

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO NEVES DE OLIVEIRA

Extensão da troca contínua de hospedeiros em *Gyrodactylus anisopharynx*  
(Platyhelminthes, Monogeneoidea, Gyrodactylidae) utilizando marcadores  
moleculares ISSR

CURITIBA  
2011

RODRIGO NEVES DE OLIVEIRA

Extensão da troca contínua de hospedeiros em *Gyrodactylus anisopharynx*  
(Platyhelminthes, Monogenoidea, Gyrodactylidae) utilizando marcadores  
moleculares ISSR

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas,  
área de concentração: Zoologia. Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Walter A. Boeger, Ph.D.

CURITIBA  
2011

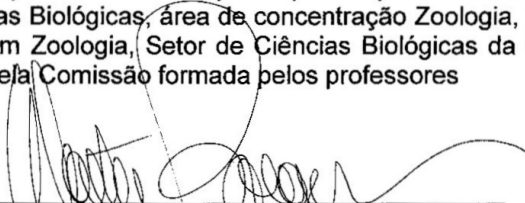
Termo de aprovação

Testando a extensão da troca de hospedeiros em *Gyrodactylus anisopharynx*  
(Gyrodactylidae, Monogenoidea, Platyhelminthes) utilizando marcadores moleculares ISSR.

por

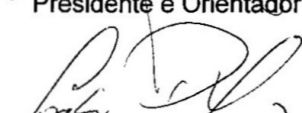
**Rodrigo Neves de Oliveira**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



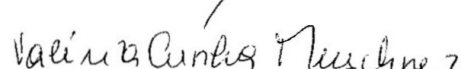
---

Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR  
Presidente e Orientador



---

Dr. Joaber Pereira Júnior - FURG



---

Dr<sup>a</sup>. Valéria Cunha Muschner - UFPR

Curitiba, 05 de setembro de 2011.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Walter Boeger por toda orientação, confiança e profissionalismo ao longo desse curso de Pós Graduação.

A todos do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar em procedimentos moleculares, coletas, dúvidas e compartilharam todas as dificuldades e êxitos alcançados ao longo desse curso. Um abraço especial aos meus queridos parasitologistas do laboratório: Renata Ferreira, Luciana Patella, Mariana Braga e Marlus B. Silva que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao professor Rogério T. Vianna, por ter me apresentado ao mundo dos monogénódeos.

Aos queridos amigos Fabrício de Andrade Frehse, Fábio Gaio, João Brito, Pollyana P. Costa, Ubirajara P. Alberton e Luís Eduardo de Mattos Pukanski que ajudaram nas coletas realizadas para este trabalho.

Ao José Francisco de Oliveira Neto, o nosso “Zé” amigo, pelas boas conversas e sugestões.

À minha querida mãe, Cristina. Poucas palavras podem descrever o quanto sou grato por tê-la, sempre me apoiando e, principalmente nesses últimos dois anos. Sem você minha mãe, nada disso seria possível.

À Kelly Mafra, por todo amor, companheirismo e compreensão que me sustentaram nos períodos difíceis.

Ao curso de Pós-graduação de Zoologia da UFPR.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	i
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	iv
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Introdução .....	1
Material e Métodos .....	5
Marcadores moleculares .....	6
Variabilidade entre infrapopulações .....	8
Análise Genealógica e teste de hipóteses .....	9
Índices de dispersão .....	11
Resultados .....	12
Discussão .....	31
Referências Bibliográficas .....	35

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida com produtos da amplificação do iniciador 17899.....	13
<b>Figura 2.</b> Relações de parentesco entre indivíduos de <i>G. anisopharynx</i> .....	16
<b>Figura 3.</b> Dendograma gerado pela análise de cluster.....	18
<b>Figura 4.</b> Análise de reconstrução de caráter ancestral por parcimônia.....	22
<b>Figura 5.</b> Gráfico da frequência do número de passos evolutivos.....	23
<b>Figura 6.</b> Grupos familiares (em cinza) de <i>G. anisopharynx</i> .....	24
<b>Figura 7.</b> Gráfico da frequência das intensidades médias (IM) de infestação.....	29

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no teste de eficiência de amplificação de DNA de <i>Gyrodactylus anisopharynx</i> .....	7
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise de ISSR.....	8
<b>Tabela 3.</b> Infrapopulações de <i>Gyrodactylus anisopharynx</i> e intensidade de infestação de cada hospedeiro.....	12
<b>Tabela 4.</b> Desempenho dos iniciadores utilizados na análise de ISSR com amostras de <i>G. anisopharynx</i> indicando: número total de bandas, número de bandas polimórficas e amplitude de fragmentos amplificados obtidos por cada iniciador.....	13
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros calculados pelo software HICKORY.....	14
<b>Tabela 6.</b> Relações de parentesco entre espécimes de <i>G. anisopharynx</i> .....	15
<b>Tabela 7.</b> Trinta e quatro grupos formados pela análise de cluster com seus indivíduos e tamanhos totais (N).....	19
<b>Tabela 8.</b> Grupos familiares de <i>G. anisopharynx</i> com número total de espécimes por grupo (N), espécimes de cada grupo e hospedeiros em que ocorrem.....	25
<b>Tabela 9.</b> Hospedeiros infectados pelos grupos familiares de <i>G. anisopharynx</i> .....	27
<b>Tabela 10.</b> Índices de dispersão calculados.....	29

## RESUMO

A fim de testar a extensão em que ocorre a troca de hospedeiros em *Gyrodactylus anisopharynx* Popazoglo et Boeger, 2000 (Platyhelminthes, Monogenoidea, Gyrodactylidae), foram testadas duas hipóteses: nula: a troca de hospedeiro não ocorreria, esperando-se encontrar um agrupamento de indivíduos próximos geneticamente em infrapopulações, formando grupos familiares com alta taxa de endogamia; alternativa: a troca de hospedeiros seria constante, e grupos familiares de *G. anisopharynx* estariam distribuídos aleatoriamente entre diferentes infrapopulações. Treze infrapopulações, totalizando 82 indivíduos de *G. anisopharynx*, foram analisadas utilizando marcadores moleculares ISSR. O baixo valor de  $F_{st}$  encontrado (0,003) indica um alto fluxo gênico entre as infrapopulações, sugerindo que a troca de hospedeiros ocorre continuamente. Entretanto, o alto valor de  $F_{is}$  (0,8) sugere uma alta endogamia nessa população de parasitos, conforme sugerido pela hipótese “nula”. A análise de reconstrução de caráter ancestral mostrou que a distribuição de grupos de parasitos próximos geneticamente sobre os hospedeiros amostrados é aleatória. Entretanto, esta distribuição está bastante próxima ao limite inferior da distribuição ao acaso. Índices de distribuição calculados para quatorze grupos familiares de *G. anisopharynx* amostrados também indicam um padrão de distribuição aleatório dos mesmos. Os resultados apresentados parecem indicar uma condição intermediária entre as hipóteses nula e alternativa, o que se esperaria considerando o tipo de reprodução (viviparidade) de *G. anisopharynx*. É possível encontrar, em um determinado momento, animais genealogicamente próximos em uma única infrapopulação, sendo um evento determinístico e esperado enquanto a transmissão para outros hospedeiros, um evento estocástico, reduz a probabilidade de encontrar esses parasitos em um mesmo hospedeiro. A troca contínua de hospedeiros (transmissão contínua) é um processo comum em *G. anisopharynx* e provavelmente em todas as espécies do clado de girodactilídeos vivíparos e seu padrão, inferido nesse estudo, é consistente com os pressupostos que fundamentam a hipótese de diversificação de girodactilídeos vivíparos de Boeger *et al.* (2003). **Palavras-chave:** *Gyrodactylus anisopharynx*, troca de hospedeiro, infrapopulação, ISSR

## ABSTRACT

In order to test the extent to which host switch occurs in *Gyrodactylus anisopharynx* Popazoglo et Boeger, 2000 (Platyhelminthes, Monogeneoidea, Gyrodactylidae), two hypotheses were tested: null: the host switch does not occur - is expected to find a group of genetically close individuals in infrapopulations, forming "family groups" with high rates of inbreeding; alternative: the host switch is constant, and "family groups" of *G. anisopharynx* are randomly distributed between different infrapopulations. Thirteen infrapopulations, totalizing 82 individuals of *G. anisopharynx* were analyzed using ISSR molecular markers. The low value of  $F_{st}$  found (0.003) indicates a high gene flow among infrapopulations, suggesting that host switch occurs continuously. However, the high value of  $F_{is}$  (0.8) shows a high inbreeding in this population of parasites, as suggested by the "null" hypothesis. The ancestral character reconstruction analysis shows that the distribution of groups of genetically close parasites on sampled hosts is random. However, this distribution is very close to the lower limit of the random distribution. Distribution indices calculated for fourteen "family groups" sampled also indicate a random distribution pattern of the same. The results presented seem to indicate an intermediate condition between the null and alternative hypotheses, which would be expected considering the type of reproduction (viviparity) of *G. anisopharynx*. It's possible to find, at one point, genealogically close animals in a single infrapopulation, a deterministic and expected event while transmission to other hosts, a stochastic event, reduces the likelihood of encountering these animals in the same host. The continuous host switch is a common process in *G. anisopharynx* and probably in all species of the clade of viviparous gyrodactylids and its pattern, inferred in this study, is consistent with the assumptions underlying the hypothesis of diversification of viviparous gyrodactylids of Boeger *et al.* (2003).

**Keywords:** *Gyrodactylus anisopharynx*, host switch, infrapopulation, ISSR.

## INTRODUÇÃO

Os Monogenoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes) são representados, principalmente, por ectoparasitos de peixes. Esses parasitos apresentam alta especificidade ao hospedeiro, muitas vezes restritos apenas a uma espécie hospedeira (Bychowsky 1957, Rohde 1979, Bakke *et al.* 1991). A presença de um háptor, estrutura de fixação localizada na extremidade posterior do corpo, é característica exclusiva deste grupo (Bychowsky 1957). Esta estrutura é formada por diferentes estruturas de fixação, incluindo ganchos, barras, âncoras, ventosas e grampos, os quais variam de acordo com a espécie parasita (Gerasev 1990). Gyrodactylidae Van Beneden et Hesse, 1863 e Dactylogyridae Bychowsky, 1933 são duas grandes famílias de Monogenoidea, sendo que a primeira é composta, em sua maioria, por espécies vivíparas, e a segunda por espécies ovíparas (Kubtiza e Kubtiza 1999).

Gyrodactylidae inclui grande parte das espécies vivíparas de Monogenoidea. São ectoparasitos da superfície corporal, filamentos branquiais e cavidades nasais de peixes marinhos e de água doce (Bakke *et al.* 1992, Kubtiza e Kubtiza 1999). A família possui representantes ovíparos, mas esses apresentam uma menor riqueza específica, com 7 gêneros e apenas 21 espécies conhecidas (Vianna 2007). As espécies vivíparas, entretanto, formam o maior grupo dentro da família, com 25 gêneros. Dentre os vivíparos, *Gyrodactylus* Von Nordmann, 1832 é o gênero mais diverso, com mais de 450 espécies descritas (Boeger *et al.* 2003, Harris *et al.* 2004, Bakke *et al.* 2007). Entretanto, há estimativas de que existam, aproximadamente, 20.000 espécies de *Gyrodactylus* em todo o mundo (Bakke *et al.* 2002). Muitas dessas espécies causam sérias ameaças à manutenção de populações de peixes na natureza e em cativeiro (McVicar 1997, Euzet e Combes 1998, Bakke *et al.* 2002, Garcia-Vásquez *et al.* 2007).

Na Região Neotropical, são conhecidas 44 espécies de Gyrodactylidae, distribuídas em 13 gêneros (Boeger *et al.* 2006), sendo 18 espécies de *Gyrodactylus* (Boeger *et al.* 2006, Kritsky *et al.* 2007).

Duas principais características biológicas de *Gyrodactylus* são a hiperviviparidade - um verme carrega em seu interior até quatro gerações

seguintes (Bychowsky 1957) - e a capacidade de trocar de hospedeiro em qualquer fase da vida. A troca de hospedeiro é um importante recurso dentro das relações bióticas complexas, estando associada a processos de coevolução entre linhagens de parasitos e hospedeiros em uma escala micro-evolutiva (Hoberg e Brooks 2008). A hiperviviparidade e a troca de hospedeiros são recursos, que unidos, podem amenizar a dinâmica da Rainha Vermelha na relação parasito-hospedeiro e atuar como um facilitador do processo de especiação em *Gyrodactylus* (Zietara e Lumme 2002, Boeger *et al.* 2003, Meinilä *et al.* 2004, Boeger *et al.* 2005).

A biologia reprodutiva de girodactilídeos vivíparos ainda não está completamente elucidada. Apesar de se conhecer algumas características, como a hiperviviparidade, não se sabe ao certo aspectos sobre a origem do primeiro embrião desses parasitos, sendo necessário o uso de marcadores moleculares para testar teorias a respeito. Somente após o início da maturação do segundo embrião, que pode ter origem sexuada ou por partenogênese, que o sistema reprodutor masculino se torna funcional (Cable e Harris 2002, Bakke *et al.* 2007). O modo de reprodução de muitas espécies de *Gyrodactylus* parece depender da densidade populacional, sendo a reprodução assexuada mais prevalente em baixas densidades e a reprodução sexual se tornando mais prevalente à medida que a densidade populacional cresce (Harris 1989). Essa ocorrência de diferentes modos de reprodução, influencia, particularmente, a especiação e especificidade ao hospedeiro dessas espécies (Harris 1993, Boeger *et al.* 2003).

As espécies de *Gyrodactylus*, em grande parte, ocorrem em apenas uma espécie hospedeira (Bakke *et al.* 2002), mas a ocorrência simultânea de uma espécie parasita em hospedeiros simpátricos distintos não é incomum (Turgut *et al.* 1999, Meinilä *et al.* 2004, Boeger *et al.* 2005). *Gyrodactylus superbus* Szidat, 1973, *Gyrodactylus samirae* Popazoglo et Boeger, 2000, *Gyrodactylus anisopharynx* Popazoglo et Boeger, 2000 e *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva et Boeger, 2009 representam um grupo de espécies que compartilham hospedeiros em simpatria. Todas elas ocorrem em *Corydoras paleatus* Jenyns, 1842 e *Corydoras ehrhardti* Steindachner, 1910 (Popazoglo e Boeger 2000, Bueno-Silva e Boeger 2009). Recentemente, foi demonstrado que *G. corydori* apresenta linhagens distintas para cada espécie hospedeira, sugerindo que

esta espécie se encontra num processo inicial de especiação (Bueno-Silva *et al.* 2011).

Através de um modelo experimental parasito-hospedeiro utilizando as espécies de *Corydoras* supracitadas, Boeger *et al.* (2005) estudaram como a transmissão contínua através da troca de hospedeiros influencia parâmetros populacionais de *G. anisopharynx*. Esses autores sugerem que com a troca contínua de hospedeiro, esses parasitos estão aptos a buscar ativamente um hospedeiro suscetível no cardume, reduzindo a taxa de mortandade e incrementando significativamente o desempenho da população de parasitos.

Girodactílídeos, assim como espécies de famílias próximas (Boeger *et al.* 1994), carecem de fases larvais livres natantes. Ao nascerem, esses animais já se encontram sobre um hospedeiro compatível, não sendo necessário buscar ativamente um hospedeiro como fazem os animais de espécies com larvas ciliadas (ex. Dactylogyrídeos). Tanto girodactílídeos ovíparos como vivíparos já apresentam o háptor totalmente formado e funcional, mas os ovíparos, ao eclodir, são animais juvenis, enquanto os vivíparos são animais sexualmente maduros e grávidos de diversas gerações de vermes no nascimento (Bakke *et al.* 2007). Desta forma, é esperado que as infrapopulações de parasitos sejam compostas por indivíduos geneticamente próximos, compondo, o que neste estudo, serão chamados de grupos familiares. Entretanto, se esses indivíduos são capazes de se transmitir continuamente (Boeger *et al.* 2003, Bakke *et al.* 2007), essas infrapopulações poderiam ser compostas por diferentes grupos familiares de parasitos que imigram de hospedeiros distintos e indivíduos de um determinado grupo familiar devem ser encontrados em hospedeiros distintos. Essas são duas hipóteses (hipótese nula e hipótese alternativa) que podem ser testadas com sistemas hospedeiros-parasitos naturais ou experimentais.

Marcadores moleculares têm sido utilizados amplamente em estudos populacionais e muitos desses estudos têm utilizado microssatélites como marcadores para inferir relações de parentesco entre indivíduos (Balloux e Lugon-Moulin 2002, Ashworth e Clegg 2003, Vouillamoz e Grandó 2006, Schuster *et al.* 2009, Clementino *et al.* 2010) por sua boa reprodutibilidade, serem altamente variáveis e terem herança codominante (Zane *et al.* 2002). Entretanto, este tipo de marcador necessita de um conhecimento prévio de

sequências de DNA-alvo para serem desenvolvidos, e quando testados podem apresentar uma baixa variabilidade, como encontrado por Delmotte *et al.* (2006).

Marcadores dominantes (RAPD, RFLP e ISSR) têm sido utilizados amplamente para os mesmos fins (Levitan e Grosberg 1993, Miller 2000, Anderson 2008, Gupta *et al.* 2008, Hussein *et al.* 2008) com o benefício de não ser requerido nenhum conhecimento genético prévio e terem um menor custo para serem desenvolvidos (Mueller e Wolfenbarger 1999). Como são expressos como alelos dominantes, não se pode inferir homozigose ou heterozigose, sendo menos informativos do que alelos codominantes. Mas cada iniciador amplifica regiões múltiplas, e com a quantidade de iniciadores disponíveis na literatura, o número de loci polimórficos é potencialmente alto (Levitan e Grosberg 1993), o que torna os marcadores dominantes uma boa alternativa aos codominantes para inferir relações de parentesco entre indivíduos (Hardy 2003).

Desta forma, o presente trabalho utiliza marcadores moleculares ISSR para estabelecer hipóteses de relacionamentos genealógicos entre girodactilídeos vivíparos e, com base em sua distribuição entre hospedeiros, tem como objetivo testar as duas hipóteses apresentadas acima.

## MATERIAL E MÉTODOS

O sistema composto por *G. anisopharynx*, um girodactílideo vivíparo, e seus hospedeiros *C. ehrhardti* e *C. paleatus*, ambos Callichthyidae (Siluriformes), foi o utilizado neste estudo. *Corydoras paleatus* e *C. ehrhardti* têm grande proximidade filogenética como sugerem características morfológicas e genéticas compartilhadas (Oliveira *et al.* 1993). *Corydoras ehrhardti* se distribui somente no sul e sudeste do Brasil, enquanto *C. paleatus* se distribui por rios da região sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Nijssen 1970). As duas espécies, como mencionado anteriormente, compartilham suas espécies de *Gyrodactylus* e formam cardumes comuns quando em simpatria. Esse sistema parasito-hospedeiro tem sido usado em uma série de estudos sobre a biologia comparada e evolução do relacionamento dessas espécies (Boeger *et al.* 2005, Pie *et al.* 2006, Bueno-Silva *et al.* 2011).

Foram coletados 200 espécimes de *C. paleatus* e *C. ehrhardti* no mês de agosto de 2010, com auxílio de tarrafa (abertura circular de 9m e malha 0,5cm) no rio Iguaçu, município de Lapa (PR) (25°79'41,6"S; 50°19'99,7"W). Os peixes foram acondicionados individualmente em frascos com água quente (60–70°C) que foram agitados vigorosamente para facilitar o desprendimento dos parasitos (Kristky e Stockwell 2005). As amostras foram fixadas em etanol 96% para subsequente análise morfológica e molecular.

As amostras foram levadas até o laboratório e os peixes tiveram seu comprimento total medido. Os parasitos foram coletados com o auxílio de um estereomicroscópio e cada espécime foi nomeado seguindo a nomenclatura adotada na ficha de tombo do laboratório, sendo identificados por "G" + "número". O háptor de cada espécime analisado foi removido e montado em lâmina com meio de Hoyer para confirmação da espécie por meio da morfologia das estruturas esclerotizadas (Humason 1979, Kritsky *et al.* 1995). O tronco foi utilizado para a extração do DNA total.

## Marcadores moleculares

O sistema de marcadores dominantes denominado “Inter-Simple Sequence Repeats” (ISSR), permite detectar polimorfismos individuais de loci entre microssatélites, utilizando um iniciador desenvolvido a partir de sequências simples de di ou trinucleotídeos (Zietkiewicz *et al.* 1994). Nesse método, ciclos de reações em cadeia da polimerase do DNA são realizados com iniciadores que anelam em regiões repetitivas conhecidas como microssatélites (SSR) e amplificam os fragmentos localizados entre as regiões de SSR's. O genoma de cada organismo analisado é estimado pelo padrão de bandas dos amplicons identificados em uma corrida de gel de eletroforese.

Os ISSR's são marcadores ideais para análises intraespecíficas devido a sua abundância e alto grau de polimorfismo entre indivíduos de uma população com genótipos intimamente relacionados (Cregan *et al.* 1994, Jarret e Bowen 1994, Hokanson *et al.* 1998, Lanham e Brennan 1998). Desde a introdução da técnica de PCR-ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994), ela tem sido amplamente utilizada em estudos botânicos de mapeamento genético, estudos populacionais, estudos de diferenciação de espécies e híbridos e de diversidade genética (Godwin *et al.* 1997, Reddy *et al.* 2002, Lin *et al.* 2007, Hussein *et al.* 2008, Manica-Cattani *et al.* 2009, Dinolfo *et al.* 2010 e Lin *et al.* 2010). Recentemente, zoólogos a têm aplicado a diferentes táxons (Velu *et al.* 2008, Souza *et al.* 2008, Machkour-M'Rabet, *et al.* 2009, Perteguer *et al.* 2009 e Stolpovskii *et al.* 2010). Contudo, não foi realizado nenhum estudo utilizando esta técnica com espécies de Monogenoidea.

A extração de DNA foi realizada com kit de extração DNeasy (Qiagen). O protocolo foi adaptado para a extração de DNA de espécies de Monogenoidea: o produto final foi eluído duas vezes com 50 µl de tampão AE e seco em SpeedVac a 60<sup>0</sup>C por 50 minutos, totalizando 20 µl finais. Foi obtida, em média, uma concentração de DNA de 12ng/µl por amostra.

Um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de ISSR foi usado, inicialmente, para testar a eficiência de amplificação de DNA de amostras de *Gyrodactylus* (Wolfe *et al.* 1998) e estão listados na Tabela 1. Esse teste foi conduzido com amostras de DNA extraídas de nove indivíduos de uma infrapopulação de *G. anisopharynx*. Sete iniciadores testados não amplificaram

fragmentos (ISSR1, ISSR4, ISSR9, ISSR14, ISSR16, ISSR17, ISSR18 e ISSR19). Os iniciadores escolhidos foram ISSR5, ISSR7, ISSR15 e 17899, pois estes apresentaram maior polimorfismo individual e amplificação de fragmentos a partir de 1 µl de extrato de DNA a 12 ng/µl.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no teste de eficiência de amplificação de DNA com amostras de *Gyrodactylus anisopharynx*.

Iniciador	Sequência
ISSR1	GTGTGTGTGTGTRG
ISSR2	CACACACACACACAYG
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGARG
ISSR4	GTGTGTGTGTGTGTYG
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGYG
ISSR6	GAGAGAGAGA
ISSR7	CACCACCACCACRC
ISSR8	GTGGTGGTGGTGRC
ISSR9	CTCTCTCTCTCTCTRA
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAYC
ISSR11	CTCCTCCTCCTCRC
ISSR12	GAGGAGGAGGAGRC
ISSR13	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
ISSR14	GTGGTGGTGGTG
ISSR15	AGAGAGAGAGAGAGAGT
ISSR16	AGAGAGAGAGAGAGAGC
ISSR17	CTCTCTCTCTCTCTTT
ISSR18	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
ISSR19	GTGGTGGTGGTGGTG
ISSR20	ACACACACACACACRG
17899	CACACACACACAARG

A solução de PCR para amplificação de ISSR continha um volume total de 25 µl, consistindo de: 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,5 µl de PCR-Buffer (10X), 0,4 µl de dNTP (25mM), 0,3 µl de cada iniciador (30 pmol), 0,3 µl de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen), 12 ng de DNA alvo e água bidestilada até completar volume final. As condições da reação em cadeia da polimerase utilizadas nessa amplificação foram: desnaturação inicial à 94 °C por 1,5 min; 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 s; anelamento à temperatura

específica para cada iniciador (Tabela 2) por 45 s; extensão à 72 °C por 1,5 min e extensão final à 72 °C por 3 min. A definição das bandas resultantes foi obtida por meio de eletroforese de 8 µl do produto da reação de polimerase em um gel de poliacrilamida 4% usando TBE (1X) à 80V por 6 horas. As bandas foram coradas com Gel Red (BioTium) e visualizadas sob luz UV. Imagens dessas bandas foram registradas em fotografia digital com o auxílio do equipamento de fotodocumentação Vilber-Lourmat.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise de ISSR de amostras de *Gyrodactylus anisopharynx*.

Iniciador	Sequência	Temperatura de anelamento
17899	CACACACACACAARG	52 °C
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGYG	56 °C
ISSR7	CACCACCACCACRC	50 °C
ISSR15	AGAGAGAGAGAGAGAGT	42 °C

O padrão de banda de cada indivíduo foi definido a partir das imagens obtidas dos géis usando o software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics). O tamanho dos fragmentos obtidos foi determinado pela comparação com fragmentos de tamanhos conhecidos de um marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen). Os fragmentos amplificados foram agrupados de acordo com seu peso molecular e pontuados como variáveis discretas, gerando, para cada indivíduo e iniciadores, uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas homólogas, que foi utilizada para as análises subsequentes.

#### Variabilidade entre infrapopulações

Para avaliar a diferenciação genética das infrapopulações amostradas neste estudo, a estatística  $F$  foi estimada utilizando metodologia proposta por Weir e Cockerham 1984, com o software HICKORY v. 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003), a partir dos índices de fixação de Wright  $F_{IS}$  (consanguinidade ou perda de heterozigosidade dentro da população) e  $F_{ST}$  (medida de diferenciação entre

populações) calculados (ambos variando de 0 a 1). Um alto valor de  $F_{ST}$  indica uma alta diferenciação genética entre as infrapopulações, enquanto um alto valor de  $F_{IS}$  indica um alto grau de endocruzamento. Com o mesmo software, foi estimada a diversidade genética dentro de cada infrapopulação ( $h_s$ ) e sua média entre todas as populações ( $H_s$ ). Se a hipótese alternativa for aceita e ocorrer a transmissão contínua de parasitos sobre os hospedeiros, espera-se encontrar um baixo valor de  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ . Caso a hipótese nula seja a aceita, em que as infrapopulações de cada hospedeiro é composta de indivíduos próximos geneticamente, é esperado encontrar um alto valor para o  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ .

### Análise Genealógica e teste de hipóteses

A matriz binária gerada, conforme descrito anteriormente, foi usada para inferir a relação de parentesco dos indivíduos amostrados, com auxílio do software COLONY 2.0 (Jones e Wang 2010), utilizando o método de máxima verossimilhança. Os parâmetros adotados para esta análise foram que o sistema de acasalamento é poligâmico, com endocruzamento, sem conhecimento prévio de qualquer relação de parentesco. O software assume três subamostras: a prole, candidatos a pais e candidatos a mães, sendo que os dois últimos podem ser determinados com valor "0", não sendo inferido dentre os genótipos amostrados nem pai nem mãe. Os genótipos de cada locus de cada pai foi inferido através de um quadro de verossimilhança pelo cálculo da probabilidade de se observar os genótipos de todos os filhos de um pai inferido. São inferidos apenas genótipos parentais de locus único, e esta inferência só é precisa em casos onde genótipos de pais e mães podem ser distinguidos. Caso contrário, genótipos paternos e maternos são simétricos e é impossível inferir cada pai com precisão.

O software Pedigree Viewer 6.5b (Kinghorn 1994) foi usado para visualizar as relações construídas pelo COLONY e gerar um gráfico de genealogia. A análise de cluster foi utilizada para agrupar indivíduos geneticamente semelhantes. Um dendograma de cluster foi construído pelo software PAST 2.09 (Hammer *et al.* 2001) utilizando o índice de Jaccard e o algoritmo UPGMA. O suporte de ramo foi obtido pelo método de "bootstrap" com 1.000 repetições.

O dendograma gerado pelo software PAST foi submetido ao software Mesquite 2.74 (Maddison e Maddison 2010) para analisar se os grupos de parasitos formados na análise de cluster estão ou não distribuídos ao acaso entre hospedeiros distintos (hipótese alternativa) ou se existe um padrão de indivíduos de um mesmo grupo permanecer sobre o hospedeiro de seus antepassados (hipótese nula). O padrão distribucional observado nesses grupos foi analisado pelo método de reconstrução de caráter ancestral usando o critério de parcimônia (Maddison 1995). Esse método consiste em otimizar a combinação de grupo (conforme definida pelo software PAST) e o hospedeiro sobre o dendograma da análise de cluster dos parasitos. Esse procedimento permitiu avaliar se uma única infrapopulação pode hospedar mais do que um grupo de parasitos geneticamente semelhantes, sem que isso resulte na rejeição (mesmo que parcial) da hipótese nula. Uma distribuição de associações ao acaso foi definida através da aleatorização dos hospedeiros com 10.000 repetições e pela definição da frequência de casos com o mesmo número de passos evolutivos (troca de hospedeiros). Se o número de eventos de dispersões/transmissão observados na otimização dos caracteres não for significativamente ( $p < 0,1$ ) diferente do número de eventos obtidos ao acaso, a hipótese alternativa de transmissão máxima é aceita. Por outro lado, se o número postulado de passos/transmissões for significativamente diferente da média observada na distribuição ao acaso, a hipótese nula é aceita e a distribuição destes grupos de parasitos entre hospedeiros não é gerada ao acaso.

A definição dos grupos familiares de *G. anisopharynx* foi realizada considerando um critério mais restrito. Nessa análise, foram considerados grupos familiares apenas aqueles grupos de parasitos consistentes nos agrupamentos obtidos pela análise do COLONY e pela análise de cluster, simultaneamente. Essa análise considerou que se a hipótese nula é aceita, o agrupamento de indivíduos de um mesmo grupo familiar de *G. anisopharynx*, sobre um mesmo hospedeiro, representa um evento determinístico e, portanto, previsível. Por outro lado, o processo de transmissão deve ocorrer aleatoriamente, representando um evento estocástico.

Os grupos familiares definidos no procedimento descrito acima e a distribuição das mesmas sobre os hospedeiros foram listados em tabelas,

sendo calculada a intensidade média de infestação (IM) de cada grupo familiar (definido por: número de indivíduos por grupo familiar /hospedeiros em que o grupo familiar ocorre). A frequência de ocorrência de cada intensidade média calculada entre os grupos familiares foi apresentada em gráfico.

### Índices de dispersão

Eventos de nascimento, morte e migração de indivíduos de uma espécie determinam a distribuição dessa espécie no espaço (Toledo *et al.* 2006), podendo apresentar três padrões de distribuição: aleatório, uniforme ou agregado (Barbour *et al.* 1999). Para definir o padrão de distribuição de uma espécie, sua disposição espacial é medida, utilizando-se índices de agregação ou dispersão (Green 1966).

A transmissão contínua defendida pela hipótese alternativa determinaria um padrão aleatório de distribuição, enquanto que o agrupamento de indivíduos em grupos familiares, defendido pela hipótese nula, um padrão agregado.

Para determinar se a distribuição dos grupos familiares de *G. anisopharynx* sobre os hospedeiros é agregada (hipótese nula) ou aleatória (hipótese alternativa) foram calculados: o Expoente  $k$  da distribuição binomial negativa, o Coeficiente de Green, a Razão entre Variância e Média, e Índice de Morisita. Os cálculos destes índices foram realizados conforme citado por Toledo *et al.* (2006).

## RESULTADOS

Foram amostradas 13 infrapopulações de *G. anisopharynx* de *C. paleatus* (n=11) e *C. ehrhardti* (n=2), totalizando 82 parasitos. A intensidade de infestação de cada hospedeiro (número de parasitos por infrapopulação) encontra-se na Tabela 3.

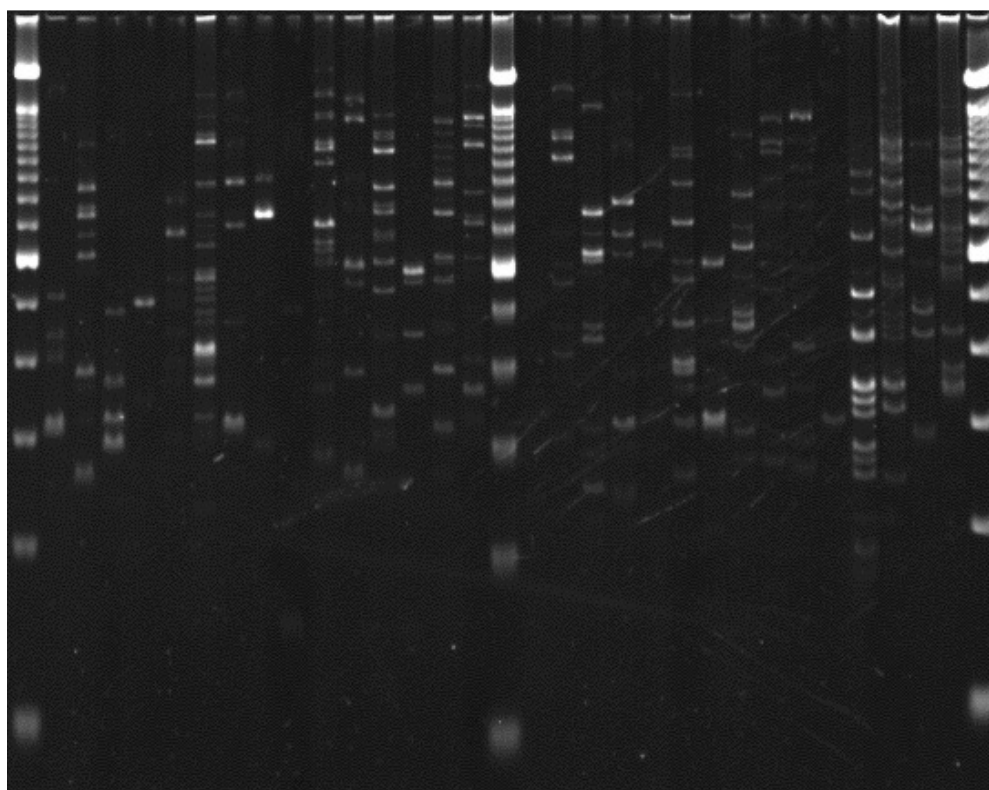
**Tabela 3.** Infrapopulações de *Gyrodactylus anisopharynx* e intensidade de infestação de cada hospedeiro. As siglas correspondem às espécies hospedeiras: CP = *Corydoras paleatus*; CE = *Corydoras ehrhardti*.

Infrapopulação	Intensidade de infestação	Hospedeiro
1	5	CP
2	11	CP
3	6	CP
4	7	CP
5	11	CP
6	7	CP
7	3	CE
8	5	CP
9	5	CE
10	7	CP
11	4	CP
12	7	CP
13	4	CP

Somando os resultados encontrados com os quatro iniciadores de ISSR, foi observado um total de 507 bandas, sendo que 314 (62%) delas foram polimórficas. O número total de bandas e de bandas polimórficas por iniciador pode ser verificado na Tabela 4. Um exemplo do padrão de bandas gerado por um dos iniciadores é mostrado na Figura 1.

**Tabela 4.** Desempenho dos iniciadores utilizados na análise de ISSR com amostras de *G. anisopharynx* indicando: número total de bandas, número de bandas polimórficas e amplitude de fragmentos amplificados obtidos por cada iniciador.

Iniciador	Nº total de bandas	Nº de bandas polimórficas	Faixa de tamanho (bp)
17899	198	150	166-2161
ISSR5	45	24	289-1974
ISSR7	208	98	294-2259
ISSR15	56	42	407-2221



**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida com produtos da amplificação do primer 17899. Colunas marginais e central com “ladder” de 100 bp (Invitrogen).

O tamanho dos produtos amplificados variaram desde 166 bp até 2259 bp. A maior porcentagem de polimorfismo foi detectada com os iniciadores 17899 e ISSR15, com 75,8% e 75% de bandas polimórficas, respectivamente. Índices mais baixos de polimorfismo foram obtidos com os iniciadores ISSR5 (53,3%) e ISSR7 (47,1%).

Os resultados gerados pelo HICKORY indicam uma baixa diferenciação genética entre as infrapopulações, apresentando baixo valor de  $F_{st}$  (0,003) e indicam alta taxa de endocruzamento, com um alto valor de  $F_{is}$  (0,8). A diversidade genética foi baixa dentro de cada infrapopulação, porém, foi homogênea entre infrapopulações, com  $H_s = 0,09$  (Tabela 5).

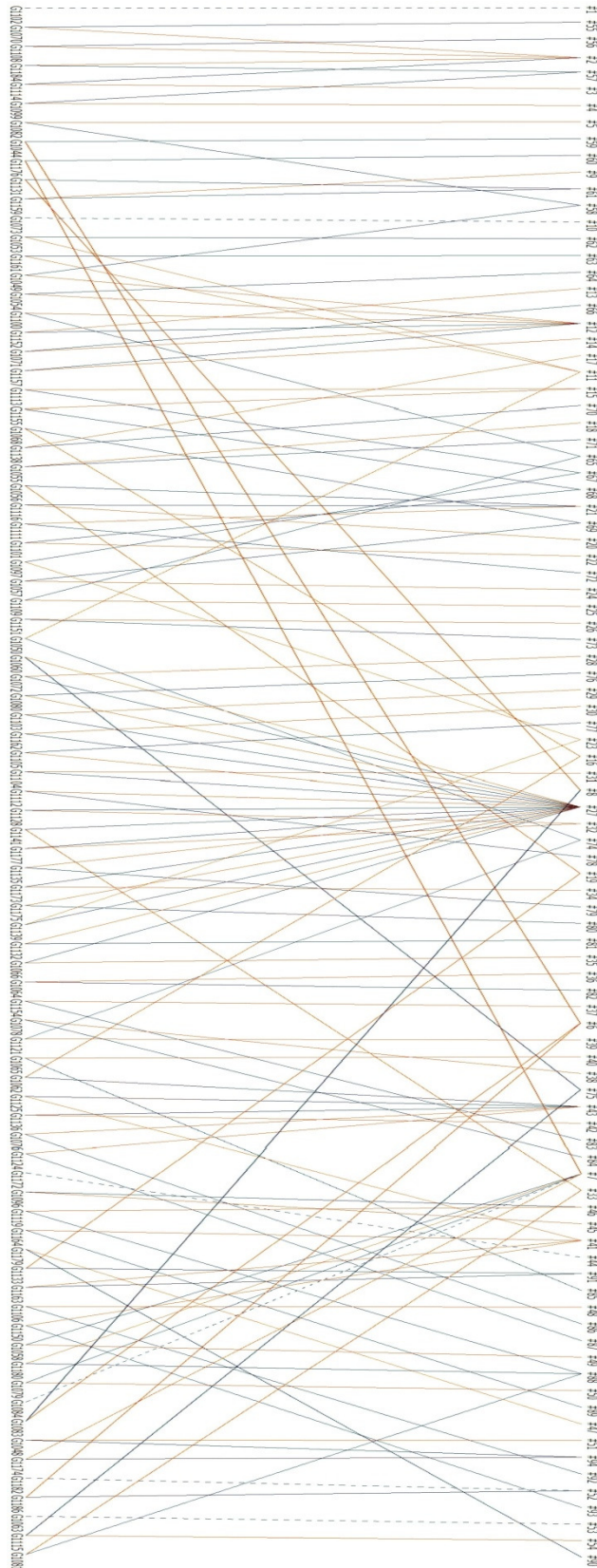
**Tabela 5.** Parâmetros calculados pelo software HICKORY. Os números nas colunas 2,5% e 97,5% correspondem aos limites inferior e superior de um intervalo de credibilidade de 95%, respectivamente. Valores de  $F_{st}$ ,  $F_{is}$ ,  $h_s$  e  $H_s$  variando de 0 a 1.

Parâmetro	Média	Desvio padrão	2,5%	50%	97,50%
$F_{st}$	0,003	0,001	0,001	0,002	0,005
$F_{is}$	0,8	0,2	0,5	0,9	1,0
hs[1]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[2]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[3]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[4]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[5]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[6]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[7]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[8]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[9]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[10]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[11]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[12]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
hs[13]	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1
$H_s$	0,09	0,01	0,07	0,09	0,1

A partir da matriz binária da distribuição e compartilhamento das bandas de ISSR, foi possível inferir as possíveis relações de parentesco entre os indivíduos (Tabela 6), usando o software COLONY. Com base nesses dados, o software inferiu pais genéricos que associam esses parasitos em relações de irmandade. O gráfico gerado pelo software Pedigree Viewer 6.5b, a partir dos resultados gerados pelo COLONY, permitiu observar essas relações de parentesco (Figura 2).

**Tabela 6.** Relações de parentesco geradas pelo software COLONY para espécimes de *Gyrodactylus anisopharynx*, contendo espécimes amostrados e pais hipotéticos (relação parental) inferidos a partir da verossimilhança entre genótipos dos parasitos. Em negrito, espécimes que não apresentaram nenhuma relação de parentesco com nenhum dos outros espécimes.

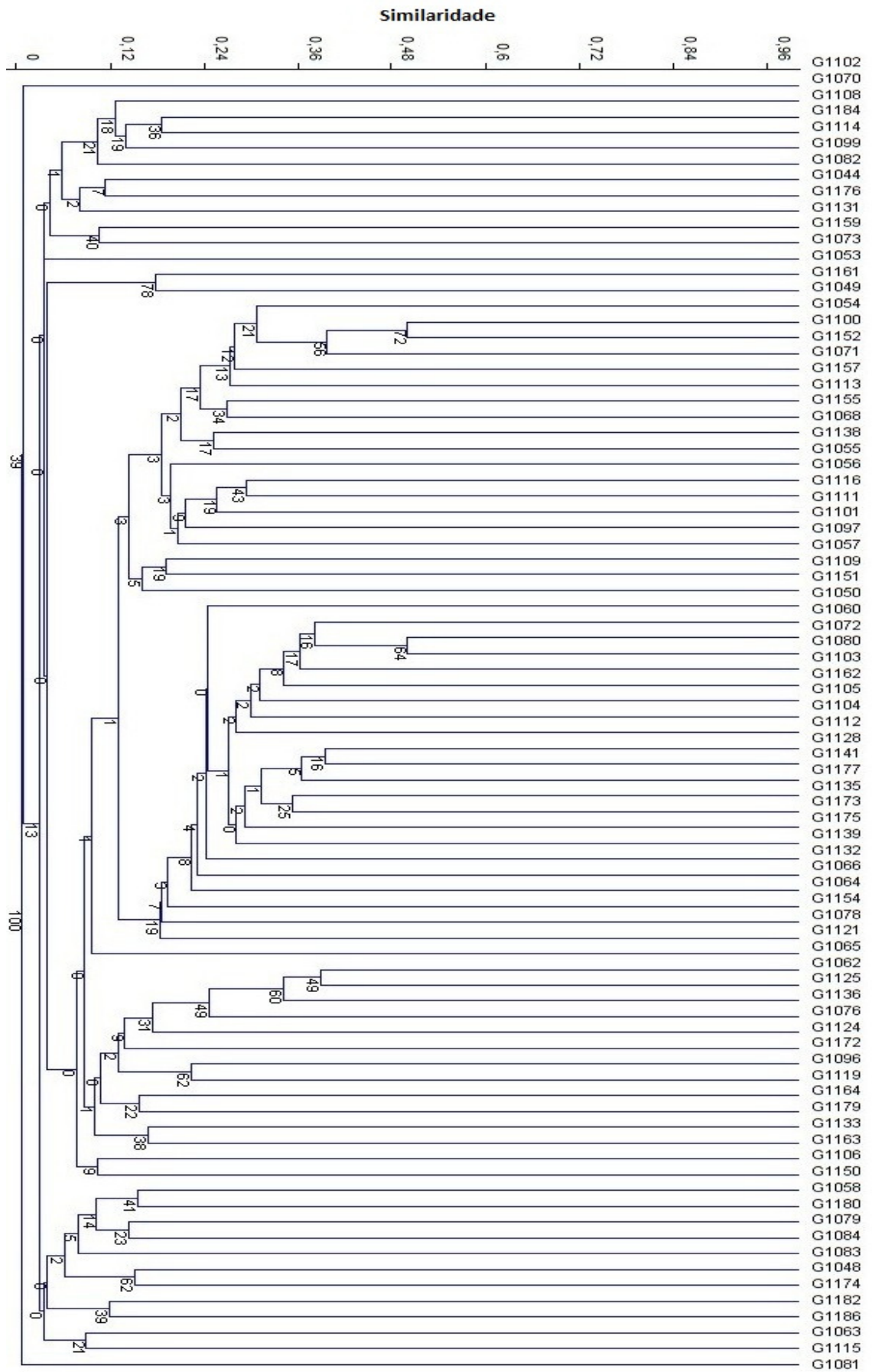
Espécime	Relação Parental	Espécime	Relação Parental
G1044	#6	#59	G1111 #21 #72
G1048	#51	#94	G1112 #27 #78
G1049	#12	#58	G1113 #15 #67
G1050	#11	#74	G1114 #3 #2
G1053	#11	#62	G1115 #54 #75
<b>G1054</b>	#12	#64	G1116 #20 #21
<b>G1055</b>	#18	#71	G1119 #46 #88
G1056	#19	#21	G1121 #39 #74
G1057	#24	#69	G1124 #43 #87
G1058	#49	#7	G1125 #41 #43
G1060	#27	#75	G1128 #32 #27
G1062	#16	#43	G1131 #8 #61
<b>G1063</b>	#53	#53	G1132 #27 #81
<b>G1064</b>	#36	#82	G1133 #19 #91
<b>G1065</b>	#40	#85	G1135 #27 #79
G1066	#35	#27	G1136 #42 #43
G1068	#16	#69	<b>G1138</b> #17 #70
G1070	#2	#55	G1139 #23 #27
G1071	#12	#66	G1141 #33 #27
G1072	#28	#27	G1150 #41 #93
<b>G1073</b>	#10	#10	<b>G1151</b> #26 #73
G1076	#43	#86	G1152 #13 #12
<b>G1078</b>	#38	#84	G1154 #37 #83
G1079	#50	#7	G1155 #15 #68
G1080	#27	#76	G1157 #14 #12
G1081	#33	#88	G1159 #9 #61
G1082	#5	#58	G1161 #11 #63
G1083	#6	#8	G1162 #30 #27
G1084	#7	#7	G1163 #41 #91
G1096	#45	#46	G1164 #41 #89
G1097	#23	#67	<b>G1172</b> #44 #44
G1099	#4	#57	G1173 #34 #27
G1100	#12	#65	G1174 #7 #94
G1101	#22	#68	G1175 #27 #80
<b>G1102</b>	#1	#1	G1176 #7 #60
G1103	#29	#27	G1177 #32 #27
G1104	#31	#27	<b>G1179</b> #47 #90
G1105	#27	#77	G1180 #7 #88
<b>G1106</b>	#48	#92	G1182 #52 #52
G1108	#2	#56	G1184 #2 #57
G1109	#25	#65	G1186 #6 #52



**Figura 2.** Relações de parentesco entre indivíduos de *G. anisopharynx* visualizadas com software Pedigree Viewer. Coluna à esquerda composta pelos espécimes de *G. anisopharynx* e coluna à direita composta por pais hipotéticos. Linha vermelha = pai; linha preta = mãe; linhas pontilhadas = autofecundação/partenogênese. Como os indivíduos dessa espécie são monóicos, um mesmo parasito pode ser pai e mãe de indivíduos diferentes.

Treze parasitos (G1102, G1073, G1138, G1055, G1151, G1064, G1054, G1078, G1065, G1172, G1179, G1106, G1063), dos 82 analisados, não apresentaram relação de parentesco com nenhum outro indivíduo (15,85%) e apenas dois (G1128 e G1177) são irmãos de mesmos pais. Todos os demais indivíduos formam diferentes grupos em relações de meia irmandade.

O dendograma gerado pela análise de cluster (Figura 3) mostrou que os 82 indivíduos analisados podem ser separados em 34 grupos diferentes, contendo de um a oito indivíduos por grupo, entretanto, o suporte de ramo encontrado para esses grupos foi baixo e apenas alguns indivíduos foram agrupados com suporte de ramo superior a 50% (Tabela 7).



**Figura 3.** Dendrograma gerado pela análise de cluster com o software PAST. Suporte de ramo obtido pelo método “bootstrap”, com 1000 repetições, expresso em porcentagem.

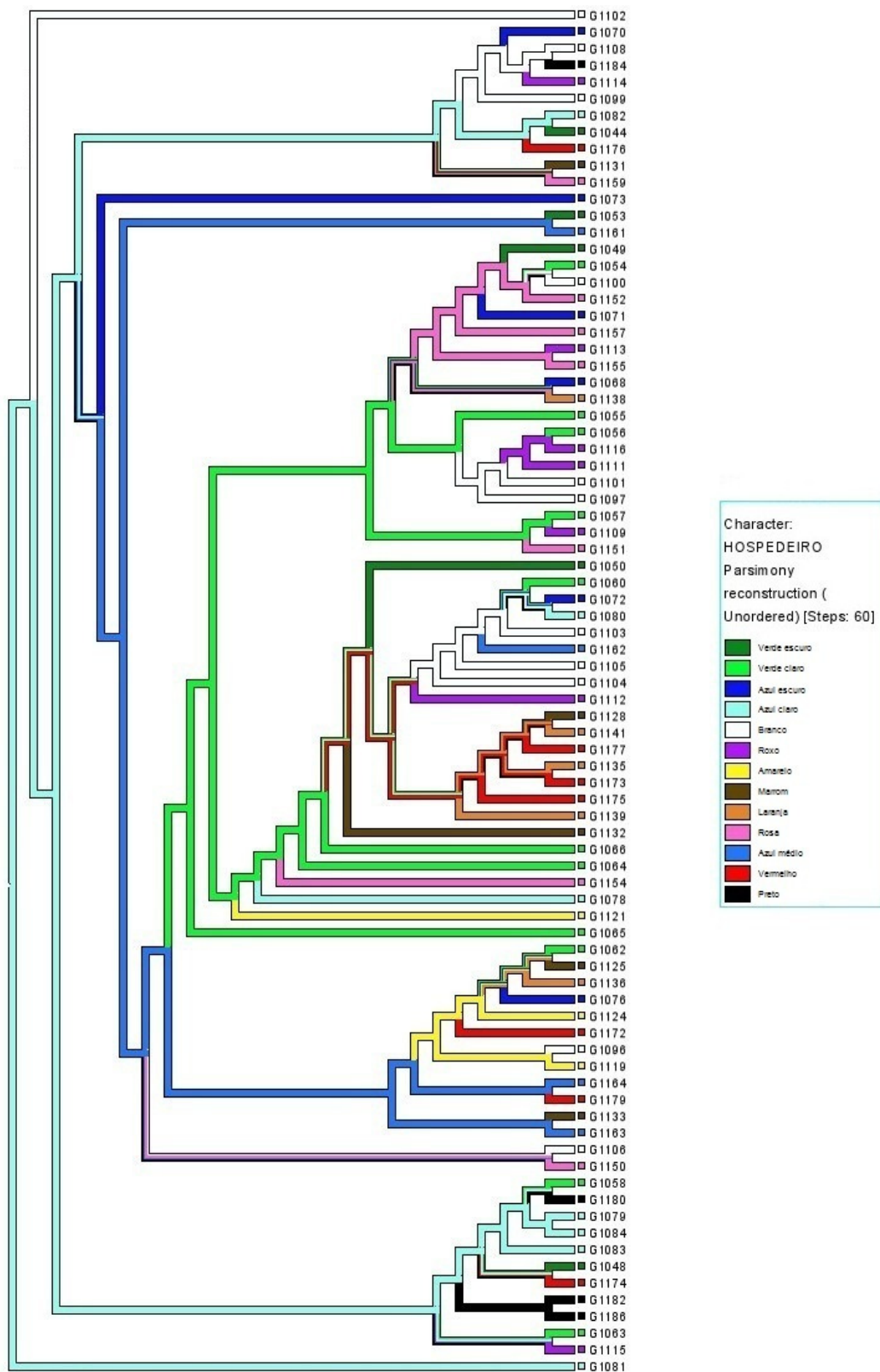
**Tabela 7.** Trinta e quatro grupos formados pela análise de cluster com seus indivíduos e tamanhos totais (N). Em negrito, indivíduos agrupados com suporte de ramo superior a 50.

Grupo	Espécime	N
1	G1102	1
2	G1070	5
	G1108	
	G1184	
	G1114	
3	G1099	3
	G1082	
	G1044	
4	G1176	2
	G1131	
5	G1159	1
6	G1073	2
	<b>G1053</b>	
7	<b>G1161</b>	6
	G1049	
	<b>G1054</b>	
	<b>G1100</b>	
	<b>G1152</b>	
	G1071	
8	G1157	2
	G1113	
9	G1155	2
	G1068	
10	G1138	1
11	G1055	5
	G1056	
	G1116	
	G1111	
	G1101	
12	G1097	3
	G1057	
	G1109	
13	G1151	1
	G1050	
14	G1060	8
	<b>G1072</b>	
	<b>G1080</b>	
	G1103	
	G1162	
	G1105	
	G1104	
	G1112	

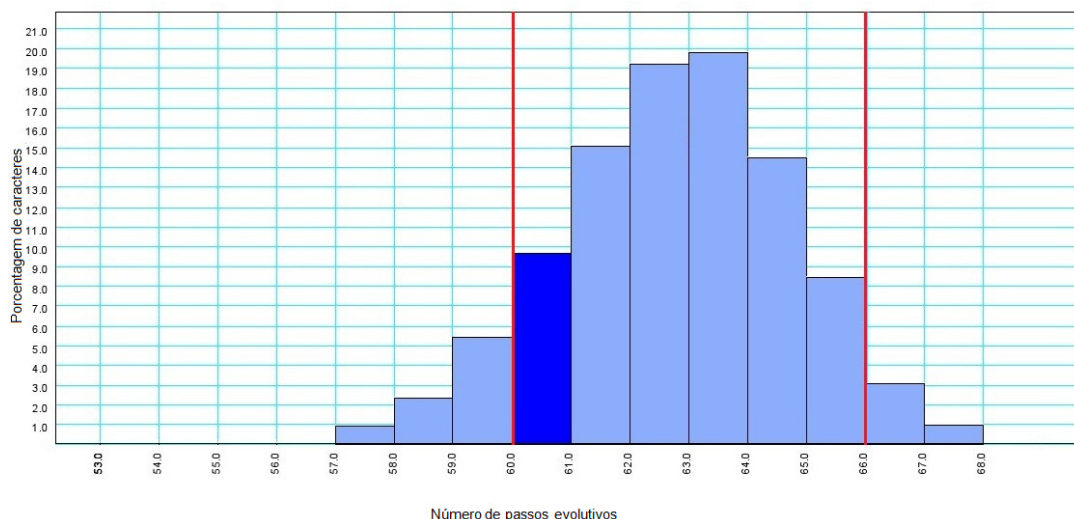
Continuação da Tabela 7.

Grupo	Espécime	N
15	G1128	7
	G1141	
	G1177	
	G1135	
	G1173	
	G1175	
	G1139	
16	G1132	1
17	G1066	1
18	G1064	1
19	G1154	1
20	G1078	1
21	G1121	1
22	G1065	1
23	<b>G1062</b>	5
	<b>G1125</b>	
	<b>G1136</b>	
	G1076	
	G1124	
24	G1172	1
25	<b>G1096</b>	2
	<b>G1119</b>	
26	G1164	2
	G1179	
27	G1133	2
	G1163	
28	G1106	2
	G1150	
29	G1058	4
	G1180	
	G1079	
	G1084	
30	G1083	1
31	<b>G1048</b>	2
	<b>G1174</b>	
32	G1182	2
	G1186	
33	G1063	2
	G1115	
34	G1081	1

A análise de reconstrução de caráter ancestral gerada com o software Mesquite permitiu visualizar de que maneira os grupos formados na análise de cluster estão distribuídos entre os hospedeiros (Figura 4). A distribuição da frequência do número de “passos” necessários para explicar a associação entre parasitos e seus hospedeiros é apresentada na Figura 5.



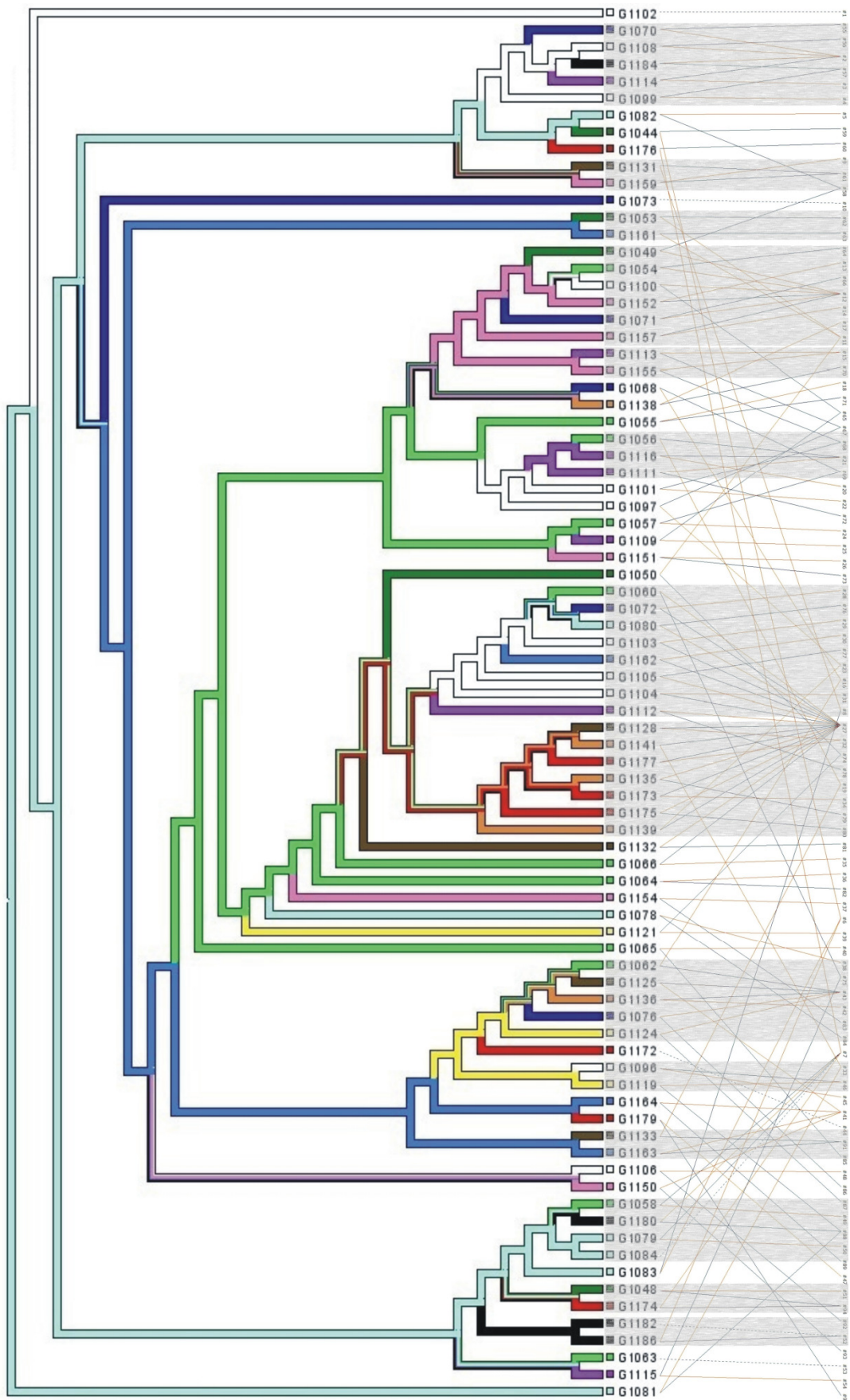
**Figura 4.** Análise de reconstrução de caráter ancestral por parcimônia. A figura representa o relacionamento de espécimes de *Gyrodactylus anisopharynx* coletados em *Corydoras paleatus* e *Corydoras ehrhardti*. Os hospedeiros ( $n = 13$ ) foram plotados no dendograma como se fossem caracteres sendo designada uma cor a cada hospedeiro. Número de passos evolutivos = 60.



**Figura 5.** Frequência do número de passos evolutivos observados, de fato, e obtidos ao acaso. Os hospedeiros foram aleatorizados 10.000 vezes. A coluna em azul escuro representa o número de passos evolutivos ( $n = 60$ ) observados no dendograma de *Gyrodactylus anisopharynx*. As outras colunas, em azul claro, demonstram o número de passos evolutivos (57-68 passos) esperados em uma distribuição aleatória de espécimes de parasitos entre hospedeiros distintos. As linhas vermelhas indicam o intervalo de confiança de 90%.

Foi possível observar que a maioria dos grupos de parasitos formados pela análise de cluster não se restringem a apenas um único hospedeiro, pois aparecem distribuídos dentre vários dos 13 hospedeiros amostrados (Figura 4). A análise de reconstrução de caráter ancestral mostrou (Figura 5) que o número de passos evolutivos observados não foi significativamente diferente ( $p > 0,1$ ) do número de eventos de troca de hospedeiro esperados ao acaso. Entretanto, o número de passos evolutivos observados está bastante próximo ao limite inferior da distribuição ao acaso

Por meio da união das Figuras 2 e 5, os grupos de parasitos compartilhados em ambas as análises (COLONY e cluster) foram designados como grupos familiares. Esses grupos são compostos por indivíduos que foram agrupados por similaridade genética, segundo a análise de cluster, e ao mesmo tempo, considerados irmãos ou meio irmãos pela análise genealógica (Figura 6).



**Figura 6.** Grupos familiares (em cinza) de *Gyrodactylus anisopharynx*. Análises geradas pelos softwares Mesquite (à esquerda) e COLONY (à direita).

Os grupos familiares definidos no procedimento descrito acima e a distribuição das mesmas sobre os hospedeiros estão listados nas Tabelas 8 e 9.

**Tabela 8.** Grupos familiares de *G. anisopharynx* com número total de espécimes por grupo (N), espécimes de cada grupo e hospedeiros em que ocorrem.

Grupo familiar	N	Espécime	Hospedeiro
1	5	G1070	azul escuro
		G1108	branco
		G1184	preto
		G1114	roxo
		G1099	branco
2	2	G1131	marrom
		G1159	rosa
3	2	G1053	verde escuro
		G1161	azul médio
4	6	G1049	verde escuro
		G1054	verde
		G1100	branco
		G1152	rosa
		G1071	azul escuro
5	2	G1157	rosa
		G1113	roxo
6	3	G1155	rosa
		G1056	verde
		G1116	roxo
7	8	G1111	roxo
		G1060	verde
		G1072	azul escuro
		G1080	azul claro
		G1103	branco
		G1162	azul médio
		G1105	branco
G1104	branco		
G1112	roxo		

Continuação Tabela 8.

Grupo familiar	N	Espécime	Hospedeiro
8	7	G1128	marrom
		G1141	laranja
		G1177	vermelho
		G1135	laranja
		G1173	vermelho
		G1175	vermelho
		G1139	laranja
9	5	G1062	verde
		G1125	marrom
		G1136	laranja
		G1076	azul escuro
		G1124	amarelo
10	2	G1096	branco
		G1119	amarelo
11	2	G1133	marrom
		G1163	azul médio
12	4	G1058	verde
		G1180	preto
		G1079	azul claro
		G1084	azul claro
13	2	G1048	verdeescuro
		G1174	vermelho
14	2	G1182	preto
		G1186	preto

**Tabela 9.** Hospedeiros infectados, indicando grupo familiar de *G. anisopharynx* em cada hospedeiro, número de indivíduos de cada grupo sobre o hospedeiro (N/Grupo familiar) e o número total (N) de espécimes sobre o hospedeiro.

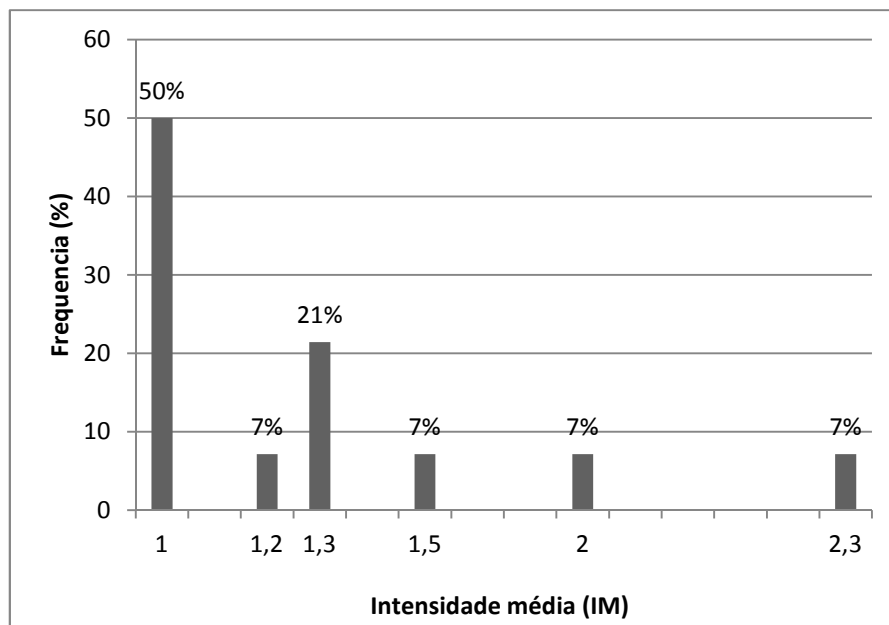
Hospedeiro	Grupo familiar	N/Grupo familiar	N
Branco	1	2	7
	4	1	
	7	3	
	10	1	
Azul escuro	1	1	4
	4	1	
	7	1	
	9	1	
Preto	1	1	4
	12	1	
	14	2	
Roxo	1	1	5
	5	1	
	6	2	
	7	1	
Marrom	2	1	4
	8	1	
	9	1	
	11	1	
Rosa	2	1	4
	4	2	
	5	1	
Azul médio	3	1	3
	7	1	
	11	1	
Verde claro	4	1	5
	6	1	
	7	1	
	9	1	
	12	1	
Azul claro	7	1	3
	12	2	
Laranja	8	3	4
	9	1	
Vermelho	8	3	4
	13	1	

Continuação Tabela 9.

Hospedeiro	Grupo familiar	N/Grupo familiar	N
Amarelo	9	1	2
	10	1	
Verde escuro	3	1	3
	4	1	
	13	1	

Foram definidos quatorze diferentes grupos familiares de *G. anisopharynx*, sendo compostos por dois a oito parasitos, totalizando 52 indivíduos. Dentre os grupos amostrados, somente o Grupo 14 apresentou animais que se encontram em apenas um mesmo hospedeiro. Indivíduos dos demais grupos ocorrem em dois ou até seis hospedeiros diferentes, como ocorre no Grupo 7. Com exceção do Grupo 9, todas os grupos com  $n \geq 3$  habitam pelo menos um hospedeiro com mais de um indivíduo (Tabela 8).

Todos os hospedeiros analisados abrigaram mais de um grupo de parasitos, sendo que o número máximo de grupos encontrados em um único hospedeiro foi igual a cinco, no hospedeiro Verde claro (Tabela 9). Apenas dois grupos amostrados (14%) apresentaram valores de  $IM \geq 2$ . Metade dos grupos (50%) teve intensidade média de apenas um parasito por hospedeiro (Figura 7).



**Figura 7.** Gráfico da frequência das intensidades médias (IM) de infestação entre quatorze grupos familiares de *G. anisopharynx* amostrados.

Os resultados encontrados para os diferentes índices de dispersão estão listados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Índices de dispersão, variância e média calculados para os grupos familiares de *G. anisopharynx*.

Índice	Variância ( $s^2$ )	Média ( $\hat{m}$ )	Valor calculado para o índice	$\chi^2_{\text{cal}(n-1 \text{ gl}, 0,05)}$	Padrão de distribuição
Razão variância/média	4,53	3,71	1,22	15,87	Aleatório
Coeficiente de Green	4,53	3,71	0,0057	0 = aleatório 1 = agregado	Aleatório
K Binomial Negativa	4,53	3,71	16,9	K < 0 = uniforme K < 2 = agregado 2 < K < 8 = agregado moderado K > 8 = aleatório	Aleatório
Índice Morisita	4,53	3,71	1,05	2,13	Aleatório

Os resultados obtidos para o índice da razão entre a variância e a média foi superior a 1, mas não significativo quando comparado ao valor de qui-quadrado de afastamento da aleatoriedade. O índice de dispersão de Green, que foi bem próximo de zero, e o valor obtido para expoente K da distribuição

binomial negativa ( $K > 8$ ) indica distribuição aleatória. O índice de Morisita não foi significativo quando comparado ao teste qui-quadrado, indicando aleatoriedade dos dados amostrais em estudo.

## DISCUSSÃO

Espécies de *Gyrodactylus* apresentam maiores taxas de reprodução em temperaturas mais altas (Bakke *et al.* 2007), sendo esperado, portanto, encontrar um maior número de parasitos no verão e um menor número de parasitos no inverno, como o ocorrido neste estudo. Além da influência da sazonalidade, no caso de *G. anisopharynx*, a competição com outras três espécies deste gênero que ocorrem nos mesmos hospedeiros podem causar o baixo tamanho amostral observado nas infrapopulações capturadas.

Já foram realizados estudos utilizando marcadores moleculares, para diferentes análises, com espécies de *Gyrodactylus* (Huyse e Volckaert 2002, Sterud *et al.* 2002, Bueno-Silva *et al.* 2011), entretanto, nenhum estudo foi realizado abordando análise genealógica ou testando efetivamente como a troca de hospedeiros é realizada por estes parasitos no ambiente e qual sua influência na composição de infrapopulações destes parasitos. O método de ISSR já foi utilizado em outros estudos de genealogia (Ruas *et al.* 2003, Haig *et al.* 2003), mas, pela primeira vez, este método foi aplicado a uma espécie de *Gyrodactylus*. Apesar de ser necessário realizar múltiplas reações da polimerase em cadeia (PCR) nesta metodologia, a baixa concentração de extrato de DNA geralmente obtida com espécies de *Gyrodactylus* não foi um fator limitante, sendo possível realizar toda a etapa molecular. Os resultados indicaram que o ISSR é uma boa alternativa para trabalhar com este grupo de parasitos, sendo encontrada uma alta taxa de polimorfismo total dos quatro iniciadores de ISSR (62%), possibilitando realizar análises populacionais e genealógicas dos espécimes de *G. anisopharynx* amostrados. O menor custo em relação a outros marcadores, a boa reprodutibilidade, a abundância de regiões de DNA-alvo (microsatélites) no genoma de organismos e a falta de marcadores de microsatélites para girodactílideos são outros fatores que tornam essa metodologia uma ferramenta a ser levada em consideração em estudos futuros de análise molecular de Gyrodactilidae.

Os resultados da estatística  $F$  indicaram uma baixa diferenciação genética entre as infrapopulações amostradas ( $F_{st} = 0,003$ ). A hipótese da transmissão contínua de parasitos (Boeger *et al.* 2003, Bakke *et al.* 2007)

aceita um fluxo constante de parasitos entre hospedeiros, o que pode explicar a baixa diferenciação genética encontrada entre as infrapopulações de *G. anisopharynx*, sugerindo um intenso fluxo gênico entre as mesmas, tornando a população pouco heterogênea. A alta taxa de endocruzamento ( $F_{is} = 0,8$ ) é consistente com a hipótese nula, entretanto, nesse caso, se esperaria encontrar também um alto valor de  $F_{st}$ , demonstrando uma estruturação genética entre as infrapopulações.

A análise genealógica formou apenas um grupo de irmandade direta com dois indivíduos compartilhando ambos os pais, representando apenas 2% do total de parasitos amostrados. Grupos formando relações de parentesco de meia irmandade pelo compartilhamento de um dos pais foram formados com 82% (67) dos indivíduos amostrados. Isto indica um sistema poligâmico com intensa troca genética, e a cópula é o tipo de reprodução predominante. O alto número de pais inferidos (94) é resultado de poligamia, sendo possivelmente amplificado pela possibilidade de troca de hospedeiro.

Segundo Harris (1989), a cópula se torna mais prevalente à medida que ocorre o crescimento da infrapopulação. Entretanto, os resultados indicaram a ocorrência de cópula prevalente mesmo em infrapopulações de tamanho reduzido. Como este estudo foi realizado com dados amostrais coletados do ambiente de uma população estabelecida de *G. anisopharynx*, as infrapopulações amostradas poderiam receber, com a troca de hospedeiro, a qualquer momento, novos indivíduos. Se estes indivíduos tiverem seu sistema reprodutor masculino maduro, e aptos a realizar cópula, podem realizar um aumento na ocorrência da mesma. Como as conclusões de Harris (1989) foram baseadas em dados experimentais, esta possibilidade de incremento de reprodução sexuada pode não ter sido contemplada. Em espécies de *Gyrodactylus* a partenogênese parece ser predominante, e já foi verificado que a cópula pode ocorrer em intensidades diferentes de acordo com a espécie (Harris 1988, Harris 1993, Harris 1998). *Gyrodactylus salaris* realiza cópula mesmo com uma baixa densidade populacional de parasitos (Harris 1993), e *G. anisopharynx* parece se comportar da mesma forma. Num estudo experimental realizado com *Gyrodactylus gasterostei*, este parasito não realizou reprodução sexuada, levando o autor a considerar que condições ambientais poderiam ser o gatilho para ativar a cópula.

Os resultados da análise genealógica mostram que a partenogênese ocorre nestes parasitos, como afirmado por outros autores (Harris 1993, Cable e Harris 2002), mas como se tratam de dados obtidos de amostras coletadas no ambiente não é possível afirmar se esta partenogênese ocorreu no primeiro ou, somente a partir do segundo embrião. Cable e Harris 2002 sugerem o uso de marcadores moleculares a fim de elucidar a origem do primeiro embrião. O resultado da análise de reconstrução de caráter ancestral mostrou que a distribuição dos grupos de parasitos formados pela análise cluster sobre os hospedeiros amostrados é aleatória. Entretanto, o valor está bastante próximo ao limite inferior da distribuição ao acaso, o que pode sugerir que a associação hospedeiro-parasito não é totalmente determinada por eventos estocásticos (transmissão).

Na definição da distribuição dos grupos familiares por hospedeiros e dos hospedeiros utilizados por cada grupo, os resultados das tabelas de frequência geradas dão suporte às observações de Boeger *et al.* (2003); treze, de quatorze grupos de *G. anisopharynx* amostrados, estão distribuídos em mais de um hospedeiro. Com exceção do Grupo 14, todos os grupos com apenas dois indivíduos tiveram seu máximo de dispersão possível expresso, ocupando dois hospedeiros. Todas as infrapopulações analisadas foram compostas por indivíduos de diferentes grupos. A maior representatividade de grupos apresentando  $IM = 1$  (50%) e a baixa ocorrência de grupos com  $IM \geq 2$  (14%) indica não haver tendência de indivíduos de um mesmo grupo se agruparem em um mesmo hospedeiro.

Todos os índices de dispersão calculados confirmaram que os grupos de *G. anisopharynx* seguem um padrão de distribuição aleatório.

Por fim, os resultados apresentados indicam que cópula, em *G. anisopharynx*, é o modo de reprodução prevalente no ambiente, mesmo em densidades populacionais baixas. A alta ocorrência de cópula encontrada neste estudo não condiz com dados experimentais encontrados na literatura, entretanto, é levantada a questão se condições ambientais poderiam ser o gatilho para ocorrer a reprodução sexuada em espécies deste gênero. Para testar estas considerações, uma análise genealógica de uma população experimental de *G. anisopharynx* utilizando marcadores de ISSR pode verificar se a cópula seria reduzida nestas condições, confirmando a hipótese do gatilho

via fator ambiental. E neste mesmo experimento é possível identificar o primeiro embrião e, pela análise genealógica, verificar a sua origem, elucidando uma grande pergunta na biologia reprodutiva deste grupo.

Os resultados também sugerem uma condição intermediária entre as hipóteses nula e alternativa. Apesar de todas as análises de dispersão apresentarem resultados que indicam a distribuição aleatória, a significância estatística marginal do teste realizado com a otimização de hospedeiros sobre o cluster genético e dos valores da estatísticas ( $F_{is}$ ) sugerem que existe de fato um acúmulo de animais geneticamente próximos sobre hospedeiros específicos. Evidentemente, esse é o resultado esperado considerando o tipo de reprodução (viviparidade) de *G. anysopharynx*. Recém nascidos devem permanecer por algum tempo sobre o mesmo hospedeiro de seu verme progenitor antes de mudar de hospedeiro. Assim, encontrar, em um determinado momento, animais genealogicamente próximos em uma única infrapopulação é um evento determinístico e esperado. A transmissão para outros hospedeiros, todavia, é um evento estocástico, o que reduz a probabilidade de encontrar animais geneticamente próximos em um mesmo hospedeiro.

Fica evidente, portanto, que a troca contínua de hospedeiros (transmissão contínua) é um processo comum em *G. anisopharynx* e, provavelmente, em todas as espécies do clado de girodactídeos vivíparos. Esse processo contínuo influencia diretamente a composição e a distribuição genética da população e de infrapopulações. O padrão de transmissão entre hospedeiros detectado nesse estudo é consistente com os pressupostos que fundamentam a hipótese de diversificação de girodactídeos vivíparos de Boeger *et al.* (2003). Conforme esses autores e Boeger *et al.* (2005), a transmissão contínua, combinada com a hiperviviparidade, representam inovações chave que favorecem a diversificação das espécies vivíparas da família aumentando a probabilidade de contato e maximizando o sucesso de colonização de novos hospedeiros em processos de troca de hospedeiros (“Host switch”).

Até o momento, as evidências que sugerem a troca de hospedeiro em *Gyrodactilus* eram apenas circunstanciais e, com este estudo, fica explícito que é um processo comum em *G. anisopharynx*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, E. C. 2008. Bayesian inference of species hybrids using multilocus dominant genetic markers. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 2841–2850.

ASHWORTH, V. E. T. M. e CLEGG, M. T. 2003. Microsatellite Markers in Avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical Relationships Among Cultivated Avocado Genotypes. *Journal of Heredity.* 94(5):407–415.

BAKKE, T. A., JANSEN, P. A. e HANSEN, L. P. 1991. Experimental transmission of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) from the Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the european eel (*Anguilla anguilla*). *Canadian Journal of Zoology*, 69: 733-737.

BAKKE, T. A., JANSEN, P. A. e HANSEN, L. P. 1992. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 63-74.

BAKKE, T.A., HARRIS, P.D., CABLE, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.*, 32: 281–308.

BAKKE, T.A., CABLE, J., HARRIS, P.D., 2007. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian doll-killers”. *Adv. Parasitol.*, 64: 161-376.

BALLOUX, F. e LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology.* 11, 155-165.

BARBOUR, M. G., BURK, J. H., PITTS, W. D., GILLIAM, F. S. e SCHWARTZ, M. W. 1999. *Terrestrial plant ecology*, 3<sup>a</sup> Edição. Benjamin-Cummings Publishing Company. 649 p.

BOEGER, W. A., KRITSKY, D. C. e BELMONT-JÉGU, E. 1994. Neotropical Monogenoidea. 20. Two New Species of oviparous Gyrodactylidea (Polyonchoinea) from Loricariid Catfishes (Siluriformes) in Brazil and the Phylogenetic Status of Ooegyrodactylidae Harris, 1983. Journal of Helminthology Society Washington 61:34-44.

BOEGER, W. A., KRITSKY, D. C. E PIE, M. R. 2003. Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). Zoologica Scripta, 32: 437-448.

BOEGER, W. A., KRITSKY, D. C. E PIE, M. R e ENGERS, K.B. 2005. Mode of Transmission, Host Switching, and Escape from the Red Queen by Viviparous Gyrodactylids (Monogenoidea). The Journal of Parasitology, 91(5): 1000-1007.

BOEGER, W. A., VIANNA, R. T. E THATCHER, V. E. 2006. Monogenoidea. Capítulo 3. In: Aquatic Biodiversity in Latin America. Vol. 1. Amazon fish parasites (Second edition), Vernon E. Thatcher. Eds. Joachim Adis, Jorge R. Arias, Guillermo Rueda-Delgado e Karl Matthias Wantzen. Pensoft Series Faunisticas. Sofia-Moscow. p. 42-116.

BUENO-SILVA, M. E BOEGER, W.A., 2009. Neotropical Monogenoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. Folia Parasitol. 56, 13–20.

BUENO-SILVA, M., BOEGER, W. A. e PIE, M. R. 2011. Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). Int. J. Parasitol. 41: 657–667.

BYCHOWSKY, B. E. 1957. Monogenetic Trematodes, their Systematics and Phylogeny. Academy of Sciences, Moscow, Leningrad, USSR (in Russian; English translation by Hargis, W.J., Oustinoff, P.C., 1961. American Institute of Biological Sciences, Washington.

CABLE, J. e HARRIS, P. D. 2002. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *International Journal for Parasitology*, 32, 255–280.

CLEMENTINO, C.S., BARBOSA, F.J.V., CARVALHO, A.M.F., COSTA-FILHO, R.A.R., SILVA, G.R., CAMPELO, E.G., BRITTO, F.B. e DINIZ, F.M. 2010. Microsatellite DNA Loci for Population Studies in Brazilian Chicken Ecotypes. *International Journal of Poultry Science* 9 (12): 1100-1106.

CREGAN, P. B., AKKAYA, M. S., BHAGWAT, A. A., LAVI, U. e RONGWEN, J. 1994. Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In: Gresshoff, P.M. (ed.), *Plant Genome Analysis*, pp: 47–56. CRC Press, Boca Raton, Florida.

DELMOTTE F., CHEN, W. J., RICHARD-CERVERA, S., GREIF, C., PAPURA, D., GIRESSE, X., MONDOR-GENSON, G. e CORIO-COSTET, M. F. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes*. 6, 379–381.

DINOLFO, M. I., STENGLEIN, S. A., MORENO, M. V., NICHOLSON, P., JENNINGS, P. E SALERNO, G. L. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *Eur J Plant Pathol* 127:483–491.

ELLIOTT, J. M. 1979. Some methods for the statistical analysis of sample benthic invertebrates. 2<sup>a</sup> Edição. Ambleside: Freshwater Biological Association, 157 p.

EUZET L., COMBES C. 1998. The selection of habitats among the Monogenea. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1645-1652.

GARCIA-VÁSQUEZ, A., HANSEN, H., SHINN, A.P. 2007. A revised description of *Gyrodactylus cichlidarum* Paperna, 1968 (Gyrodactylidae) from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus niloticus* (Cichlidae), and its synonymy with *G. niloticus* Cone, Arthur et Bondad-Reantaso, 1995. *Folia Parasitologica*, 54: 129–140.

GERASEV, P. I. 1990. Principles for Revision of the Genus *Dactylogyrus* (Monogenea). *Journal of Ichthyology*, Madison, 30(5) 110-119.

GODWIN, D. I., AITKEN, E. A. B. E SMITH, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18. 1524-1528.

GREEN, R.H. 1966. Measurement of non: randomness in spatial distributions. *Researches on Population Ecology*. Kyoto. 8(1)-1-7.

GUPTA, S., SRIVASTAVA, M., MISHRA, G. P., NAIK, P. K., CHAUHAN, R. S., TIWARI, S. K., KUMAR, M. e SINGH, R. 2008. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (23), 4230-4243.

HAIG, S. M., MACE, T. R. e MULLINS, T. D. 2003. Parentage and relatedness in polyandrous comb crested jacanas using ISSRs. *J. Hered.* 94:302–309.

HAMMER, O., HARPER, D. A. T. e RYAN, P. D. 2001. PAST - PAleontological STatistics. Versão 2.09 [folk.uio.no/ohammer/past/].

HARDY, O. J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 12, 1577–1588.

HARRIS, P. D. 1989. Interactions between population growth and sexual reproduction in the viviparous monogenean *Gyrodactylus turnbulli* Harris, 1986 from the guppy *Poecilia reticulata* Peters. *Parasitology*, 98, 245–251.

HARRIS, P. D. 1993. Interactions between reproduction and population biology in gyrodactylid monogeneans – a review. *Bull. Fr. Pe* 328, 47–65.

HARRIS, P. D. 1998. Ecological and genetic evidence for clonal reproduction in *Gyrodactylus gasterostei* Glaser (1974). *Int. J. Parasitol.* 28, 1595– 607.

HARRIS, P. D., SHINN, A. P., CABLE, J. e BAKKE, T. A. 2004. Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. *Systematic Parasitology*, 59: 1-27.

HOBERG, E. P. e BROOKS, D. R. 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographical colonization and diversification in complex host–parasite systems. *J. Biogeogr.* 35, 1533–1550.

HOKANSON, S. C., SZEWC-MCFADDEN, A. K., LAMBOY, W.F. e MCFERSON, J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 671–83.

HOLSINGER, K. E. e LEWIS, P. O. 2003. HICKORY v. 1.0. Department of Ecology & Evolutionary Biology, The University of Connecticut. (Disponível em: [www/eeb.uconn.edu/](http://www/eeb.uconn.edu/)).

HOU, Y. C., YAN, Z. H., WEI, Y. M. e ZHENG, Y. L. 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter* 35:9-22.

HUMASON G. L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 661 p.

HUSSEIN, T. S., TAWFIK, A. A. e M.A. KHALIFA, 2008. Molecular identification and genetic relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. *Int. J. Agri. Biol.*, 10: 677–80.

HUYSE, T., e VOLCKAERT, F. A. M. 2002. Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with the description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 32:907–919.

JARRET, R.L. e BOWEN, N. 1994. Simple sequence repeats (SSRs) for sweet potato germplasm characterization. *Plant Gen. Newslett.*, 100: 9–11.

JONES, O. R. e WANG, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10: 551–555.

KINGHORN, B.P. 1994. Pedigree Viewer - a graphical utility for browsing pedigreed data sets. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, 7 - 12 August 1994. 22: 85-86.

KRITSKY, D. C., BOEGER, W.A. e POPAZOGLO, F. 1995. Neotropical Monogenoidea. 22. Variation in *Scleroductus* species (Gyrodactylidae, Gyrodactylidae) from siluriforme fishes of southeastern Brazil. *The Journal of Helminthological Society of Washington*, 62: 53-56.

KRITSKY, D. C. e STOCKWELL, C. A. 2005. New species of *Gyrodactylus* (Monogenoidea, Gyrodactylidae) from the white sands pupfish, *Cyprinodon tularosa*, in New Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 50: 312-317.

KRITSKY D. C., VIANNA R. T., BOEGER W. A. 2007. Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with proposal of *Phanerothecioides* n. gen., *Onychogyrodactylus* n. gen. and *Aglaiogyrodactylus* n. gen. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae). *Syst. Parasit.*, 66: 1-34.

KUBITZA, F. e KUBITZA, L M. M. 1999. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 3.ed. Jundiaí: 96p.

LANHAM, P.G. E BRENNAN, R.M. 1998. Characterization of genetic resources of redcurrant (*Ribes rubrum* Ribesia) using anchored microsatellite markers. Theor. Appl. Genet., 96: 917–21.

LEVITAN, D. R. e GROSBURG, R. K. 1993. The analysis of paternity and maternity in the marine hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Molecular Ecology, 2, 315-326.

LIN, S. F., TSAY, H. S., CHOU, T. W., YANG, M. J. e CHEN, K. T. 2007. Genetic variation of *Anoectochilus formosanus* revealed by ISSR and AFLP analysis. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 15, No. 2, 156-162.

LIN, X. C., LOU, Y. F., LIU, J., PENG, J. S., LIAO, G. L., E FANG, W. 2010. Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. Genetics and Molecular Research 9 (3): 1398-1404.

MACHKOUR-M'RABET, S., HÉNAUT, Y., DOR, A., PÉREZ-LACHAUD, G., PÉLISSIER, C., GERS, C. E LEGAL, L. 2009. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). The Journal of Arachnology 37:10–14.

MADDISON W. P. 1995: Calculating the probability distributions of ancestral states reconstructed by parsimony on phylogenetic trees. Syst. Biol. 44: 474-481.

MADDISON W. P. e MADDISON D. R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Versão 2.74 [<http://mesquiteproject.org>].

MANICA-CATTANI, M. F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L. E ECHEVERRIGARAY, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. Braz. J. Biol., 69(2): 375-380.

McVICAR A. H. 1997. Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. *J. Mar. Sci.*, 54: 1093-1103.

MEINILÄ, M., KUUSELA, J., ZIETARA, M S. e LUMME, J. 2004. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch insalmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae) *International Journal for Parasitology*, 34: 515–526.

MILLER, L. M. 2000. Classifying Genealogical Origins in Hybrid Populations Using Dominant Markers. *The Journal of Heredity*. 91(1): 46-49.

MUELLER U. G e WOLFENBARGER, L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 389–394.

NIJSSEN, H. 1970. Revision of the Surinam catfishes of the genus *Corydoras* Lacépede, 1803 (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Beaufortia*, 18: 1-75.

OKUN, D. O., KENYA, E. U., OBALLA, P. O., ODEE, D. W. e MULUVI, G. M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (13), 2119-2123.

OLIVEIRA, C., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., MORI, L. e TOLEDO-FILHO, S.A. 1993. Cytogenetic and DNA content studies of armoured catfish of the genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) from the southeast coast of Brazil. *Revista Brasileira de Genética*, 16: 617-629.

PERTEGUER, M. J., RODRÍGUEZ E., GARCIA-SÁNCHEZ, R. N., NOGAL-RUIZ, J. J., BOLAS-FERNÁNDEZ, F., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R. E GÁRATE, T. 2009. Identification of Spanish *Trichinella* isolates by ISSR-PCR: Intra-specific variability of *Trichinella britovi*. *Veterinary Parasitology* 159:206–209.

PIE, M.R., ENGERS, K.B. e BOEGER, W.A. 2006: Density-dependent topographical specialisation in *Gyrodactylus anisopharynx* (Monogenoidea, Gyrodactylidae): boosting transmission or evading competition? J. Parasitol. 92: 459–463.

POPAZOGLO, F. e BOEGER, W.A. 2000. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of southern Brazil. Folia Parasitol. 47: 105–110.

REDDY, M. P., SARLA, N. e SIDDIQ, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9–17.

ROHDE, K. 1979. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. The American Naturalist, 114: 648-671.

RUAS, P. M., RUAS, C. F., RAMPIM, L., CARVALHO, V. P., RUAS, E. A. e SERA, T. 2003. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (intersimple sequence repeat) markers. Genet Mol Biol 26:319–327.

SCHUSTER, I., VIEIRA, E. S. N., SILVA, G. J., FRANCO, A. F. e MARCHIORO, V. S. 2009. Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers Genetics and Molecular Biology. 32(3):557-563.

SOUZA, G. A., CARVALHO, M. R. O. GUEDES, R. N. C., MARTINS, E. R. E DE OLIVEIRA, L. O. 2008. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.7, p.843-849.

STERUD, E., MO, T. A., COLLINS, C. M. e CUNNINGHAM, C. O. 2002. The use of host specificity, pathogenicity, and molecular markers to differentiate between *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 and *G. thymalli* Žit'nan , 1960 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Parasitology*, **124**, 203–213.

STOLPOVSKIIA, Y. A., LAZEBNYB, O. E., STOLPOVSKIIC, K. Y., E SULIMOVA, G. E. 2010. The Use of the ISSR-PCR Method for Identifying Domesticated Animal Breeds and Species, Inferring Their Population Structures, and Assessing Gene Pool Similarity. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 46, No. 6, 732–739.

TOLEDO, F. R., BARBOSA, J. C. e YAMAMOTO, P. T. 2006. Distribuição espacial de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) na cultura de citros. *Ver. Bras. Frutic.* 28: 194-198.

TURGUT E., SHINN A. P., WOOTTEN R., YEOMANS W. E. 1999. *Gyrodactylus sommervillae* n. sp. (Monogenea) from *Abramis brama* (L.) and *Rutilus rutilus* (L.) (Cyprinidae) in Oxfordshire, UK. *Syst. Parasitol.*, 43: 59-63.

VELU, D., PONNUVEL, K. M., MUTHULAKSHMI, M., SINHA, R. K. E QADRI, S. M.H. 2008. Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains of *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Genet. Genomics* 35:291–297.

VIANNA, R. T. 2007. Filogenia e biogeografia histórica dos Gyrodactylidae (Monogenoidea): morfologia, moléculas e evidência total. Dissertação de Doutorado em Ciências área de concentração Zoologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr. 271p.

VOUILLAMOZ, J. F. e GRANDO, M. S. 2006. Genealogy of wine grape cultivars: 'Pinot' is related to 'Syrah'. *Heredity*. 97, 102–110.

WEIR, B. S. e COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

WOLFE, A. D., XIANG, Q. Y. e KEPHART, S. R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.*, v. 7, p. 1107-1125.

ZANE, L., BARGELLONI, L. e PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol. Ecol.*, 11: 1-16.

ZIETARA, M. S. e LUMME, J. 2002. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution*, 56(12), 2445–2458.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. e LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.