Rhabdias matogrossensis* + *R. breviensis* (Alcantara *et al.*, 2023), *R. fuelleborni* + *Rhabdias* sp.4 (Müller *et al.*, 2018, 2023), *R. waiapi* + *Rhabdias* sp.5 (Müller *et al.*, 2023; Tavares-Costa *et al.*, 2022) e os complexos de espécies *R. pseudospharocephala* e *Rhabdias* cf. *stenocephala* (Müller *et al.*, 2018, 2023).

FIGURA 2 – TOPOLOGIA DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA RECUPERADA POR MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (MV) E INFERÊNCIA BAYESIANA (IB) DE *Rhabdias* spp. USANDO O GENE COI (PARCIAL) E APRESENTANDO A POSIÇÃO DE *Rhabdias taquariensis* n. sp. (EM NEGRITO). *Serpentirhabdias viperidicus* É O GRUPO EXTERNO. OS CÍRCULOS PRETOS REPRESENTAM OS VALORES DE SUPORTE DE *BOOTSTRAP* <70 (MV) E PROBABILIDADE POSTERIOR <0,90 (BI). AS TOPOLOGIAS DE MV E IB SÃO SEMELHANTES.



FONTE: O autor (2024).

4. DISCUSSÃO

Rhabdias taquariensis n. sp. é a 24^a espécie descrita para a região Neotropical, 12^a para o Brasil e 1^a descrita para no Mato Grosso do Sul. Esta espécie se destaca por uma dilatação cefálica interna muito proeminente,

diferentemente das espécies descritas que geralmente apresentam uma dilatação da cutícula externa mais evidente.

A região anterior de *Rhabdias* tem estruturas importantes para a identificação e distinção das espécies, como a presença ou ausência de lábios, assim como seu número e disposição Kuzmin (2013). Para a região Neotropical as espécies são separadas em 3 tipos de acordo com o número e arranjo dos lábios: sem lábios ou pseudolábios, 4 lábios submediais e dois pseudolábios laterais e 6 lábios (Moraes *et al.*, 2020; Müller *et al.*, 2018; Ramallo *et al.*, 2016; Tkach *et al.*, 2014). Uma característica apical também utilizada para distinguir as espécies do gênero é a inflação cuticular externa (Müller *et al.*, 2023), entretanto a *R. taquariensis* n. sp. apresenta essa dilatação interna e não na cutícula como outras espécies como *R. androgyna* e *R. megacephala* (Euclides *et al.*, *In press.*; Kuzmin *et al.*, 2015).

Rhabdias taquariensis n. sp. teve sua sequência apresentando maior distância com *Rhabdias* cf. *stenocephala*, sendo 13.6% mais divergente quando comparamos com outras 51 sequências analisadas (Material suplementar tabela S1). Na filogenia proposta a partir das análises realizadas com a sequência do COI obtidas, a *Rhabdias taquariensis* n. sp. ficou como grupo irmão de *Rhabdias* cf. *stenocephala*, *R. fuelleborni* + *Rhabdias* sp.4, e das espécies *R. guaianensis*, *Rhabdias waiapi* e *Rhabdias* sp., essa relação apresentou suporte de *bootstrap* e PP. A qualidade dos dados, juntamente com o aumento de estudos moleculares de *Rhabdias* auxiliou para obter altos valores de suporte na hipótese filogenética de *R. taquariensis* n. sp. Mesmo com a posição de *R. taquariensis* n. sp. tendo suporte é importante ressaltar, sobre a escassez de dados moleculares que ainda permanece como um obstáculo para comparações e formulações de hipóteses filogenéticas. Grande parte das espécies de *Rhabdias* continua sendo conhecida apenas por

descrições morfológicas (Kuzmin *et al.*, 2007, 2015), o que dificulta a distinção precisa entre elas devido à sua similaridade morfológica. Observando os nós com baixo suporte, é possível levantar a hipótese de que a distância geográfica entre as espécies cria uma lacuna de dados, dificultando nossa compreensão da história evolutiva desses organismos (Tavares-Costa *et al.*, 2022; Willkens *et al.*, 2020).

Rhabdias taquariensis n. sp. foi encontrada no Pantanal, onde informações sobre a diversidade de *Rhabdias* ainda são escassas, mas tem aumentado devido a estudos recentes que identificaram como *Rhabdias* cf. *breviensis* em *Scinax acuminatus* no estado do Mato Grosso (da Silva *et al.*, 2019) e *R. matogrossensis* e *R. guaianensis* também encontradas no Mato Grosso (Alcântara *et al.*, 2023). Porém para o estado do Mato Grosso do Sul não encontramos registro de identificação específica de *Rhabdias*, embora existam estudos com identificação genérica que indicam que espécies de *Rhabdias* são comuns nesse bioma (Campião *et al.*, 2009, 2010, 2016a, 2016b).

Para *P. albonotatus* não encontramos nenhum registro de parasitos pulmonares. Entretanto para o gênero *Physalaemus* encontramos uma ampla gama de registro de parasitos como espécies de Acanthocephala, Monogenoidea e várias famílias de Nematoda como Cosmocercidae, Molineidae, Atractidae, Strongyloididae, Physalopteridae (Campião *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2019). Mesmo tendo vários registros de parasitos, espécies de *Rhabdias* são pouco conhecidas para espécies *Physalaemus*. *Rhabdias* cf. *breviensis* é uma das poucas espécies identificadas em *Physalaemus petersii* e *L. macrosternum*, outros trabalhos que encontraram *Rhabdias* apresentam uma genérica (Aguiar *et al.*, 2015; do Nascimento *et al.*, 2013; de Oliveira *et al.*, 2019; Leivas *et al.*, 2018).

Nossa análise para identificação se baseou em poucos indivíduos devido às queimadas que atingiram o Parque Estadual das Nascentes do Rio Taquari no ano de 2020. Após as queimadas foram realizadas novas coletas no local, porém não encontramos mais os hospedeiros e consequentemente também não encontramos os espécimes de *Rhabdias*. As queimadas no Pantanal têm impactado de forma devastadora a diversidade de vertebrados, assim como organismos que dependem de um ecossistema saudável para sobreviver. Com a constante destruição do Pantanal e consequentemente a perda de recursos, muitas espécies de vertebrados enfrentam ameaças à sua sobrevivência (Tomas *et al.*, 2021). Além disso, a diminuição da diversidade de vertebrados pode ter efeitos cascata sobre os parasitos e outros organismos que dependem desses hospedeiros para sua própria sobrevivência e ciclo de vida (Lafferty, 2012; Wood *et al.*, 2020). Os incêndios de 2020 já são considerados substancialmente superiores às estimativas de mortalidade direta pelo fogo para vertebrados (Tomas *et al.*, 2021). Assim, documentamos aqui a existência desta nova espécie de nematoda, e enfatizamos a importância de inventários de diversidade integrativos que incluam organismos parasitas a fim de desvendar a diversidade de espécies e interações neste bioma tão único que é o Pantanal.

A descoberta de *R. taquariensis* n. sp. no Pantanal destaca a necessidade de mais estudos sobre a diversidade não só de *Rhabdias* nessa região, mas como de toda a diversidade oculta, especialmente diante dos desafios representados pelas queimadas e projetos de hidrelétricas que ameaçam toda a fauna. Espécies de parasitos em particular, podem representar um grande número de extinções invisíveis (Lafferty, 2012).

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo apresentou uma investigação abrangente sobre a diversidade e as interações entre parasitos em anuros da Mata Atlântica brasileira. Como primeiro passo, nossa pesquisa revelou uma diversidade considerável de parasitos, identificando 49 táxons pertencentes aos grupos Nematoda, Acanthocephala e Platyhelminthes, e descrevendo a influência das características dos hospedeiros, como tamanho corporal, e esforço de amostragem, sobre a riqueza de parasitas. Observamos que a riqueza de parasitas está positivamente associada ao tamanho dos hospedeiros e ao esforço de amostragem, corroborando com a literatura existente. No entanto, observamos que a prevalência de infecção parasitária está mais intimamente ligada à oportunidade de infecção, ao número de espécies hospedeiras infectadas e à abundância de parasitos, mas não aos índices de especificidade ecológica e filogenética.

A partir do inventário inicial, aprofundamos no estudo de diversidade de espécies dos parasitos pulmonares *Rhabdias* spp. Nosso estudo destacou a importância de uma abordagem integrativa para a identificação e delimitação de espécies crípticas dentro do gênero *Rhabdias*. As análises moleculares e filogenéticas revelaram uma diversidade menor do que a inicialmente identificada morfolologicamente, indicando a existência de espécies crípticas e a necessidade de uma abordagem integrada para a taxonomia de parasitas. Descrevemos novas espécies de *Rhabdias*, utilizando sequências de genes mitocondriais e nucleares, e propusemos hipóteses filogenéticas que diferem parcialmente das propostas anteriores, contribuindo para o avanço no entendimento da biologia e diversidade desse grupo.

Nossos resultados expandem o conhecimento sobre a distribuição geográfica e o repertório de hospedeiros de espécies de *Rhabdias*, revelando a existência de plasticidade fenotípica de algumas espécies. Este estudo enriquece a base de dados existente sobre a fauna parasitária de anuros na Mata Atlântica, além de enfatizar a necessidade contínua de estudos integrativos para desvendar padrões e contribuir para a compreensão sobre as dinâmicas ecológicas e evolutivas envolvidas.

Em resumo, a combinação de dados morfológicos, moleculares e ecológicos provou ser essencial para uma identificação robusta e delimitação de espécies de parasitas. Nosso trabalho revelou a existência de uma grande diversidade e complexidade das interações parasito-hospedeiro na Mata Atlântica. Descrevemos uma nova espécie para a ciência, e propomos uma potencial nova espécie de *Rhabdias* para o Pantanal, que pode “nascer” para a ciência já vulnerável a extinção. Assim, nossos resultados apontam para a necessidade de estudos de novos hospedeiros e regiões geográficas. Esperamos que os dados apresentados aqui sirvam como uma base significativa para futuras pesquisas sobre diversidade e interações parasito-hospedeiro. A continuação desse tipo de estudo, com a inclusão de mais dados e análises em diferentes escalas, poderá revelar novos e diferentes padrões nas interações parasito-hospedeiro, enriquecendo ainda mais nosso entendimento sobre a diversidade parasitária, e ecologia das interações.

REFERÊNCIAS

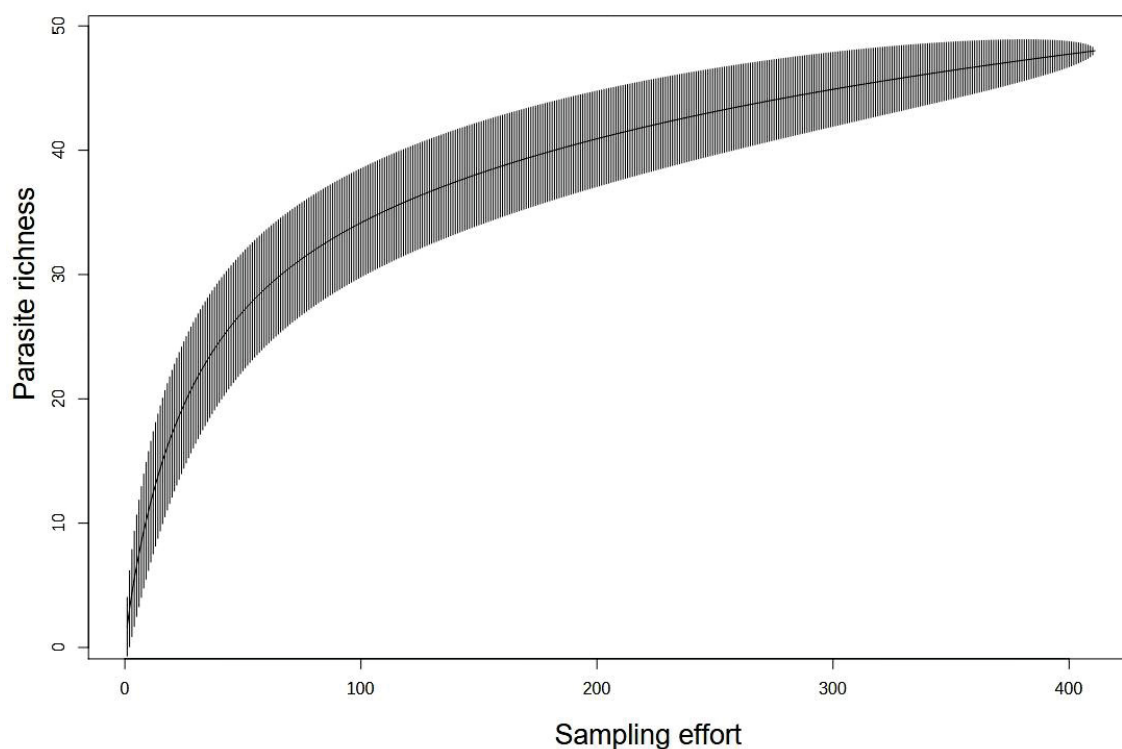
- ALCANTARA, E. P.; MÜLLER, M. I.; ÚNGARI, L. P.; et al. Integrative taxonomy in the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 from anuran in Brazil, description of two new species and phylogenetic analyses. **Parasitology International**, v. 93, p. 102714, 2023.
- BAKER, M. R. The free-living and parasitic development of *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) in amphibians. **Canadian Journal of Zoology**, v. 57, n. 1, p. 161–178, 1979.
- CAMPIÃO, D. K. M.; DIAS, M. O. T.; SILVA, R. J. D.; FERREIRA, V. L.; TAVARES, L. E. R. Living apart and having similar trouble: frog helminth parasites determined by the host or by the habitat? **Canadian Journal of Zoology** v. 94, n. 11, 2016.
- CAMPIÃO, K. M.; DA SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L. Helminth parasites of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from south-eastern Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 83, n. 4, p. 345–349, 2009.
- CAMPIÃO, K. M.; MORAIS, D. H.; DIAS, O. T.; et al. Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. **Zootaxa**, v. 3843, n. 1, p. 1, 2014.
- CAMPIÃO, K. M.; RIBAS, A. C. DE A.; MORAIS, D. H.; SILVA, R. J. DA; TAVARES, L. E. R. How Many Parasites Species a Frog Might Have? Determinants of Parasite Diversity in South American Anurans. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- CAMPIÃO, K. M.; DA SILVA, I. C. O.; DALAZEN, G. T.; PAIVA, F.; TAVARES, L. E. R. Helminth Parasites of 11 Anuran Species from the Pantanal Wetland, Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 92–100, 2016.
- CAMPIÃO, K. M.; DA SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L. Helminth component community of the paradoxal frog *Pseudis platensis* Gallardo, 1961 (Anura: Hylidae) from south-eastern Pantanal, Brazil. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 747–751, 2010.
- DE CÁSSIA SILVA DO NASCIMENTO, L.; GONÇALVES, E. C.; DE VASCONCELOS MELO, F. T.; et al. Description of *Rhabdias breviensis* n. sp. (Rhabditoidea: Rhabdiasidae) in two Neotropical frog species. **Systematic Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 69–75, 2013.
- EUCLYDES, R.; JESUS, R. F.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; CAMPIÃO, M. *Rhabdias megacephala* n. sp. morphology and phylogeny of the lung parasite of the anuran *Proceratophrys boiei*. In Press. *Journal of Helminthology*.
- GONZÁLEZ, C. E.; GÓMEZ, V. I.; HAMANN, M. I. Morphological variation of *Aplectana hylambatis* (Nematoda: Cosmocercidae) from different anuran hosts and localities in Argentina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.
- GONZÁLEZ, C. E.; HAMANN, M. I. First report of nematode parasites of *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) (Anura: Leiuperidae) from Corrientes, Argentina. **Neotropical Helminthology** v. 6, n. 1, 2012.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.
- KUZMIN, Y. Review of Rhabdiasidae (Nematoda) from the Holarctic. **Zootaxa**, v. 3639, n. 1, p. 1, 2013.
- KUZMIN, Y.; DU PREEZ, L. H.; JUNKER, K. Some nematodes of the genus *Rhabdias* Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitising amphibians

- in French Guiana. **Folia Parasitologica**, v. 62, 2015. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2015.031.html>>. Acesso em: 13/2/2023.
- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; BROOKS, D. R. Two new species of Rhabdiasids from the marine toad, *Bufo marinus* (L.) (Lissamphibia: Anura: Bufonidae), in Central America. **The journal of parasitology**, v. 93, n. 1, 2007.
- KUZMIN, Y.; VASCONCELOS MELO, F. T. DE; FILHO, H. F. DA S.; NASCIMENTO DOS SANTOS, J. Two new species of Rhabdias Stiles et Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) from anuran amphibians in Para, Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 63, 2016. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2016.015.html>>. Acesso em: 7/2/2023.
- LAFFERTY, K. D. Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1604, p. 2814–2827, 2012.
- LANGFORD, G. J.; JANOBY, J. Comparative Life Cycles and Life Histories of North American Rhabdias Spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): Lungworms from Snakes and Anurans. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 5, p. 1145–1155, 2009.
- LANGFORD, G. J.; JANOBY, J. Host Specificity of North American *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): Combining Field Data and Experimental Infections with a Molecular Phylogeny. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, 2013.
- LEIVAS, P. T.; LEIVAS, F. W. T.; CAMPIÃO, K. Diet and parasites of the anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Leiuperidae) from an Atlantic Forest fragment. **Herpetology Notes**, v. 18, 2018.
- MARCAIDA, A. J. B.; NAKAO, M.; FUKUTANI, K.; NISHIKAWA, K.; URABE, M. Phylogeography of Rhabdias spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) collected from Bufo species in Honshu, Shikoku, and Kyushu, Japan including possible cryptic species. **Parasitology International**, v. 90, p. 102612, 2022.
- MARTINS-SOBRINHO, P. M.; SILVA, W. G. D. O.; SANTOS, E. G. D.; MOURA, G. J. B. D.; OLIVEIRA, J. B. D. Helminths of some tree frogs of the families Hylidae and Phyllomedusidae in an Atlantic rainforest fragment, Brazil. **Journal of Natural History**, v. 51, n. 27–28, p. 1639–1648, 2017.
- MINH, B. Q.; SCHMIDT, H. A.; CHERNOMOR, O.; et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020.
- MORAIS, D. H.; MÜLLER, M. I.; MELO, F. T. V.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pseudopaludicola pocoto* (Anura: Leptodactylidae) from north-eastern Brazil: description and phylogenetic analyses. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e209, 2020.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; DA COSTA, L. F. S. T.; et al. Revisiting the taxonomy of *Rhabdias fuelleborni* Travassos, 1928 (Nematoda, Rhabdiasidae) with approaches to delimitation of species and notes on molecular phylogeny. **Parasitology International**, v. 92, p. 102692, 2023.
- MÜLLER, M. I.; MORAIS, D. H.; COSTA-SILVA, G. J.; et al. Diversity in the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae): Evidence for cryptic speciation. **Zoologica Scripta**, v. 47, n. 5, p. 595–607, 2018.
- DE OLIVEIRA, C. R.; ÁVILA, R. W.; MORAIS, D. H. Helminths Associated with Three *Physalaemus* Species (Anura: Leptodactylidae) from Caatinga Biome, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 1, p. 205–212, 2019.
- PLEIJEL, F.; JONDELIUS, U.; NORLINDER, E.; et al. Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 1, p. 369–371, 2008.

- POULIN, R.; HAY, E.; JORGE, F. Taxonomic and geographic bias in the genetic study of helminth parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 6, p. 429–435, 2019.
- PROSSER, SEAN. W. J.; VELARDE-AGUILAR, MARIA. G.; LEÓN-RÉGAGNON, VIRGINIA.; HEBERT, PAUL. D. N. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a-n/a, 2013.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; TESLENKO, M.; ZHANG, C.; NYLANDER, J. A. A. MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. 2003.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.
- TAVARES-COSTA, L. F. S.; REBÊLO, G. L.; MÜLLER, M. I.; et al. A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pristimantis chiastonotus* (Anura: Strabomantidae) from the Brazilian Amazon: description and phylogenetic analyses. **Parasitology Research**, v. 121, n. 1, p. 155–166, 2022.
- TKACH, V. V.; KUZMIN, Y.; SNYDER, S. D. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 273–284, 2014.
- TOMAS, W. M.; BERLINCK, C. N.; CHIARAVALLOTI, R. M.; et al. Counting the Dead: 17 Million Vertebrates Directly Killed by the 2020's Wildfires in the Pantanal Wetland, Brazil. **Nature**, 2021. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-859794/v1>>. Acesso em: 24/4/2024.
- WILLKENS, Y.; REBÊLO, G. L.; SANTOS, J. N.; et al. *Rhabdias glaurungi* sp. nov. (Nematoda: Rhabdiasidae), parasite of *Scinax* gr. *ruber* (Laurenti, 1768) (Anura: Hylidae), from the Brazilian Amazon. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e54, 2020.
- WOOD, C. L.; SUMMERSIDE, M.; JOHNSON, P. T. J. How host diversity and abundance affect parasite infections: Results from a whole-ecosystem manipulation of bird activity. **Biological Conservation**, v. 248, p. 108683, 2020.
- XIA, X. DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1550–1552, 2018.

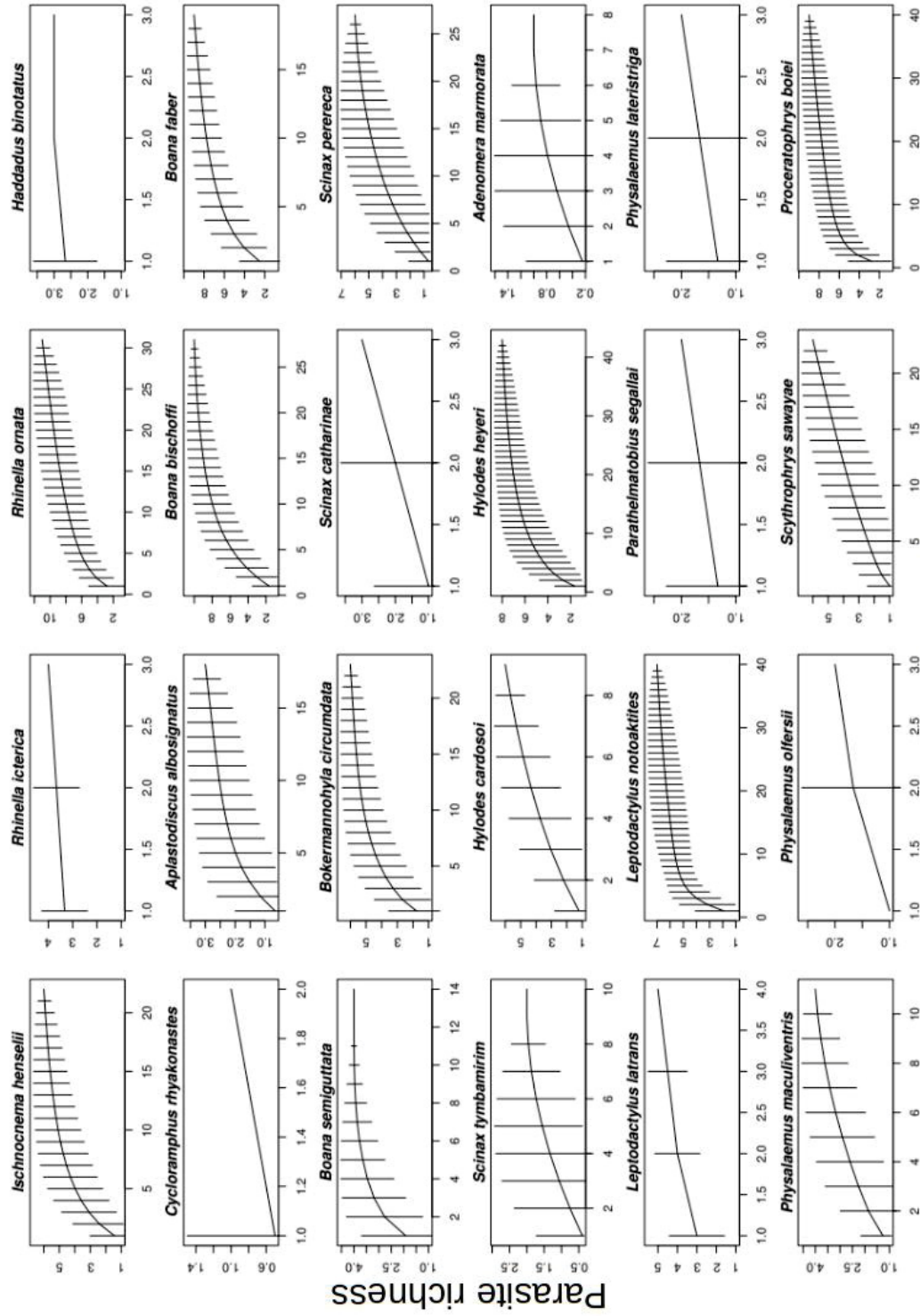
ANEXOS**CAPÍTULO 1**

SUPPLEMENTARY FIGURE S1 – ACCUMULATION CURVE BASED ON THE TOTAL NUMBER OF COLLECTED HOSTS (SAMPLING EFFORT) OF ANURAN SPECIES IN RELATION TO PARASITE RICHNESS.



FONTE: O autor (2024).

SUPPLEMENTARY FIGURE S2 – ACCUMULATION CURVE BASED ON THE NUMBER OF COLLECTED HOSTS (SAMPLING EFFORT) PER ANURAN SPECIES IN RELATION TO PARASITE RICHNESS.



FONTE: O autor (2024).