

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA CRISTINA SANTOS FERREIRA

TRANSMISSÃO POR LARVAS EM PARASITOS MONOGENOIDEA  
FAVORECE A ESPECIALIZAÇÃO POR LINHAGENS DE HOSPEDEIROS?  
O CONTEXTO DO COMPARTILHAMENTO DE UM DACTYLOGYRIDAE  
(MONOGENOIDEA, PLATYHELMINTHES) EM DUAS ESPÉCIES  
SINTÓPICAS DE *Characidium* (CHARACIFORMES).

CURITIBA  
2012

RENATA CRISTINA SANTOS FERREIRA

TRANSMISSÃO POR LARVAS EM PARASITOS MONOGENOIDEA  
FAVORECE A ESPECIALIZAÇÃO POR LINHAGENS DE HOSPEDEIROS?  
O CONTEXTO DO COMPARTILHAMENTO DE UM DACTYLOGYRIDAE  
(MONOGENOIDEA, PLATYHELMINTHES) EM DUAS ESPÉCIES  
SINTÓPICAS DE *Characidium* (CHARACIFORMES).

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Walter A. P. Boeger, Ph.D.

CURITIBA  
2012

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Ferreira, Renata Cristina Santos

Transmissão por larvas em parasitos Monogenoidea favorece a especialização por linhagens de hospedeiros? O contexto do compartilhamento de um Dactylogyridae (Monogenoidea), Platyhelminthes) em duas espécies sintópicas de *Characidium* (Characiformes). / Renata Cristina Santos Ferreira. – Curitiba, 2012.

64 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Walter Antonio Pereira Boeger

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

1. Platielmintos 2. Peixe de água doce 3. Peixe marinho 4. Relação hospedeiro-parasito I. Título II. Boeger, Walter Antonio Pereira III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

CDD (20. ed.) 595.1



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“Transmissão por larvas em parasitos Monogenoidea favorece a especialização por linhagens de hospedeiros? O contexto do compartilhamento de um Dactylogyridae (Monogenoidea, Platyhelminthes) em duas espécies sintópicas de *Characidium* (Characiformes)”**

por

**RENATA CRISTINA SANTOS FERREIRA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger (presidente)

Prof. Dr. Edilene Alcântara de Castro

Dr. Marlus Bueno Silva

**Curitiba, 04 de junho de 2012.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Professor Walter A. P. Boeger pela oportunidade e por todos os seus ensinamentos, incentivos, confiança, paciência e principalmente por me mostrar que sempre (sempre MESMO) há uma saída.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva - LEMPE. Com certeza cada um me ensinou uma coisa diferente, seja sobre análises de dados ou sobre a vida. Todos, sem exceção, contribuíram muito para o meu crescimento científico e pessoal. Sou grata à equipe do Projeto Comunidades pela ajuda nas coletas e processamento do material e a todos no laboratório pelas boas conversas, incentivo e apoio em todos os momentos em que precisei.

Agradecimentos especiais à Mariana, Micheli e Marlus. Amizades especiais que fiz no laboratório e que com certeza levarei para a minha vida.

Ao Professor Rogério Tubino Vianna por ter me apresentado o mundo dos Monogenoidea lá em 2006.

Ao Dr. Vinícius Abilhoa pelo auxílio na identificação dos peixes deste estudo.

Agradecimentos especiais à minha mãe, Maria Cristina, por todo amor e dedicação a mim e meu irmão. Devo tudo o que sou hoje a ela e me faltam palavras para dizer o quanto a amo e sou grata por tê-la em minha vida sempre me apoiando e puxando a minha orelha quando necessário. Obrigada por tudo, mãe! Nada disso seria possível sem você.

Agradeço também à minha tia Cleonice por estar sempre presente na minha vida e por sempre acreditar em mim.

Agradeço a minha prima e amiga Lisandra pelas ótimas conversas em que sempre nos identificamos. As fugidinhas até o departamento de Genética foram fundamentais nesses últimos dois anos.

Ao amor da minha vida, Gabriel. Poucas são as palavras para agradecer todo o amor e carinho nesses quase quatro anos juntos. Agradeço pela paciência e pelas palavras de incentivo nos dias em que achei que nada daria certo. Agradeço pelos passeios de moto, pelas piadinhas que me fazem rir e alegram o meu dia. Agradeço também pelo companheirismo e amizade que faz de nós um casal sem igual e sou eternamente grata pelo dia em que entramos um na vida do outro. Te amo muito!

Aos amigos biólogos Simone, Daniele, Gabriel e Bruno pela amizade sincera, pelos almoços divertidos de quinta-feira e pelas jantas raras, mas sempre inesquecíveis.

Aos amigos de tempos de Colégio Bom Jesus, Wanessa, Roberta e Diego por todos esses anos de amizade.

À minha amiga e irmã de estante Gaby que admiro tanto. Muito obrigada pela amizade e ótimas conversas comendo sushi.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR em especial aos professores e à secretária pelo apoio e dedicação.

*“In the middle of difficulty lies opportunity.”*

Albert Einstein

## RESUMO

O entendimento de processos envolvidos na especiação e diversificação de parasitos tem sido um dos principais assuntos dentro da biologia evolutiva. Os Monogenoidea, um grupo de ectoparasitos de peixes marinhos e de água doce, parecem ser um modelo apropriado para estudar os processos da diversificação de parasitos, principalmente por sua alta riqueza de espécies e diversidade morfológica e ecológica. Gyrodactylidae é uma família de Monogenoidea com ciclo de vida monoxênico, transmissão contínua e uma alta diversidade de espécies, principalmente *Gyrodactylus*. Estudos com espécies desse gênero têm permitido uma melhor compreensão sobre como o comportamento da dinâmica de transmissão do grupo influencia processos de especiação adaptativa e acredita-se que essa capacidade está associada a características da biologia dessas espécies, tais como: a perda da gota adesiva do ovo, a hiperviviparidade e a transmissão contínua. Estudos têm testado hipóteses, com auxílio de marcadores moleculares de DNA mitocondrial, sobre eventos de radiação adaptativa por troca de hospedeiro e especiação em *Gyrodactylus*. Os marcadores dominantes ISSR (“Inter-Simple Sequence Repeats”) representam uma das ferramentas promissoras em estudos de genética de populações. O genoma de cada organismo é determinado pelo padrão de bandas observado através de eletroforese em gel de agarose. Pouco se conhece sobre processos de especiação adaptativa em Dactylogyridae, uma família de Monogenoidea que ocorre principalmente em brânquias de peixes marinhos e de água doce e com transmissão limitada a fase larval livre natante. Este estudo testou as hipóteses: (i) a transmissão limitada à fase larval não favorece o processo de adaptação divergente de Dactylogyridae; (ii) a transmissão limitada à fase larval promove o processo de adaptação divergente de Dactylogyridae. Para isso, marcadores de mtDNA (COI) e marcadores ISSR foram utilizados para testar as hipóteses acima usando como modelo uma espécie de parasito de brânquia que compartilha dois hospedeiros sintópicos, *Characidium pterostictum* e *Characidium lanei*, coletados no Rio Marumbi em Morretes, Paraná, Brasil. Os dados ecológicos e moleculares sugerem que a espécie de parasito, alvo deste estudo, mostra maior afinidade pela espécie hospedeira *C. pterostictum* e que a presença do Gênero novo sp.n. sobre *C. lanei* é provavelmente fortuita. A análise dos dados moleculares mostram que Gênero novo sp.n. não apresenta nenhuma evidência de possuir linhagens genéticas especializadas para cada uma das espécies hospedeiras como foi observado em Gyrodactylidae. As análises de coespeciação, rede de haplótipos, sinal filogenético e reconstrução de caráter ancestral de dados de ISSR mostram que não existem evidências de especialização de haplótipos de parasitos por haplótipos de peixes. Assim, padrões na estruturação de parasitos Gyrodactylidae e Dactylogyridae, e os processos que levaram a esse fim, diferem de forma significativa. A transmissão contínua parece representar uma inovação chave dos girodactilídeos vivíparos e é suportada pelos dados deste estudo. A maior especificidade do Gênero novo. sp.n. por *C. pterostictum* pode ser consequência de um vínculo histórico maior desse parasito por esse hospedeiro. Enquanto que a baixa especificidade por *C. lanei* pode ser devido à origem do parasito em *C. pterostictum* por eventos de coespeciação ou de

especiação seguida por troca de hospedeiro. As flutuações demográficas dos parasitos e hospedeiros estão associadas com períodos glaciais e interglaciais entre o final do Pleistoceno e parte do Holoceno (entre 5,000–250,000 anos atrás), também observadas em espécies de *Gyrodactylus* e hospedeiros *Scleromystax* coletados em bacias do litoral paranaense. Esse padrão é diferente daquele observado para espécies de *Gyrodactylus* coletadas em rios do primeiro planalto, as quais não apresentam gargalos populacionais na sua história. Essa diferença evidencia a influência da história geológica sobre a diversificação genética e adaptação parasito-hospedeiro nessas bacias.

Palavras-chave: Dactylogyridae. Especiação sintópica. Adaptação. COI. ISSR.

## ABSTRACT

The understanding of processes involved in the speciation and diversification of parasites is one of the main issues of studies in evolutionary biology. The Monogenoidea is a group of ectoparasites of marine and freshwater fish that seems to be an appropriate model to study parasite diversification processes, especially due its high species richness, morphological, and ecological diversity. Gyrodactylidae is a family of Monogenoidea with monoxenic life cycle, transmission accomplished by preadults/adults, and a high species diversity, mainly within *Gyrodactylus*. Studies on this genus allowed a better understanding about how transmission dynamics have influences on the group and its speciation processes. It is believed that this capacity is linked to the diversification of this family, such as the loss of adhesive egg, the hyperviviparity and preadult/adult transmission. Studies tested hypotheses about events of adaptive radiation by host switch and speciation in *Gyrodactylus* using molecular markers such as mitochondrial DNA. Inter-Simple Sequence Repeats markers represent one of the most promising tools for population genetics studies. They are dominant markers and each organism is genotyped by the pattern of bands observed in the agarose gel electrophoresis. On the other hand, little is known about the processes of adaptive speciation in Dactylogyridae, a family of Monogenoidea that occurs mainly in the gills of marine and freshwater fish. Species of this family transmit between hosts by the free swimming larval stage, in a single event in its life time. This study tested the following hypothesis: (i) the transmission limited to larval stage do not promote divergent lineages related to each host species (ii) the transmission limited to the larval stage promotes divergent lineages related to each host species. To test the existence of specific lineages, mtDNA (COI) and ISSR markers were used to test above hypotheses using a parasite species found on the gills of two syntopic hosts species, *Characidium pterostictum* and *Characidium lanei* from the Marumbi river, located in Morretes, Paraná, Brazil. The ecological and molecular data suggest that the parasite species studied here shows a higher affinity for the host species *C. pterostictum* and the presence of the Gen. nov. sp.n. on *C. lanei* is probably fortuitous. The molecular analysis of the data reveals that the Gen. nov. sp.n. shows no evidence of genetic specialized lineages for each host species, as observed in Gyrodactylidae. Analyses of cospeciation, haplotype network, phylogenetic signal, and reconstruction of ancestral character based on ISSR data show that there is no evidence of specialization of haplotypes of parasites per fish haplotype. Thus, both population structure and the leading processes differ significantly among Gyrodactylidae and Dactylogyridae. The preadult/adult transmission seems to represent a key innovation of viviparous Gyrodactylidae and is supported by this study. The higher affinity of the Gen. nov. sp.n. for *C. pterostictum* could be the result of a greater affinity associated to cospeciation events or speciation followed by host switch (coadaptation). Demographic fluctuations of parasites and hosts are associated with glacial and interglacial periods between the end of the Pleistocene and Holocene (from 5.000 to 250.000 years ago) what were also observed in *Gyrodactylus* species and their hosts *Scleromystax* spp. Collected

from basins of the Paraná coast. This pattern is different from that observed for *Gyrodactylus* species collected in the first plateau rivers that do not present population bottlenecks in their history. Such difference shows how geological history could influence genetic diversification and adaptation in host-parasite in these basins.

Key-words: Dactylogyridae. Syntopic speciation. Adaptation. COI. ISSR.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DESENHO DA ESPÉCIE TIPO DO GÊNERO NOVO SP.N. ENCONTRADO NAS BRÂNQUIAS DE <i>Characidium pterostictum</i> E <i>Characidium lanei</i> .....	28
FIGURA 2 -	CLADOGRAMA ENRAIZADO DA ANÁLISE BAYESIANA BASEADA NO GENE CYTB MOSTRANDO O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DOS HOSPEDEIROS COLETADOS PARA ESTE ESTUDO.....	29
FIGURA 3 -	CLADOGRAMA ENRAIZADO DA ANÁLISE BAYESIANA BASEADA NO GENE CYT B, MOSTRANDO O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DAS ESPÉCIES DE <i>CHARACIDIUM</i> DESTE ESTUDO EM COMPARAÇÃO COM OS ESPÉCIMES DISPONÍVEIS NO GENBANK.....	30
FIGURA 4 -	RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO ENTRE OS HAPLÓTIPOS DE HOSPEDEIROS <i>Characidium</i> .....	32
FIGURA 5 -	CLADOGRAMA ENRAIZADO DA ANÁLISE BAYESIANA BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE COI, MOSTRANDO O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DOS PARASITOS COLETADOS PARA ESTE ESTUDO.....	33
FIGURA 6 -	PERFIL DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO O INICIADOR ISSR7.....	35
FIGURA 7 -	PERFIL DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO O INICIADOR 17899.....	36
FIGURA 8 -	RECONSTRUÇÃO DO CARÁTER ANCESTRAL (HAPLÓTIPOS DE HOSPEDEIROS) SOBRE O CLADOGRAMA DE CLUSTER NÃO ENRAIZADO USANDO O CRITÉRIO DE PARCIMÔNIA.....	39
FIGURA 9 -	AVALIAÇÃO DA RECONSTRUÇÃO DO CARÁTER ANCESTRAL POR PARCIMÔNIA BASEADO NA ANÁLISE DE CLUSTER.....	40
FIGURA 10 -	PADRÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS HOSPEDEIROS (À ESQUERDA) E PARASITOS (À DIREITA) UTILIZANDO FILOGENIAS BASEADAS EM INFERÊNCIA BAYESIANA DAS SEQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DOS HOSPEDEIROS E DAS SEQUÊNCIAS DOS PARASITOS.....	41

FIGURA 11 - HISTOGRAMA GERADO PELO PROGRAMA TREEMAP PARA A ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DOS HOSPEDEIROS E DAS SEQUÊNCIAS DOS PARASITOS.....	41
FIGURA 12 - PADRÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS HOSPEDEIROS E PARASITOS UTILIZANDO UMA FILOGENIA BASEADA EM INFERÊNCIA BAYESIANA DAS SEQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DOS HOSPEDEIROS E DENDROGRAMA BASEADO EM DADOS DE ISSR DOS INDIVÍDUOS PARASITOS.....	42
FIGURA 13 - HISTOGRAMA GERADO PELO PROGRAMA TREEMAP DOS HAPLÓTIPOS DOS HOSPEDEIROS E DENDROGRAMA BASEADO EM DADOS DE ISSR DOS INDIVÍDUOS PARASITOS.....	43
FIGURA 14 - REDE DE HAPLÓTIPOS MAIS PARCIMONIOSA PARA O GENE COI DOS PARASITOS.....	44
FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE PARASITOS NA REDE DE HAPLÓTIPOS DE HOSPEDEIROS BASEADA NO GENE MITOCONDRIAL CYT B.....	45
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS HOSPEDEIROS SOBRE A TOPOLOGIA DA FILOGENIA BASEADA EM COI DOS PARASITOS.....	46
FIGURA 17 - REGRESSÃO LINEAR DO CONTRASTE DO TAMANHO AMOSTRAL CONTRA A DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA.....	46
FIGURA 18 - CLADOGRAMA ENRAIZADO DA ANÁLISE BAYESIANA BASEADA NO GENE CYTB, MOSTRANDO O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DE POPULAÇÕES DE <i>Characidium</i> .....	47
FIGURA 19 - DEMOGRAFIA HISTÓRICA DAS POPULAÇÕES DE <i>Characidium</i> .....	48
FIGURA 20 - CLADOGRAMA ENRAIZADO DA ANÁLISE BAYESIANA BASEADA NO GENE COI.....	49
FIGURA 21 - DEMOGRAFIA HISTÓRICA DA SUPRAPOPULAÇÃO DOS PARASITOS.....	50
FIGURA 22 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE TRANSMISSÃO DOS MONOGENOIDEA.....	54
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VARIAÇÃO DO NÍVEL DO MAR NA COSTA PARANAENSE NOS ÚLTIMOS 120,000 ANOS.....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NO TESTE DE EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA DOS PARASITOS.....	21
TABELA 2 - DADOS DE ABUNDÂNCIA, PREVALÊNCIA E INTENSIDADE MÉDIA DO GÊNERO NOVO SP.N.. .....	27
TABELA 3 - HAPLÓTIPOS DOS HOSPEDEIROS A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DE CYT B.....	31
TABELA 4 - HAPLÓTIPOS DOS PARASITOS A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE COI.....	34
TABELA 5 - MATRIZ BINÁRIA DE PRESENÇA (1) E AUSÊNCIA (0) GERADA ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS GÊIS DE ISSR 7 E 17899.....	37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	19
2.2 PROCEDIMENTOS MOLECULARES.....	19
2.2.1 Hospedeiros.....	19
2.2.2 Parasitos.....	20
2.3 ABUNDÂNCIA, PREVALÊNCIA E INTENSIDADE MÉDIA.....	22
2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	22
2.5 ANÁLISE DE COESPECIAÇÃO.....	24
2.6 REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DE SINAL FILOGENÉTICO.....	24
2.7 RECONSTRUÇÃO DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA.....	25
<b>3 RESULTADOS</b> .....	27
3.1 PROCESSAMENTO MORFOLÓGICO DOS PARASITOS.....	27
3.2 PROCEDIMENTOS MOLECULARES.....	29
3.2.1 Hospedeiros.....	29
3.2.2 Parasitos.....	32
3.2.2.1 Citocromo Oxidase I (COI).....	32
3.2.2.2 Inter-simple Sequence Repeats (ISSR).....	34
3.3 ANÁLISE DE COESPECIAÇÃO.....	40
3.3.1 Haplótipos de hospedeiros x COI parasitos.....	40
3.3.2 Haplótipos de hospedeiros x ISSR parasitos.....	42
3.4 REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DE SINAL FILOGENÉTICO.....	44
3.5 RECONSTRUÇÃO DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA.....	47
3.5.1 Hospedeiros.....	47
3.5.2 Parasitos.....	49
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A procura por padrões para compreender os processos de especiação e diversificação dos parasitos tem sido um dos principais assuntos dentro da biologia evolutiva (BROOKS E MCLENNAN, 1993). Estudos recentes trazem a genética de populações de parasitos como abordagem para inferir aspectos da história, transmissão e coevolução dessas populações (e.g. ARCHIE E EZENWA, 2011; BUENO-SILVA *et al.*, 2011; CRISCIONE, 2008; CRISCIONE *et al.*, 2010). Estudos sobre a estruturação genética e dinâmica das populações podem ser úteis para entender tanto os processos evolutivos bem como ecológicos de parasitos (NADLER, 1995; CRISCIONE *et al.*, 2005; BARRETT *et al.*, 2008; ARCHIE *et al.*, 2009).

Os Monogenoidea, um grupo de ectoparasitos de peixes marinhos e de água doce, vivem predominantemente nas brânquias e superfície corporal de seus hospedeiros. Espécies desse grupo parecem ser um modelo apropriado para estudar os processos da diversificação de parasitos, principalmente por sua alta riqueza de espécies e diversidades morfológica e ecológica (POULIN, 2002). Brooks e McLennan (1993) discutem que a maioria dos membros dessa classe, por possuírem ciclo de vida direto e capacidade de colonizar hospedeiros a partir de um único indivíduo, são o grupo de parasitos que exibem maior proporção de espécies hospedeiro-específicas e que muitas dessas espécies evoluíram, não como resultado de coespeciação, mas como resultado da troca de hospedeiros.

Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863 é uma família de Monogenoidea com uma alta diversidade de espécies. Possuem ciclo de vida monoxênico e, ao contrário da maioria das espécies de Monogenoidea que possuem larva ciliada livre natante (oncomiracídio) em seus ciclos de vida, a transmissão se dá através do estágio pré-adulto/adulto (contínua) (BOEGER *et al.*, 2003). Atualmente, essa família é representada por espécies ovíparas e vivíparas. O clado vivíparo conta com pouco mais de 400 espécies (BAKKE *et al.*, 2007), sendo a maioria pertencente a *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832.

Recentemente, estudos com espécies de *Gyrodactylus* têm permitido uma melhor compreensão sobre como o comportamento da dinâmica de transmissão do grupo influencia processos de especiação adaptativa

(BOEGER *et al.*, 2003, 2005; BUENO-SILVA *et al.*, 2011). Espécies de *Gyrodactylus* são encontradas em todo o mundo e podem representar pragas de peixes tanto no ambiente natural quanto em cativeiro (RICHARDS E CHUBB, 1996; SOLENG *et al.*, 1999; LÓPEZ, 1999; POPAZOGLO E BOEGER, 2000; STOLZE E BUCHMANN, 2001; ZIĘTARA E LUMME, 2002; MEINILÄ *et al.*, 2004). A maioria das espécies de *Gyrodactylus* ocorre apenas em uma espécie de hospedeiro, porém algumas têm a capacidade de parasitar e realizar troca entre hospedeiros simpátricos, mesmo durante a fase adulta (BAKKE *et al.*, 2002, 2007). De acordo com Boeger *et al.* (2003), os Gyrodactylidae vivíparos apresentam alta taxa de diversificação devido à sua capacidade de realizar trocas de hospedeiro de maneira contínua ao longo da vida adulta. A alta diversificação parece, ainda, associada a outras características da biologia dessas espécies, tais como a hiperviviparidade e a capacidade de reproduzir por partenogênese.

Alguns autores têm testado hipóteses com auxílio de marcadores moleculares de DNA mitocondrial (mtDNA) sobre eventos de radiação adaptativa por troca de hospedeiro e especiação em *Gyrodactylus* (ZIETARA E LUMME, 2002; HANSEN *et al.*, 2003; MEINILÄ *et al.*, 2004; BUENO-SILVA *et al.*, 2011). O emprego de mtDNA nessas análises se deve ao fato dessa molécula apresentar extenso polimorfismo intraespecífico e evoluir mais rápido que o DNA nuclear (AVISE, 2000). Recentemente, Hansen *et al.* (2003) e Meinilä *et al.* (2002, 2004) mostraram que *Gyrodactylus* spp. exibem variações inter- e intra-específicas significativas no gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), que se revelou ideal para estudos de dinâmica populacional. Esses estudos têm mostrado que o DNA mitocondrial desses animais é altamente variável. Estima-se que a taxa de substituição nucleotídica em *Gyrodactylus* spp. seja de 13,7% a 20,3% por milhão de anos (MEINILÄ *et al.*, 2004). Ocasionalmente, oligonucleotídeos iniciadores falham na amplificação de fragmentos de genes do mtDNA, provavelmente pela ocorrência de sítios crípticos variáveis na região de anelamento. Embora um par de iniciadores possa ser usado em mais de uma espécie de *Gyrodactylus*, esses não podem ser considerados universais, visto que a alta variabilidade nucleotídica do DNA mitocondrial do gênero torna a amplificação de fragmentos fortuito (MEINILÄ *et al.*, 2002).

Atualmente, vários estudos utilizam regiões repetitivas do DNA conhecidas como microssatélites para investigar estruturação genética de populações, abordando questões específicas em biologia evolutiva e de conservação (BALLOUX E LUGON-MOULIN, 2002). Por ser um marcador que requer conhecimento prévio das regiões a serem amplificadas, ainda não há microssatélites desenvolvidos para muitos organismos; este é o caso dos Monogenoidea.

Os marcadores dominantes ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) representam uma das ferramentas promissoras em estudos de genética de populações (BEHURA, 2006). O método consiste em ciclos de reações em cadeia da polimerase do DNA, utilizando iniciadores com sequências simples de di- ou trinucleotídeos (ZIETKIEWICZ *et al.* 1994) que anelam nas regiões repetitivas e amplificam os fragmentos localizados entre essas regiões, permitindo a detecção de polimorfismos individuais. O perfil genético de cada organismo é determinado pelo padrão de bandas de DNA observado através de eletroforese.

Os ISSR's têm sido muito usados para estudos botânicos, mas seu uso em análises de estruturação de populações animais vem crescendo e sendo aplicado a diferentes táxons. Com Platyhelminthes, o estudo mais recente foi desenvolvido por Casu *et al.* (2011) em uma análise filogeográfica com *Monocelis lineata* utilizando marcadores Citocromo Oxidase I e ISSR. Os autores mostraram que COI não exibe um padrão claro da diversidade genética das populações analisadas, enquanto que os dados de ISSR revelaram duas áreas geneticamente diferentes, evidenciando divergência entre as populações. Recentemente, o primeiro estudo utilizando ISSR para indivíduos da classe Monogenoidea foi realizado por Oliveira (2011) em um sistema composto por um girodactílideo vivíparo (*Gyrodactylus anisopharynx*) e seus hospedeiros *Corydoras ehrhardti* *Corydoras paleatus*, visando estabelecer hipóteses de relacionamentos genealógicos entre esses parasitos com base em sua distribuição entre os hospedeiros.

Pouco se conhece sobre processos de especiação não adaptativos em Dactylogyridae Bychowsky, 1933. Ao contrário de Gyrodactylidae, dactilogirídeos ocorrem principalmente em brânquias de peixes marinhos e de água doce (e.g. KRITSKY *et al.*, 1997, 1998; CÓRDOVA, 2008; MIZELLE *et al.*,

1968) e produzem ovos, dos quais eclodem larvas ciliadas que nadam ativamente em busca de seus hospedeiros. Além da ocorrência de estágio larval no ciclo (oncomiracídio), esses parasitos tem sua transmissão limitada a essa fase da vida (BOEGER *et al.*, 2003). O processo de troca de hospedeiros parece ser fundamentalmente mais limitado do que o observado em Gyrodactylidae, que possui transmissão contínua sem a presença de estágio larval.

*Lamellodiscus* Johnston e Tiegs 1922, um gênero de Diplectanidae que possui características muito semelhantes à Dactylogyridae (e.g. ciclo de vida), parasitam peixes Sparidae (Teleostei) na região do Mediterrâneo. Esse sistema parasito-hospedeiro tem sido bastante estudado (e.g. DESDEVISES *et al.*, 2002a; DESDEVISES *et al.*, 2002b; MLADINEO E MARSIC-LUCIC, 2007; CHAOUCH *et al.*, 2008; POISOT E DESDEVISES, 2009) e é caracterizado por apresentar um número grande de espécies de parasitos e hospedeiros vivendo em simpatria (WHITEHEAD *et al.*, 1986). Desdevises *et al.* (2002b) mostram que as filogenias comparadas dessas espécies não são congruentes e que quase nenhum evento de coespeciação parece ter ocorrido. Os autores observaram que hospedeiros que possuem relacionamento ecológico, e não filogenético, apresentam uma ou várias espécies de parasitos em comum, enquanto que espécies solitárias são menos parasitadas do que espécies que vivem em grupos, sugerindo que a escolha por hospedeiros e subsequente especialização desses parasitos se dá pela oportunidade de colonização.

Poisot e Desdevises (2009), buscando entender processos microevolutivos de espécies de *Lamellodiscus*, observaram a coexistência de duas populações de *Lamellodiscus elegans* em populações de *Diplodus sargos* e, através de análises morfométricas, sugeriram a ocorrência de um evento de especiação intra-hospedeiro em curso. Eles sugerem que espécies de *Lamellodiscus* generalistas são submetidas à especialização em seus diferentes hospedeiros, o que pode levar à especiação.

Estudando um Gyrodactylidae, Bueno-Silva *et al.* (2011) também observaram a coexistência de duas populações de *Gyrodactylus corydori* em duas espécies sintópicas de *Corydoras*. Através do uso do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e de análise morfométrica dos ganchos e âncoras do aparato de fixação (háptor), os autores mostraram a existência de

dois clados geneticamente estruturados que correspondem aos dois hospedeiros compartilhados, evidenciando um processo de especiação incipiente, como formação de linhagens de parasitos adaptadas aos seus respectivos hospedeiros. Os autores sugerem que esse fenômeno deve ser comum em espécies de Gyrodactylidae, visto que a habilidade de troca contínua de hospedeiros desses parasitos permite a “escolha” por hospedeiros mais adequados. Uma das conclusões do estudo é que o papel da transmissão contínua, como característica chave da adaptação a espécies simpátricas de hospedeiros, será melhor compreendida quando comparada com estudos aplicados em espécies de Monogenoidea que são transmitidas apenas durante a fase larval. O presente estudo, portanto, foi desenvolvido com o objetivo de tornar possível esse contraste.

Com base nos estudos sobre processos microevolutivos de uma espécie de *Gyrodactylus* em espécies sintópicas de *Corydoras* (BUENO-SILVA *et al.*, 2011; BOEGER *et al.*, 2005) e nas diferenças do processo de transmissão entre parasitos dessa família e de Dactylogyridae, levantou-se duas hipóteses/previsões sobre esses processos em uma espécie de dactilogirídeo que compartilha um par de espécies irmãs de hospedeiros sintópicos. As hipóteses são as seguintes:

1. A transmissão limitada à fase larval de oncomiracídio não favorece o processo de adaptação divergente de Dactylogyridae em hospedeiros compatíveis sintópicos e o parasito estudado utiliza as espécies de hospedeiros de forma indiscriminada.
2. A transmissão limitada à fase larval de oncomiracídio promove o processo de adaptação divergente de Dactylogyridae em hospedeiros compatíveis sintópicos e o parasito estudado apresenta linhagens genéticas com maior associação com cada uma das espécies de hospedeiros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os peixes hospedeiros, *Characidium pterostictum* Gomes, 1947 e *Characidium lanei* Travassos, 1967, foram coletados por meio de pesca elétrica e puçá no rio Marumbi (25°30'54"S, 48°52'03"W), município de Morretes, Paraná, em Março e Agosto de 2010, e Abril e Maio de 2011. Os animais foram sacrificados e colocados em um saco plástico com água aquecida à 60°C o qual foi agitado vigorosamente. Parte da amostra foi separada em outro saco plástico e fixada em formalina 5% para posterior estudo morfológico dos parasitos. A outra parte, contendo o peixe, foi fixada em álcool etílico (92 °GL) com parasitos destinados à extração de material genético. Os peixes foram levados ao laboratório para remoção e fixação das brânquias em álcool etílico (92 °GL), coleta de tecido para extração de DNA e posterior identificação pelo Dr. Vinícius Abilhoa do Museu de História Natural do Capão da Imbuia localizado no bairro Capão da Imbuia, em Curitiba, Paraná. Os parasitos foram recuperados através da triagem das brânquias com o auxílio de um estereomicroscópio.

### 2.2 PROCEDIMENTOS MOLECULARES

#### 2.2.1 Hospedeiros

O DNA total dos hospedeiros foi extraído usando kit de extração EZ-DNA (Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento do DNA mitocondrial Citocromo Oxidase B (CytB) foi amplificado com o auxílio de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores: GLUDG.L (5'-TGACCTRAACCAYCGTTG-3') (PALUMBI, 1996) e H16460 (5'-CGAYCTTCGGATTACAAGACCG-3') (PERDICES E DOADRIO, 2001). A reação de PCR foi preparada com 2 µl de extrato de DNA, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,5µl de PCR-Buffer (10X), 0,5 µl de cada iniciador (50 pmol), 0,4 µl de dNTP (25mM), 1 U Taq Polimerase (Invitrogen) e água bidestilada até completar volume final de 25 µl. O programa da PCR foi o seguinte: uma desnaturação inicial a 94° C por 4 min., seguidos de 35 ciclos de 94° C por 45seg., anelamento a 55° C por 45 seg., extensão a 72° C por 45 seg., e

extensão final a 72° C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red (BioTium), e purificado com o kit comercial Amicon Ultra ® 30kDa (Millipore). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em um seqüenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems) usando o protocolo indicado para o equipamento.

Sequências foram alinhadas com o programa MUSCLE (EDGAR, 2004) usando a interface do programa Geneious Pro 5.4.5. (DRUMMOND, 2011). As seqüências alinhadas foram comparadas com outras seqüências do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar suas identidades utilizando a ferramenta BLASTn.

### 2.2.2 Parasitos

O DNA total dos parasitos foi extraído com solução de lise WLB (Worm Buffer Lysis; WILLIAMS *et al.*, 1994). No momento da extração, alguns indivíduos escolhidos aleatoriamente tiveram seu háptor ou sua região anterior separada sob lupa para montagem de lâmina permanente em meio de Hoyer (HUMASON, 1979) para posterior identificação.

Os extratos foram submetidos a Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), nas quais os oligonucleotídeos iniciadores para o fragmento Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial COI2\_Marumb (5'-TATGGTGTGGGTAATGTGGA-3') e COI2\_Marumb (5'-GAAAATACCTTAACACCCGT-3') e COI4\_Marumb (5'-TGAACRATGTATCCTCCHTTG-3') e COI4\_Marumb (5'-AACCCAAACAAACAATAGC-3') desenhados para este estudo, foram utilizados. A solução de PCR foi preparada com 4 µl de extrato de DNA, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,5µl de PCR-Buffer (10X), 0,3 µl de cada iniciador (50 pmol), 0,4 µl de dNTP (25mM), 0,3 µl de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen) e água bidestilada até completar volume final de 25 µl. O programa de PCR se deu a partir de uma desnaturação inicial a 95° C por 5 min., seguidos de 40 ciclos de 94° C por 30 seg., anelamento a 54° C por 45 seg., extensão a 72° C por 45 seg., e extensão final a 74° C por 4 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red (BioTium) e purificado com o kit comercial Minelute (Qiagen). Os produtos de PCR

purificados foram sequenciados em um sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems) usando o protocolo indicado para o equipamento.

Sequências foram alinhadas com o programa MUSCLE (EDGAR, 2004) usando a interface do programa Geneious Pro 5.4.5. (DRUMMOND, 2011). As seqüências alinhadas foram comparadas com outras seqüências do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar suas identidades utilizando a ferramenta BLASTn.

Para a amplificação das regiões entre microssatélites (*“Inter-Simple Sequence Repeats”*) (ISSR), um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (WOLFE *et al.* 1998) foi usado, inicialmente, para testar a eficiência de amplificação de DNA das amostras (Tabela 1). Os iniciadores escolhidos foram ISSR7 e 17899, pois estes apresentaram maior polimorfismo individual e amplificação de fragmentos a partir de 0,8 uL de extrato de DNA a 10 ng/uL.

TABELA 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no teste de eficiência de amplificação de DNA dos parasitos.

Iniciador	Sequências
<b>ISSR 2</b>	5' CACACACACACACAYG 3'
<b>ISSR 3</b>	5' GAGAGAGAGAGAGARG 3'
<b>ISSR 7</b>	5' CACCACCACCACRC 3'
<b>ISSR 8</b>	5' GTGGTGGTGGTGRC 3'
<b>ISSR 9</b>	5' CTCTCTCTCTCTCTRA 3'
<b>ISSR 11</b>	5' CTCCTCCTCCTCRC 3'
<b>ISSR 15</b>	5' AGAGAGAGAGAGAGAGT 3'
<b>17899</b>	5' CACACACACACAARG 3'
<b>814</b>	5' CTCTCTCTCTCTCTTG 3'

As soluções de PCR-ISSR foram preparadas com 0,8µl de extrato de DNA, 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,5 µl de PCR-Buffer (10X), 0,18 µl de iniciador (50 pmol), 0,24 µl de dNTP (25mM), 0,18 µl de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen) e água bidestilada até completar volume final de 15 µl. As condições da reação para a amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 1,5 min.; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s; anelamento à temperatura específica para cada iniciador (50°C para ISSR7 e 52°C para

17899) por 45 s; extensão a 72 °C por 1,5 min. e extensão final a 72 °C por 3 min. A definição das bandas resultantes foi realizada através de eletroforese de 10µl do produto da PCR em gel de agarose 2% usando TBE (1X) a 80V por 6 horas. As bandas foram coradas por 40 min. em Gel Red (BioTium) e visualizadas sob luz UV. As imagens foram registradas com o auxílio do equipamento de foto documentação Vilber-Lourmat.

O padrão de banda de cada indivíduo foi definido a partir das imagens obtidas dos géis usando o programa 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, gerando para cada indivíduo e iniciadores utilizados, uma matriz binária de presença (1) e ausência (0).

### 2.3 ABUNDÂNCIA, PREVALÊNCIA E INTENSIDADE MÉDIA

De acordo com Bush *et al.* (1997) a abundância representa o número de parasitos observados sobre o total de peixes amostrados; prevalência é a proporção de peixes infectados; intensidade de parasitismo é o número total de parasitos de cada espécie dividido pelo número de hospedeiros.

### 2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

O modelo mais adequado de evolução molecular e nucleotídeos (TPM3uf+G para CytB dos hospedeiros e HKY+G para COI dos parasitos) foi obtido através do programa jModelTest 1.1 (POSADA, 2008). O relacionamento filogenético foi inferido pelo programa Mr. Bayes 3.1.2 implementado no portal CIPRES (MILLER *et al.*, 2010). Os critérios da análise bayesiana foram: modelo molecular com 2 tipos de substituição para os parasitos e 6 tipos de substituição para os hospedeiros, e sítios variáveis com distribuição gama, estimado para 10.000.000 de gerações.

Para a reconstrução do relacionamento filogenético das espécies de hospedeiros amostradas neste estudo, sequências de outras espécies de *Characidium* disponíveis no GenBank (*C. laterale* Boulenger, 1895 -

HQ289685.1; *C. vidali* Travassos, 1967 – AY791388.1; *C. fasciatum* Reinhardt, 1867 – AY791380.1; e *C. pterostictum* – HQ289573.1) foram utilizadas juntamente com as sequências produzidas neste trabalho em uma análise Bayesiana, cujo grupo externo foi *Crenuchus spilurus* Günther, 1863 – HQ289664.1. O modelo mais adequado de evolução molecular dos nucleotídeos (A, C, T e G) foi HKY e os critérios da análise no programa Mr. Bayes foram: modelo molecular com 6 tipos de substituição e sítios variáveis com distribuição gama, estimado para 10.000.000 de gerações.

O total de sequências obtidas para *C. pterostictum* (25) e *C. lanei* (15) foi submetido a uma análise no programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para determinar o número de haplótipos. O relacionamento filogenético desses haplótipos foi obtido por inferências Bayesiana no programa Mr. Bayes implementado no portal CIPRES. *Melanocharacidium* sp. - AY791439.1 foi usada como grupo externo.

As sequências dos parasitos também foram submetidas a uma análise Bayesiana sob os mesmos parâmetros descritos acima e o grupo externo utilizado foi *Haliotrema aurigae* Yamaguti, 1968 (EU008819.1) disponível no GenBank.

Para os dados de ISSR, uma análise de cluster foi utilizada para agrupar indivíduos geneticamente semelhantes. Um dendograma de cluster foi construído pelo programa PAST 2.09 (HAMMER *et al.* 2001) utilizando o índice de Jaccard e o algoritmo UPGMA (“*unweighted pair group method with arithmetic mean*”). O suporte de ramo foi obtido pelo método de “bootstrap” com 1.000 repetições. O dendograma obtido através do programa PAST foi submetido ao programa Mesquite 2.6 (MADDISON E MADDISON, 2009) para analisar de que maneira os parasitos estão distribuídos na topologia do dendograma através da “reconstrução de caráter ancestral” usando o critério de parcimônia (MADDISON, 1995). O método consiste em otimizar a topologia obtida no programa PAST através de uma distribuição ao acaso obtida através da aleatorização dos caracteres (haplótipos de hospedeiros) 1000 vezes sobre esta topologia. Se o número de passos evolutivos observado na otimização dos dados obtidos não for significativamente ( $p > 0,05$ ) diferente do número de eventos obtidos ao acaso, a hipótese de que a população encontra-se distribuída aleatoriamente é aceita. Por outro lado, se o número de passos

evolutivos for significativamente diferente da média observada na distribuição, a ocorrência desta espécie de parasito entre os haplótipos de hospedeiros não é considerada casual.

## 2.5 ANÁLISE DE COESPECIAÇÃO

A análise de coespeciação foi realizada com o auxílio do programa TreeMap 1.0 (PAGE, 1994). Essa análise consiste na reconciliação das filogenias dos hospedeiros e parasitos, que foram obtidas por inferência Bayesiana, considerando quatro tipos de eventos: coespeciação, troca de hospedeiros, duplicação ou especiação intra-hospedeiro e extinção da linhagem parasita. Utilizando o critério de parcimônia, o programa tenta explicar as diferenças entre as duas filogenias postulando o menor número possível de eventos. Um teste de aleatorização ( $n=1000$ ) foi realizado para avaliar o número de eventos necessários para compatibilizar as duas filogenias é significativamente diferente do que seria o esperado em uma distribuição ao acaso.

Para essa análise, foram avaliadas as relações entre (i) análise Bayesiana dos haplótipos dos hospedeiros e a análise Bayesiana do fragmento COI dos parasitos; (ii) análise Bayesiana dos haplótipos dos hospedeiros e o dendrograma de cluster obtido a partir dos dados de ISSR dos parasitos.

## 2.6 REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DE SINAL FILOGENÉTICO

Para avaliar as relações evolutivas entre haplótipos de hospedeiros e parasitos, foram construídas redes de haplótipos com o auxílio do programa TCS 1.2.1 (CLEMENT *et al.*, 2000). Com o intuito de entender a distribuição dos haplótipos de parasitos entre os haplótipos de hospedeiros, as frequências dos haplótipos de parasitos, em cada haplótipo de hospedeiro, foram indicadas e graficamente plotadas. Uma regressão linear foi aplicada para excluir os efeitos de abundância dos haplótipos.

Para testar a significância das relações visualizadas na rede de haplótipos dos hospedeiros, foi realizada uma análise de sinal filogenético implementada na função *phylosignal* do pacote *picante* (KEMBEL *et al.*, 2010) no ambiente R (<http://www.r-project.org/>). A análise de sinal filogenético é uma

medida quantitativa do grau no qual a filogenia prevê similaridades ecológicas entre as espécies. A estatística  $K$  é uma medida do sinal filogenético que compara o sinal observado de uma característica com o sinal esperado pelo modelo Browniano de evolução de características em uma filogenia (BLOMBERG *et al.*, 2003). Os valores de  $K$  próximos a 1 correspondem a um processo de movimento Browniano, que indica algum grau de sinal filogenético ou conservação da característica entre grupos filogeneticamente próximos. Valores de  $K$  próximos a 0 correspondem a um padrão de evolução aleatória; já valores maiores do que 1 indicam forte sinal filogenético. A significância estatística ( $p$ ) de  $K$  pode ser avaliada comparando o padrão observado com um modelo nulo, no qual os terminais da árvore são aleatorizados (KEMBEL, 2010). Para este estudo utilizou-se a filogenia dos parasitos gerada pela análise Bayesiana das sequências de COI e a característica, cujo sinal filogenético foi avaliado, foi o haplótipo do hospedeiro em que cada parasito foi encontrado.

## 2.7 RECONSTRUÇÃO DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

Os modelos de evolução molecular sugeridos pelo programa jModelTest 1.1 para CytB dos hospedeiros e COI dos parasitos também foram usados na análise de reconstrução da história demográfica dessas populações. O relacionamento filogenético baseado nessas sequências foi inferido por análise Bayesiana implementada no programa BEAST 1.7. Valores de probabilidade posterior foram estimados com dados não particionados, quatro corridas independentes com 10,000,000 de gerações, amostragem a cada 1,000 árvores, “burn-in” de 1,000 árvores e frequência de bases estimada. Os grupos externos foram *Melanocharacidium* sp. para os hospedeiros e *H.aurigae* para os parasitos.

Para os hospedeiros, a taxa evolutiva de CytB utilizada foi de 0,8% por milhões de anos estimada por Ornelas-García *et al.* (2008) para *Astyanax* da Mesoamérica, enquanto que para os parasitos a taxa utilizada foi 4% por Ma, estimada por Glennon *et al.* (2008) para CytB de *Calicotyle* na Austrália. Essas taxas foram usadas para inferir as datas de divergência de clados de espécies

com base em um modelo de relógio molecular fixo implementado no programa BEAST 1.7. A história demográfica das populações foi inferida por coalescência Bayesiana ("*Bayesian skyline plots*") utilizando os programas BEAST 1.7 e Tracer 1.5. A possível ocorrência de mudanças na história demográfica das populações de hospedeiros e parasitos foi também avaliada pela análise das diferenças pareadas (*mismatch distribution*) através do programa DnaSP 5.0 (LIBRADO E ROZAS, 2009).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 PROCESSAMENTO MORFOLÓGICO DOS PARASITOS E ABUNDÂNCIA

Espécimes de parasitos encontrados nas brânquias de *C. pterostictum* e *C. lanei* foram submetidos a um estudo morfológico através da montagem de lâminas em meio de Hoyer para clarificação, e coloração em tricrômico de Gomori, para a observação das partes moles do corpo (HUMANSON, 1979). A análise morfológica sugere que o parasito se trata de um gênero novo dentro de Dactylogyridae (Figura 1). A descrição da espécie tipo desse gênero está em andamento.

Foram coletados 188 peixes, dos quais apenas 67 (39 de *C. pterostictum* e 28 de *C. lanei*) continham parasitos do Gênero novo sp.n., totalizando 135 parasitos coletados das brânquias. A abundância de parasitos para cada espécie de hospedeiro é apresentada na Tabela 2.

TABELA 2 - Dados de abundância, prevalência e intensidade média do Gênero novo sp.n. coletado em hospedeiros *C. pterostictum* e *C. lanei* coletados do Rio Marumbi na cidade de Morretes, Paraná, Brasil.

	<i>Characidium pterostictum</i>	<i>Characidium lanei</i>
Abundância	3,76	0,5
Prevalência	87%	21%
Intensidade Média	4	2

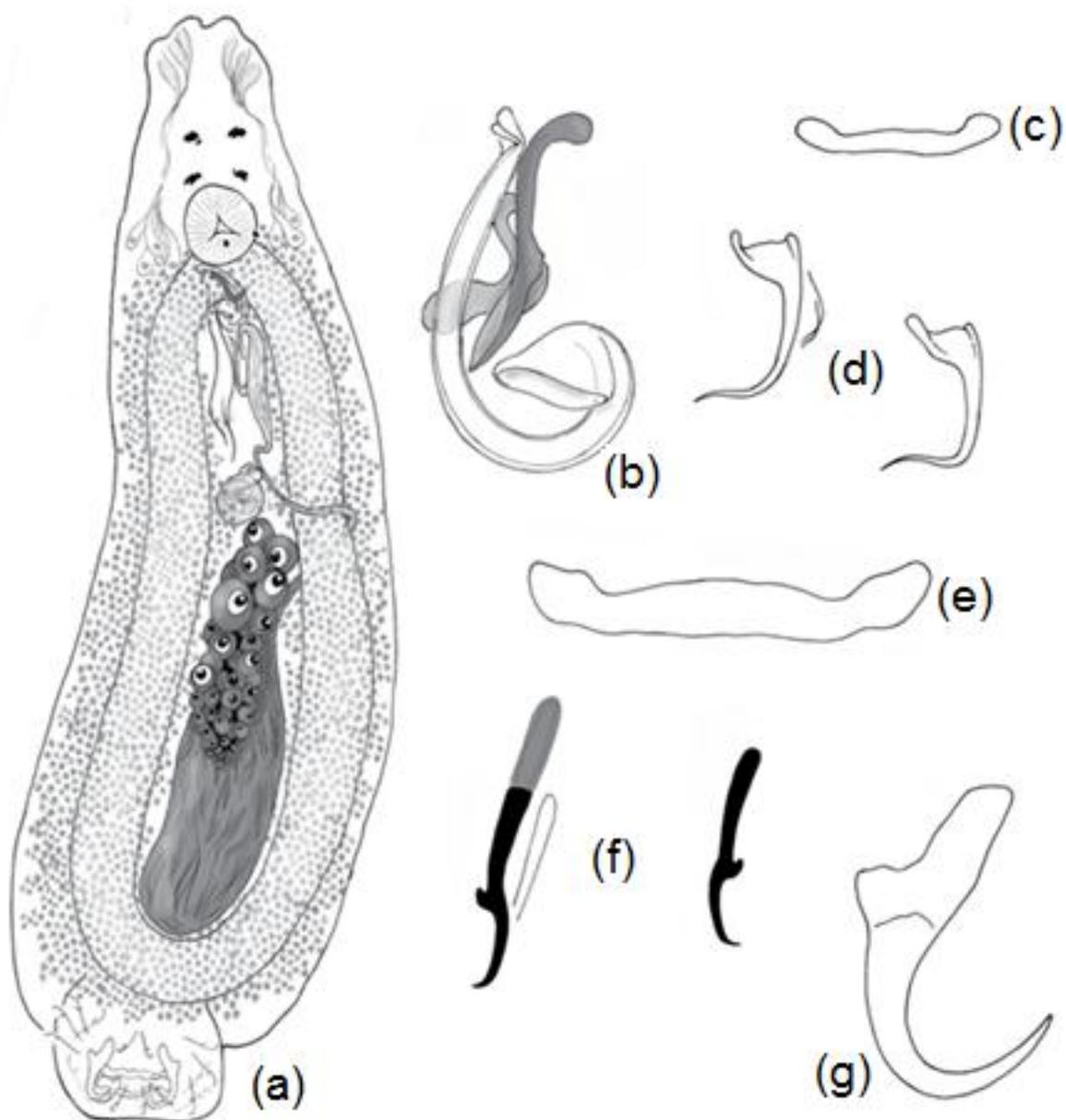


FIGURA 1 - Desenho da espécie tipo do Gênero novo sp.n. encontrado nas brânquias de *C. pterostictum* e *C. lanei*. (a) Holótipo ventral; (b) Órgão copulatório masculino; (c) Barra ventral; (d) Âncora ventral; (e) Barra dorsal; (f) Gancho; (g) Âncora dorsal.

### 3.2. PROCEDIMENTOS MOLECULARES

#### 3.2.1. Hospedeiros

Quarenta hospedeiros (25 espécimes *C. pterostictum* e 15 espécimes de *C. lanei*) tiveram 919 pb sequenciados para o gene CytB. A análise Bayesiana (Figura 2) mostrou suporte para dois clados de espécies de *Characidium*, correspondendo a *C. pterostictum* e *C. lanei*.

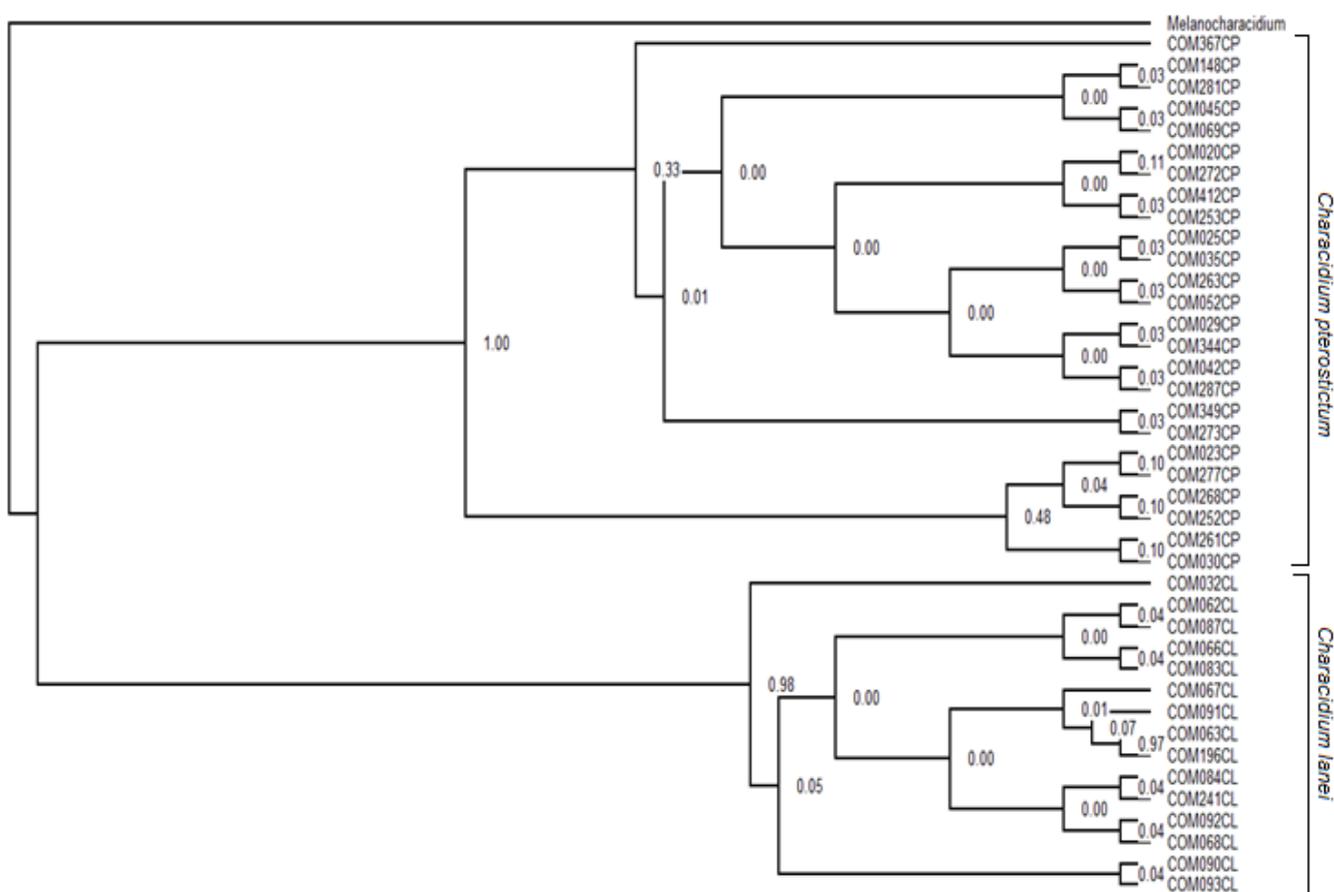


FIGURA 2 - Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada no gene CytB, mostrando o relacionamento filogenético dos hospedeiros coletados para este estudo. As identificações CP e CL correspondem aos hospedeiros *C. pterostictum* e *C. lanei*, respectivamente.

A análise Bayesiana do relacionamento filogenético das espécies de *Characidium* mostra que *C. lanei* e *C. pterostictum* são espécies irmãs, como demonstra a Figura 3. Indivíduos de *C. pterostictum* agruparam com *C.vidali* com valor de probabilidade posterior igual à 100%. Este resultado sugere revisão na taxonomia e características morfológicas utilizadas na identificação desses hospedeiros.

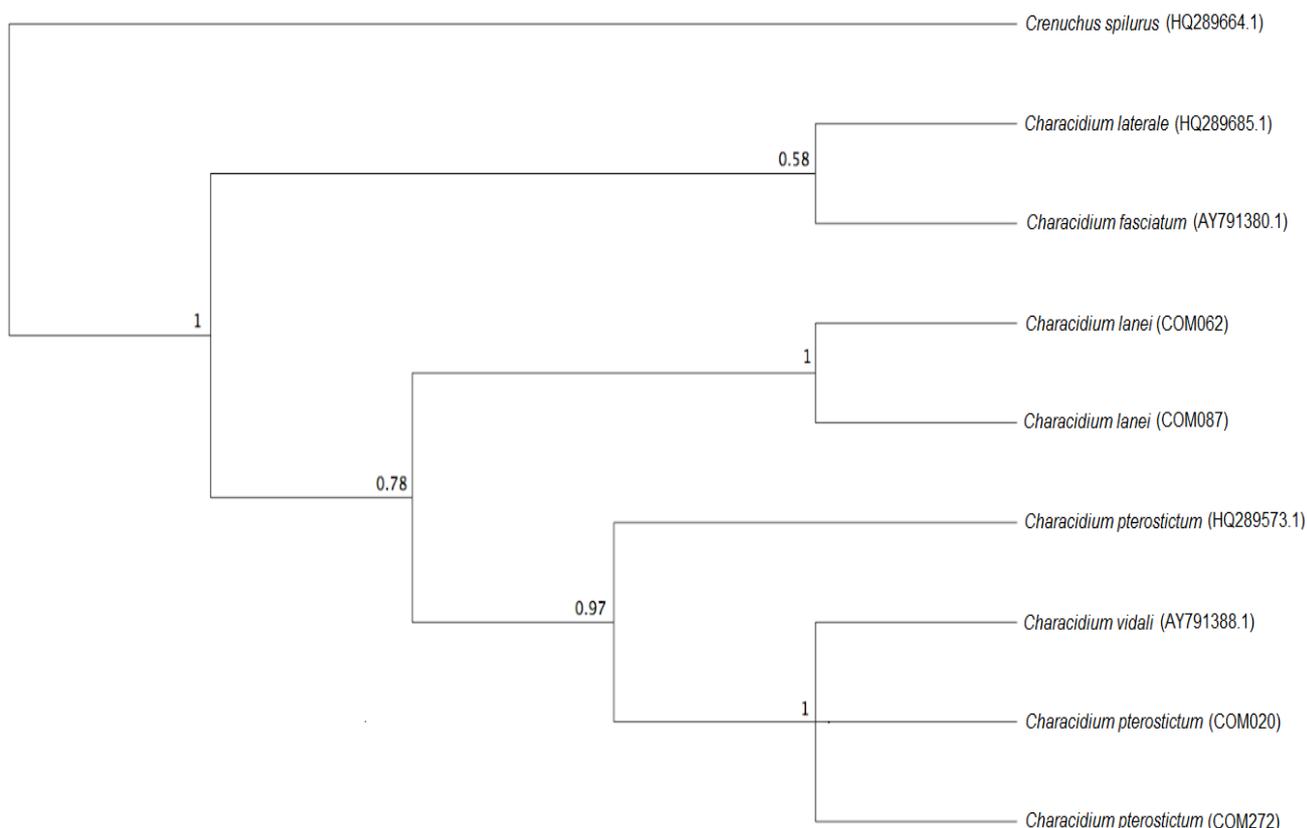


FIGURA 3 - Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada no gene CytB, mostrando o relacionamento filogenético das espécies de *Characidium* deste estudo. Asterisco (\*) indica sequências obtidas do GenBank.

O programa Arlequin 3.11 revelou a existência de 17 haplótipos de peixes (8 haplótipos de *C. pterostictum* e 9 haplótipos de *C. lanei*) (Tabela 3). A partir desses dados, a análise Bayesiana (Figura 4) foi utilizada para construir uma hipótese filogenética para o relacionamento filogenético desses haplótipos.

TABELA 3 - Haplótipos dos hospedeiros *C. pterostictum* e *C. lanei* a partir das sequências de CytB.

Hospedeiros	Tombo	Haplótipos	
<i>Characidium pterostictum</i>	COM148	HCP-A	
	COM025		
	COM035		
	COM042		
	COM045		
	COM349		
	COM344		
	COM287		
	COM281		
	COM273		
	COM263		
	COM253		
	COM069		
	COM052		
	<i>Characidium pterostictum</i>		COM023
COM277			
COM261			
COM252			
COM030			
COM412			
COM367			
COM020			
<i>Characidium pterostictum</i>	COM029	HCP-F	
	COM272	HCP-G	
	COM268	HCP-H	
	<i>Characidium lanei</i>	COM062	HCL-I
		COM066	
		COM084	
		COM067	
COM068			
COM241			
COM083			
COM032		HCL-J	
COM063		HCL-K	
COM087		HCL-L	
COM090	HCL-M		
COM091	HCL-N		
COM092	HCL-O		
COM093	HCL-P		
COM196	HCL-Q		

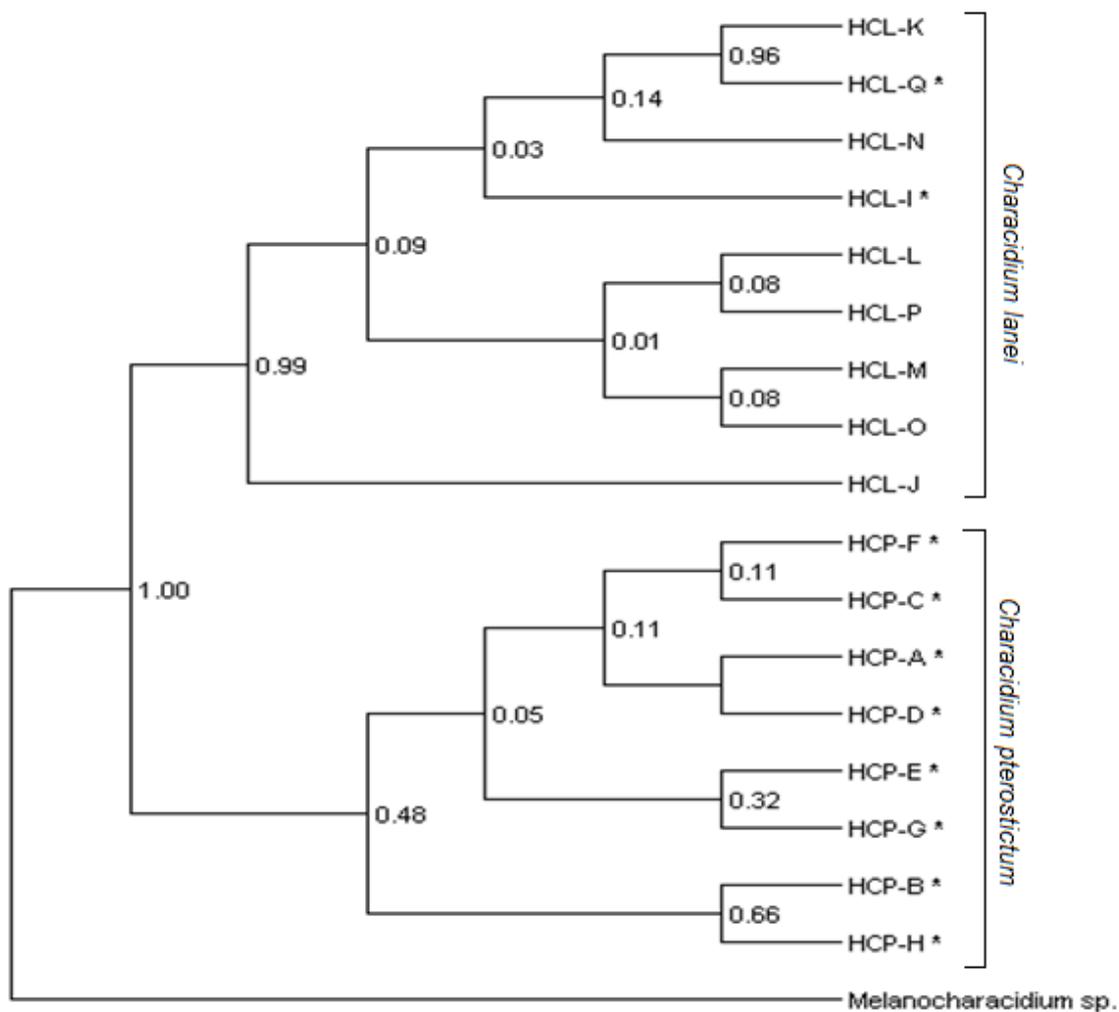


FIGURA 4 - Relacionamento filogenético entre os haplótipos de hospedeiros *C. pterostictum* e *C. lanei*. Os asteriscos (\*) indicam os haplótipos onde foram encontrados os parasitos utilizados neste estudo.

### 3.2.2. Parasitos

#### 3.2.2.1 Citocromo Oxidase I (COI)

Para as análises moleculares dos parasitos, 28 indivíduos tiveram 594 pb sequenciados para o gene mitocondrial COI. O resultado da análise Bayesiana dessas sequências pode ser observado na Figura 5.

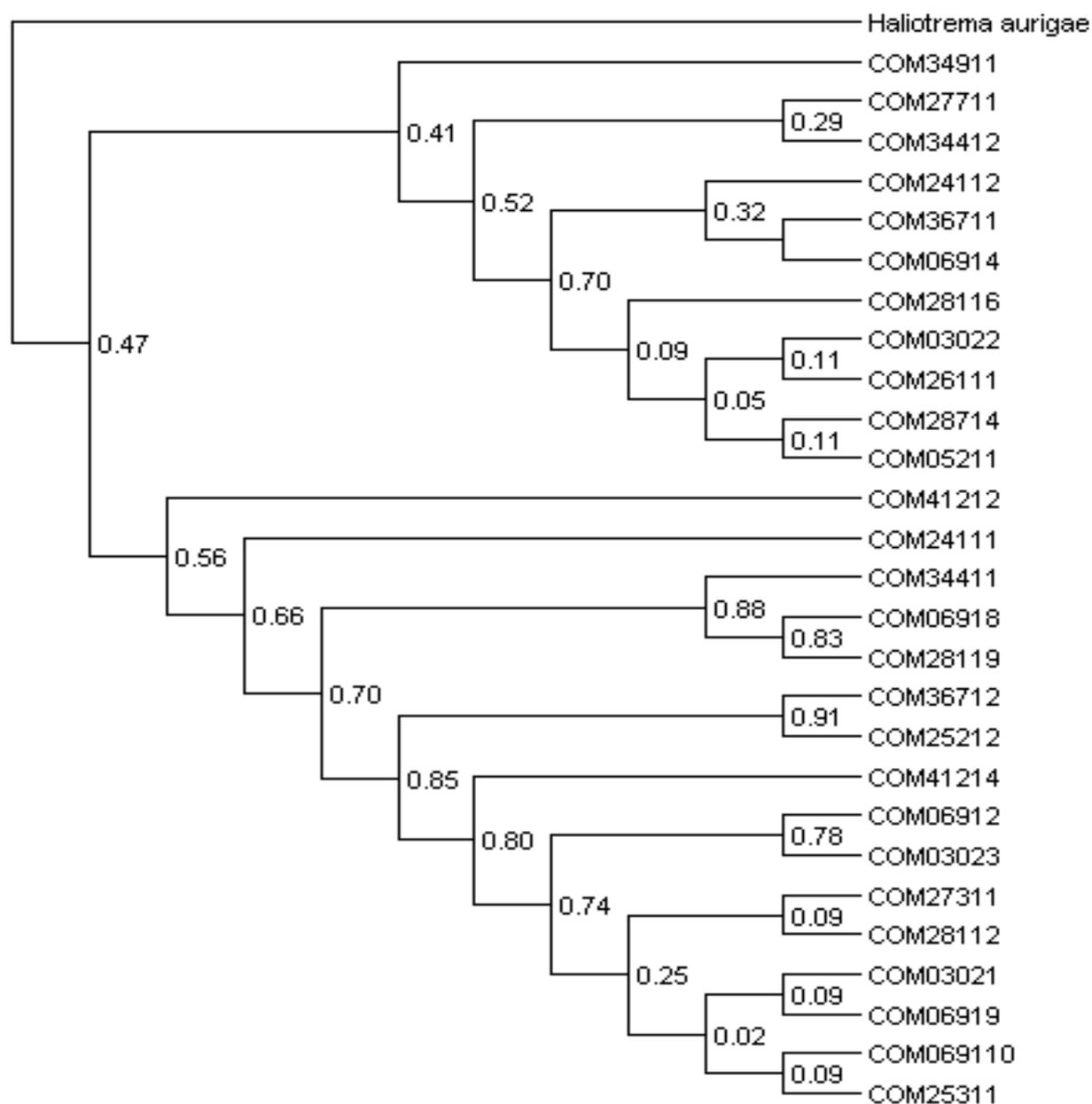


FIGURA 5 - Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada na sequência parcial do gene COI, mostrando o relacionamento filogenético dos parasitos coletados para este estudo. Os números de tombo dos parasitos estão indicados na topologia.

O programa Arlequim 3.11 revelou a existência de 22 haplótipos de parasitos (20 haplótipos para parasitos de *C. pterostictum* e 2 haplótipos para parasitos de *C. lanei*) (Tabela 4).

TABELA 4 - Haplótipos dos parasitos a partir de seqüências de COI.

Hospedeiro	Tombo	Haplótipos		
<i>Characidium pterostictum</i>	COM030 -2-1 (C176)	HGN-A		
	COM069 -1-10(C173)			
	COM069 -1- 9 (C172)			
	COM281 -1- 2 (C446)			
	<i>Characidium pterostictum</i>	COM030 -2-2 (C177)	HGN-B	
		COM287 -1-4 (C439)		
		COM261 -1-1 (C301)		
		<i>Characidium pterostictum</i>	COM069 -1-2 (C165)	HGN-C
			COM030 -2-3 (C178)	
		<i>Characidium pterostictum</i>	COM069 -1-4 (C167)	HGN-D
			COM069 -1-8 (C171)	HGN-E
			COM273 -1-1 (C303)	HGN-F
			COM253 -1-1 (C329)	HGN-G
			COM281 -1-6 (C450)	HGN-H
			COM281 -1-9 (C453)	HGN-I
			COM052 -1-1 (C455)	HGN-J
			COM252 -1-2 (C474)	HGN-K
			COM264 -1-1 (C478)	HGN-L
			COM412 -1-2 (C508)	HGN-M
			COM412 -1-4 (C510)	HGN-N
COM349 -1-1 (C512)	HGN-O			
COM344 -1-1 (C513)	HGN-P			
COM344 -1-2 (C514)	HGN-Q			
COM277 -1-1 (C515)	HGN-R			
COM367 -1-2 (C516)	HGN-S			
COM367 -1-1 (C517)	HGN-T			
<i>Characidium lanei</i>	COM241 -1-1 (C505)		HGN-U	
	COM241 -1-2 (C506)	HGN-V		

### 3.2.2.2 Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR)

Os resultados da aplicação dos marcadores/inciadores de ISSR para os parasitos são apresentados nas Figuras 6 e 7.

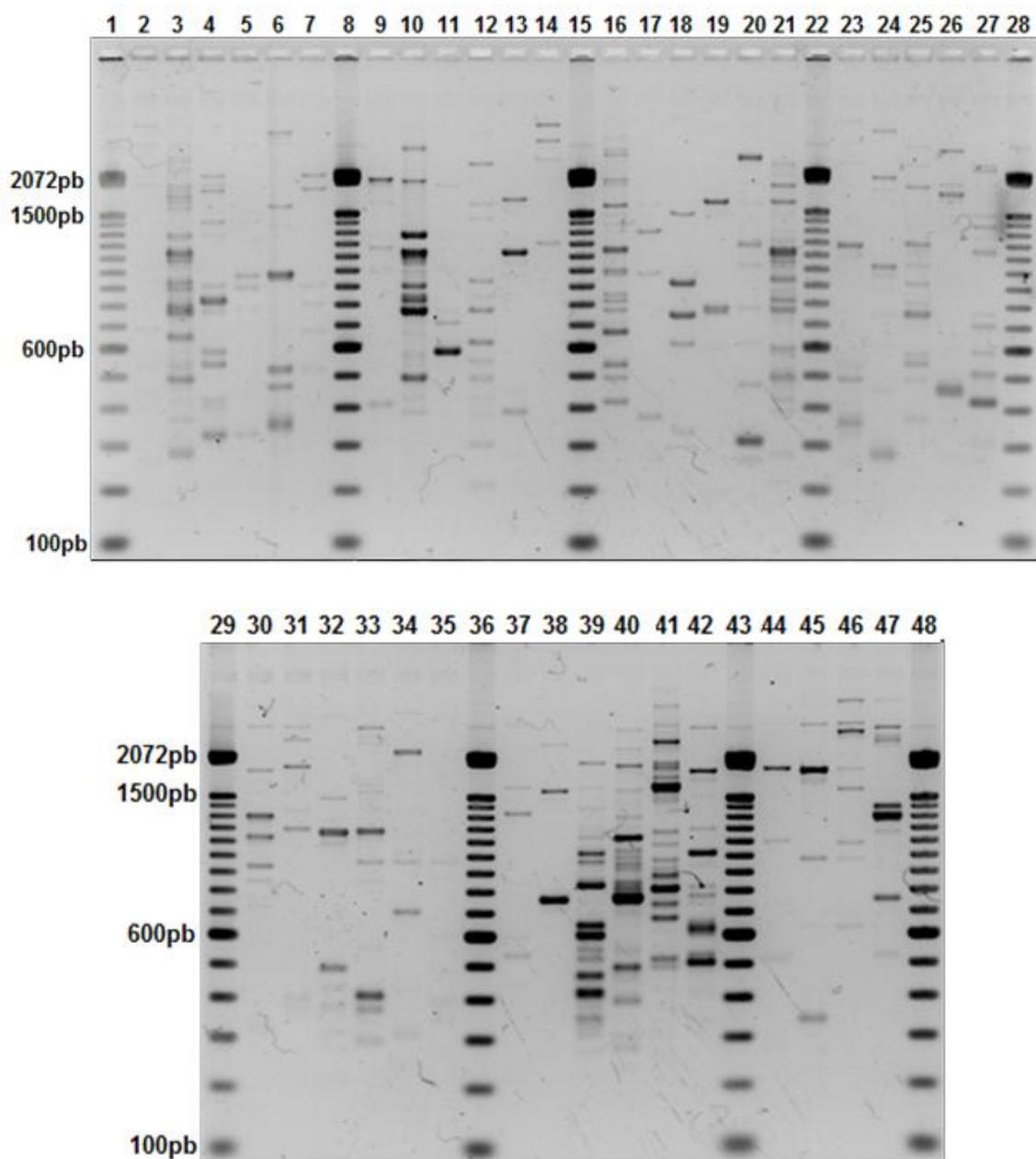


FIGURA 6 - Perfil da eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação do DNA dos parasitos utilizando o iniciador ISSR7. Os marcadores de massa 100pb (Invitrogen) encontram-se nas colunas 1, 8, 15, 22, 28, 29, 36, 43 e 48.

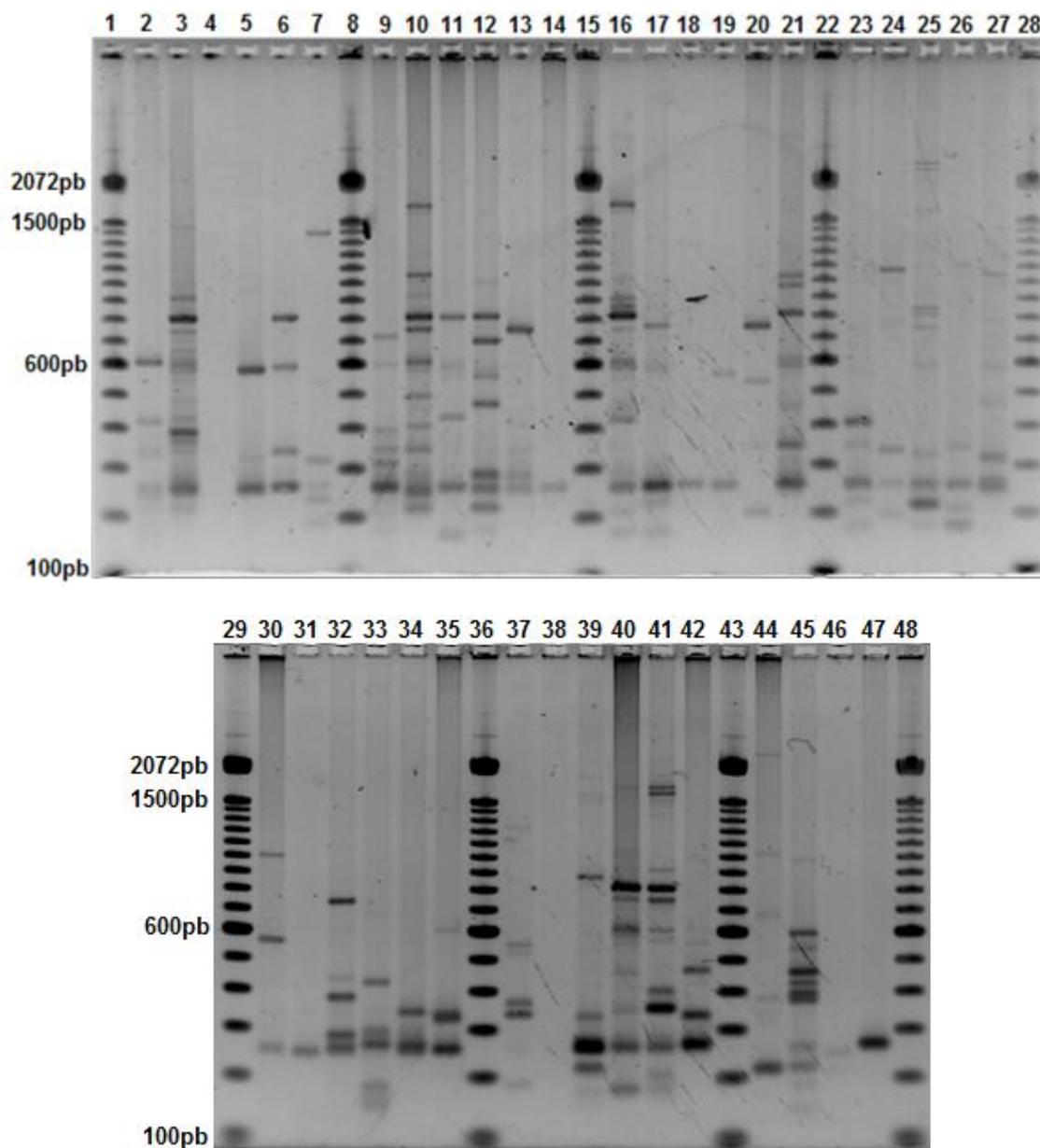


FIGURA 7 - Perfil da eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação do DNA dos parasitos utilizando o iniciador 17899. Os marcadores de massa 100pb (Invitrogen) encontram-se nas colunas 1, 8, 15, 22, 28, 29, 36, 43 e 48.

Com o auxílio do programa Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics), os fragmentos amplificados foram agrupados de acordo com seu peso molecular, gerando, para cada indivíduo e iniciadores, uma matriz binária de presença (1) e ausência (0), apresentada na Tabela 5.





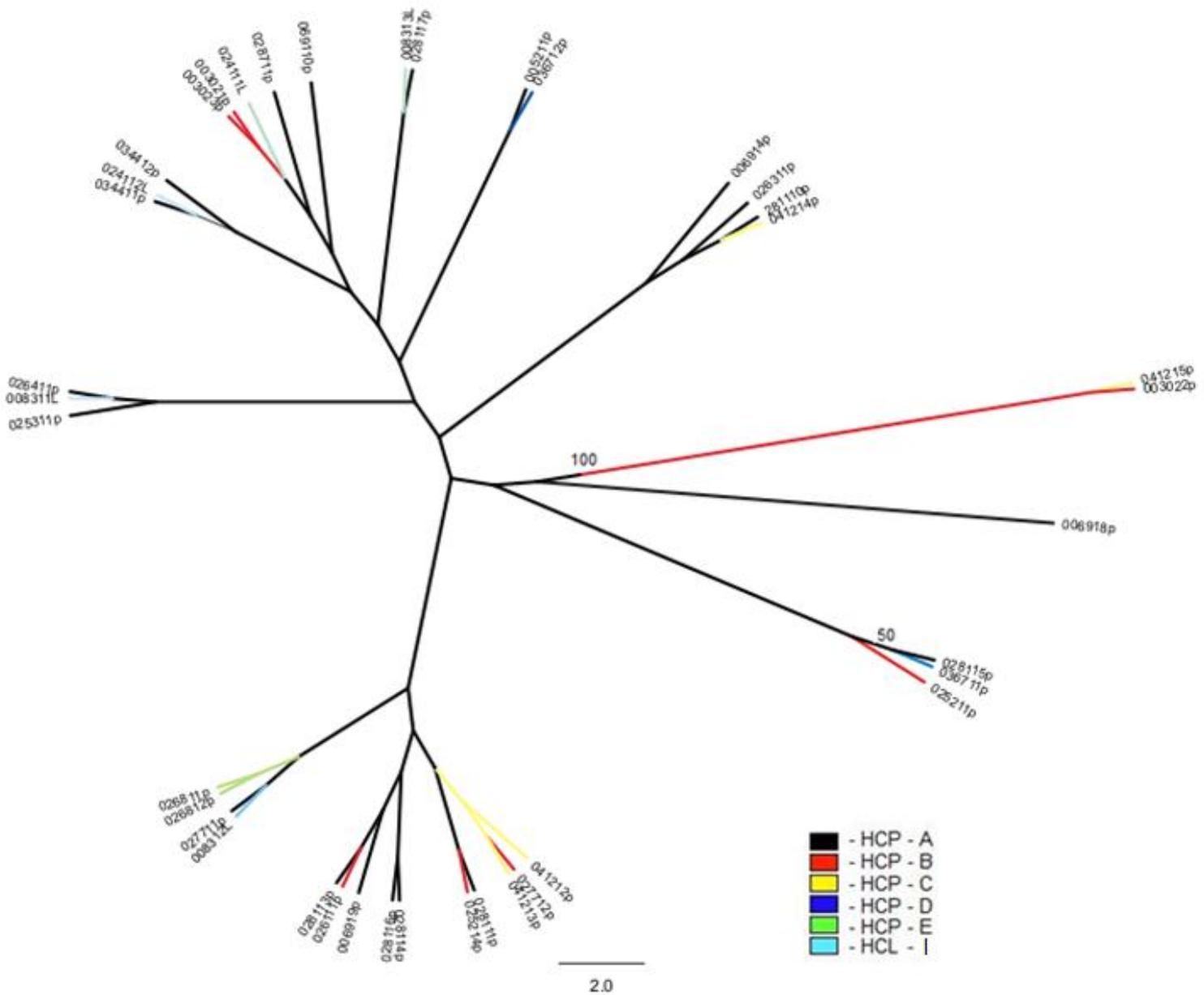


FIGURA 8 - Reconstrução do caráter ancestral (haplótipos de hospedeiros) sobre o cladograma de cluster não enraizado usando o critério de parcimônia. As cores representam os haplótipos de hospedeiros HCP-A, HCP-B, HCP-C, HCP-D, HCP-E e HCL-I plotados na filogenia. Os códigos HCP são haplótipos de *C. pterostictum* e o código HCL representa o haplótipo de *C. lanei*. São apresentados os valores de bootstrap acima de 50%.

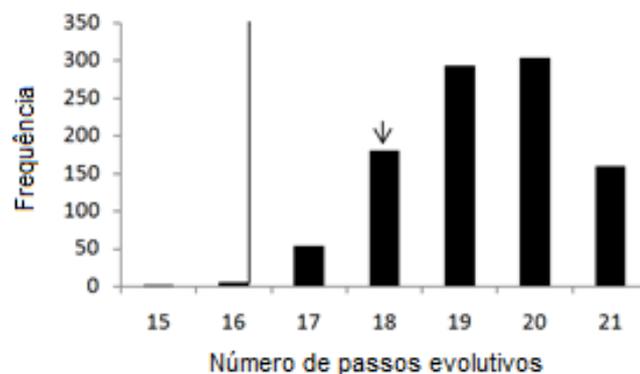


FIGURA 9 - Avaliação da reconstrução do caráter ancestral por parcimônia baseado na análise de Cluster dos dados de ISSR. A topologia foi aleatorizada 1000 vezes. Os valores no eixo “x” indicam o número de passos evolutivos na topologia da Figura 8. A linha preta representa o intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) e a seta indica o número de passos observados em relação à distribuição aleatória dos haplótipos de hospedeiros na topologia da Figura 8.

### 3.3 ANÁLISE DE COESPECIAÇÃO

#### 3.3.1. Haplótipos de hospedeiros X Indivíduos parasitas

A reconciliação das filogenias dos haplótipos de hospedeiros e dos parasitos obtidas no programa TreeMap 1.0 está representada na Figura 10. Um teste de aleatorização das duas filogenias (Figura 11) indica que o número de eventos de coespeciação postulados para explicar a distribuição dos haplótipos de parasitos e seus hospedeiro não é significativamente diferente de uma distribuição resultante de associações ao acaso.

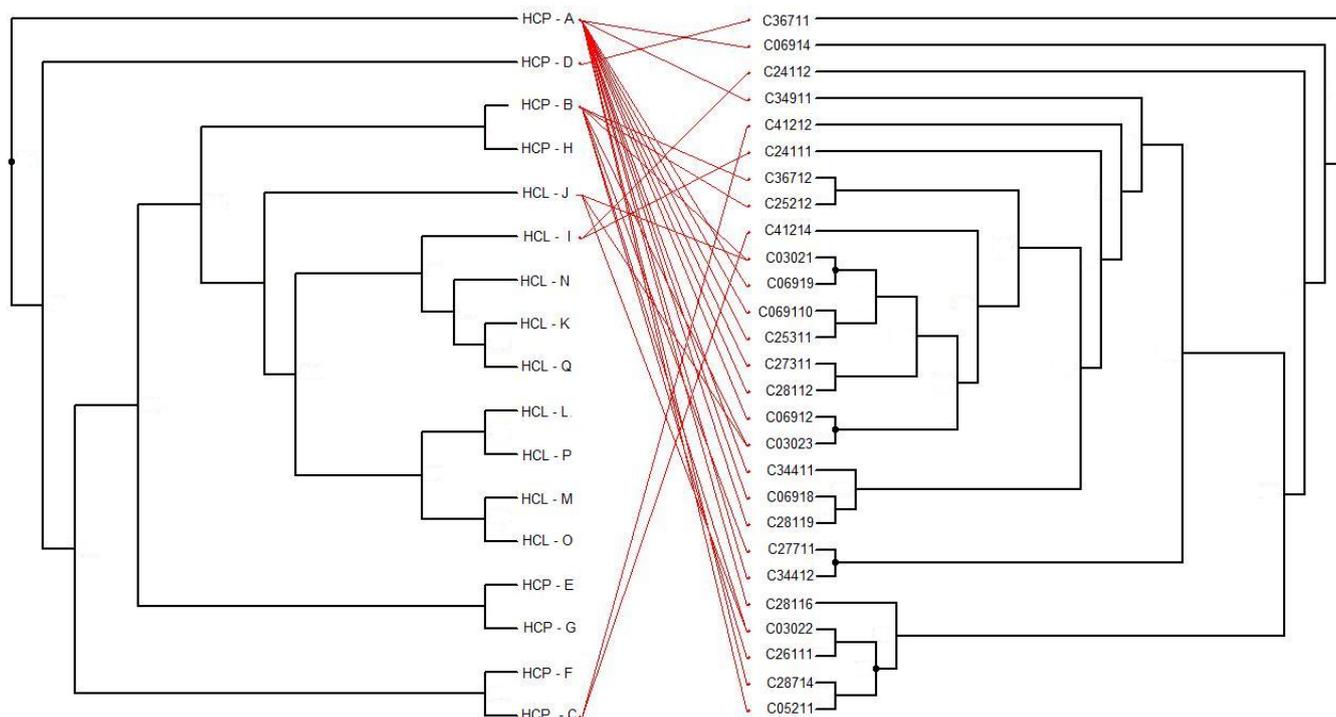


FIGURA 10 - Padrão da associação dos hospedeiros (à esquerda) e parasitos (à direita) utilizando filogenias baseadas em inferência Bayesiana das sequências dos haplótipos dos hospedeiros e das sequências de COI dos parasitos. As linhas mostram as associações parasito-hospedeiro. Os números representam o tombo de cada indivíduo parasita. HCL = haplótipo de *C. lanei*; HCP= haplótipo de *C. pterostictum*.

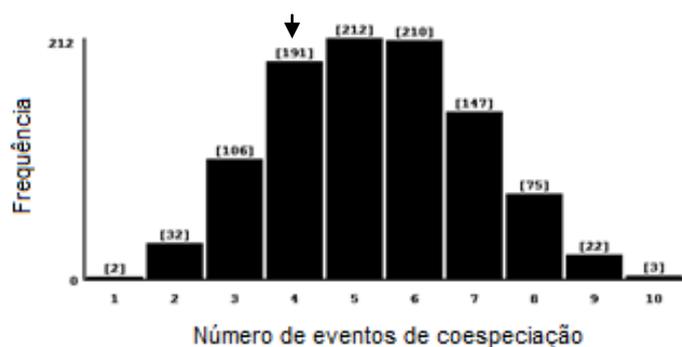


FIGURA 11 - Histograma gerado pelo programa TreeMap dos haplótipos dos hospedeiros e das sequências de COI dos parasitos. O gráfico mostra a distribuição do número de eventos de coespeciação em associações aleatórias ( $n = 1000$ ). A flecha indica o número de coespeciações inferidas pelo programa TreeMap para a associação haplótipos de hospedeiros-parasitos.

### 3.3.2. Haplótipos de hospedeiros X Dendrograma ISSR dos parasitos

A reconciliação da filogenia dos haplótipos de hospedeiros e da filogenia proveniente da análise de Cluster feita a partir dos dados de ISSR dos parasitos pode ser observada na Figura 12. Um teste de aleatorização das duas filogenias (Figura 13) indica que o número de eventos de coespeciação postulados para explicar a distribuição dos haplótipos de parasitos e seus hospedeiros não é significativamente diferente de uma distribuição resultante de associações ao acaso.

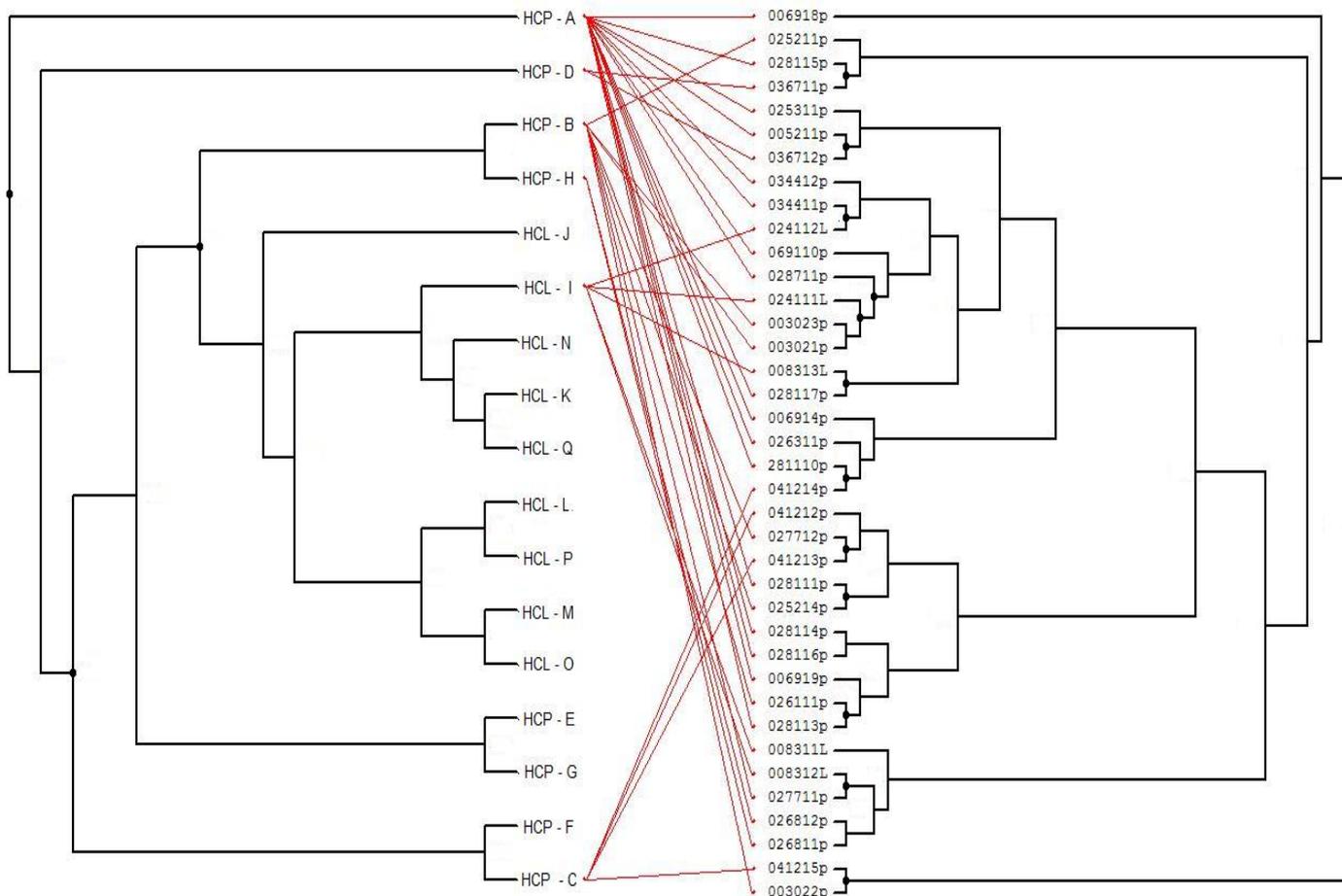


FIGURA 12 - Padrão da associação dos hospedeiros e parasitos utilizando uma filogenia baseada em inferência Bayesiana das sequências dos haplótipos dos hospedeiros e dendrograma baseado em dados de ISSR dos indivíduos parasitos. As linhas mostram as associações parasito-hospedeiro. Os números representam o tombo de cada indivíduo parasita. HCL = haplótipo de *C. lanei*; HCP= haplótipo de *C. pterostictum*.

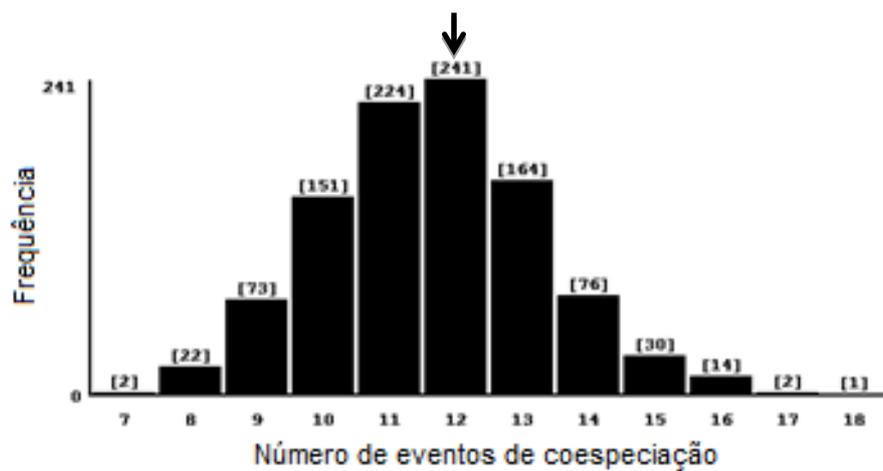


FIGURA 13 - Histograma gerado pelo programa TreeMap dos haplótipos dos hospedeiros e dendograma baseado em dados de ISSR dos indivíduos parasitos. O gráfico mostra a distribuição do número de eventos de coespeciação em associações aleatórias ( $n = 1000$ ). A flecha indica o número de coespeciações inferidas pelo programa TreeMap para a associação haplótipos de hospedeiros-parasitos.

### 3.4. REDE DE HAPLÓTIPOS E ANÁLISE DE SINAL FILOGENÉTICO

A relação entre os haplótipos de parasitos é apresentada na Figura 14.

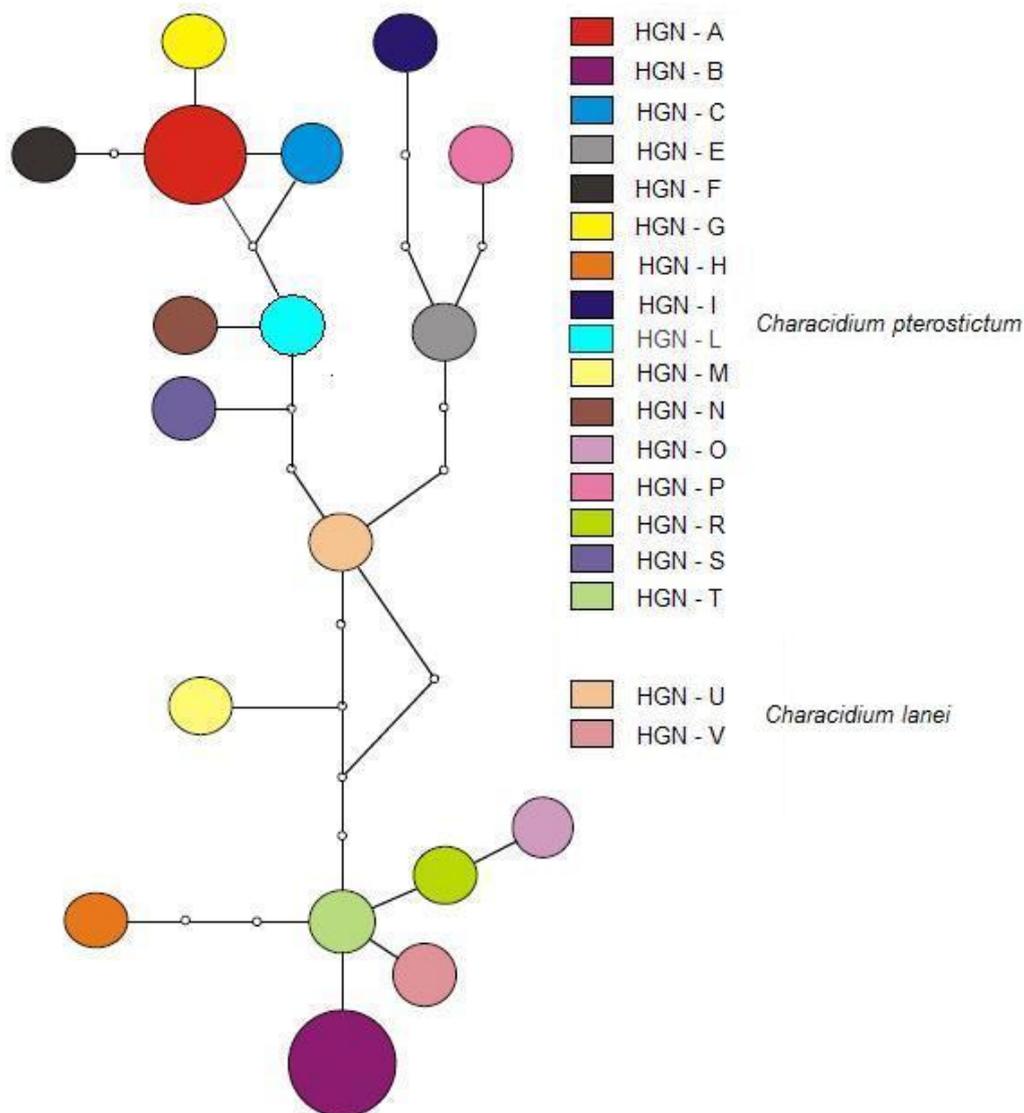


FIGURA 14 - Rede de haplótipos mais parcimoniosa para o gene COI dos parasitos. As cores representam os haplótipos. Os pontos brancos representam as mutações que separam os haplótipos. A frequência dos haplótipos é representada pelo tamanho dos círculos. Círculos menores contêm apenas um indivíduo. Os haplótipos HGN - A e HGN - B contêm 4 e 3 indivíduos, respectivamente.

Os haplótipos de parasitos revelados pelo programa Arlequin foram distribuídos na rede de haplótipos de hospedeiros obtida pelo programa TCS (Figura 15).

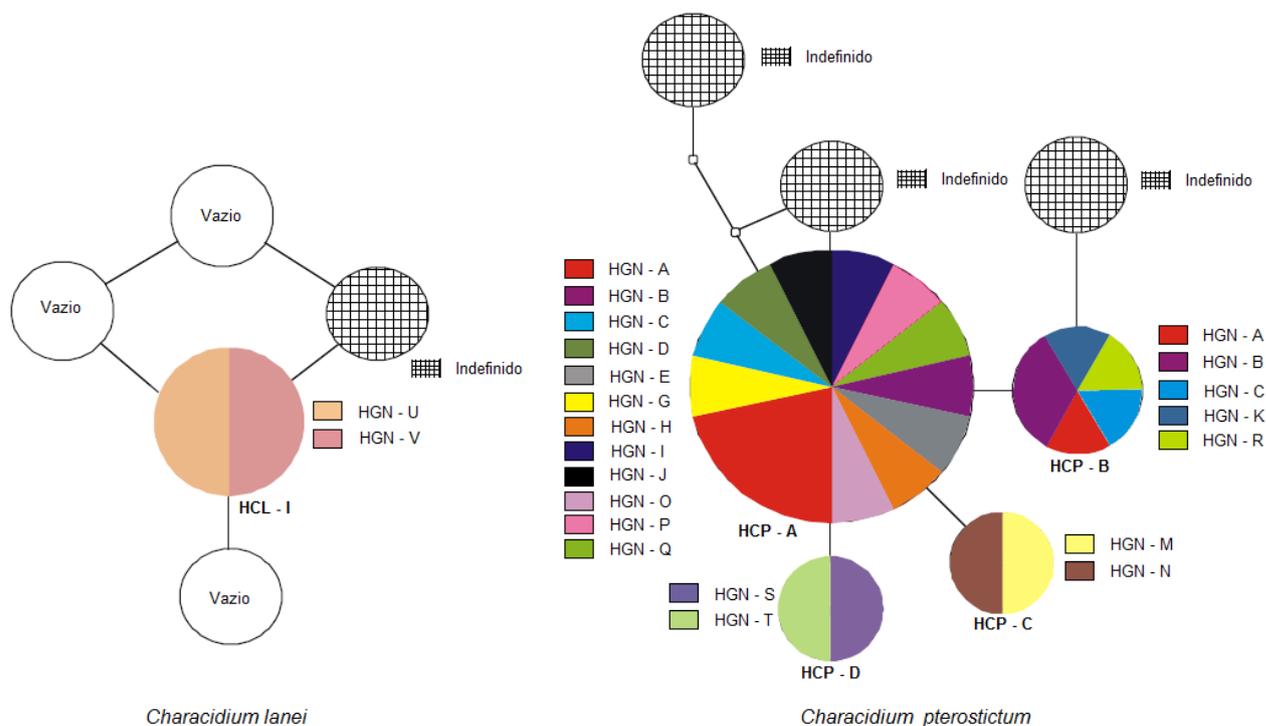


FIGURA 15 - Distribuição dos haplótipos de parasitos na rede de haplótipos de hospedeiros baseada no gene mitocondrial CytB. As cores representam os haplótipos dos parasitos. Os haplótipos rachurados significam que naqueles haplótipos de hospedeiros foram encontrados parasitos, mas estes não foram sequenciados e, portanto, não é possível determinar seus haplótipos. Os haplótipos denominados “vazios” representam hospedeiros onde não foram encontrados parasitos.

O resultado da análise de sinal filogenético pode ser observado na Figura 16. O valor de  $k = 0.253$  ( $p = 0.07$ ) significa baixo sinal filogenético sugerindo que os espécimes de parasitos estão distribuídos de forma aleatória nos haplótipos de hospedeiros. A regressão linear mostrou que a diversidade haplotípica está diretamente relacionada com o tamanho amostral (Figura 17).

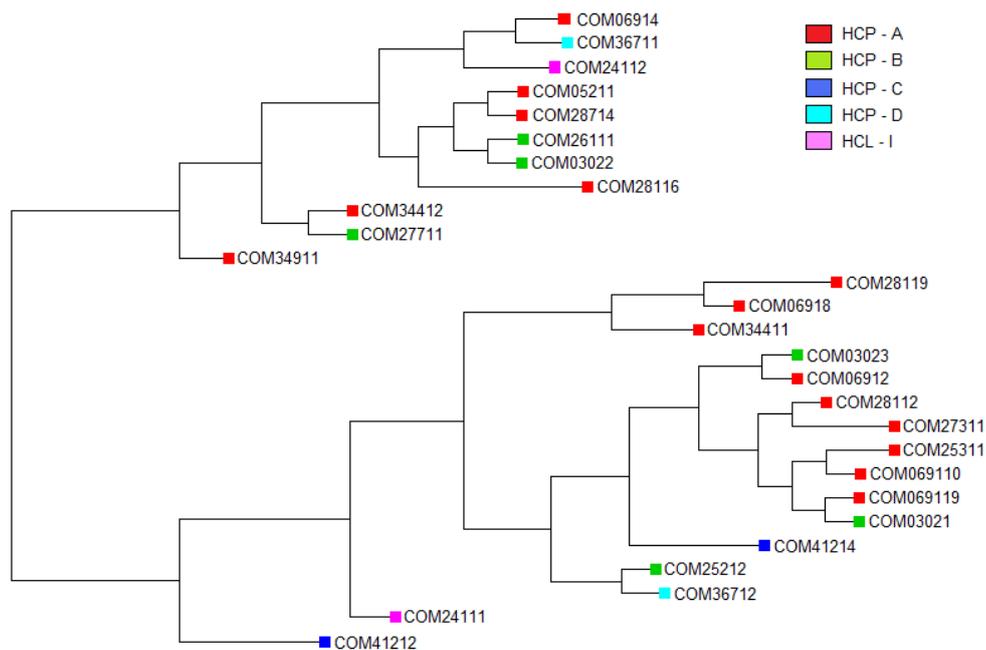


FIGURA 16 - Distribuição dos haplótipos hospedeiros sobre a topologia dos parasitos. Filogenia não enraizada obtida por inferência Bayesiana a partir de sequências de COI dos parasitos. As cores nos terminais representam os haplótipos de hospedeiros.

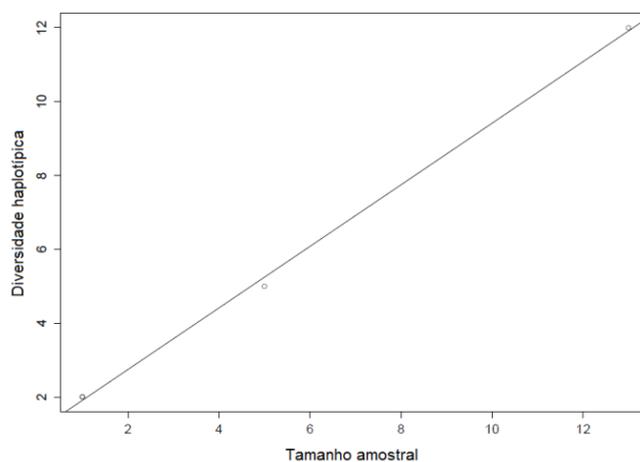


FIGURA 17 - Regressão linear do contraste entre tamanho amostral e diversidade haplotípica dos hospedeiros. O gráfico indica que a diversidade haplotípica está diretamente relacionada com o tamanho amostral. Os pontos representam os quatro haplótipos de hospedeiros avaliados pela regressão.

### 3.5. RECONSTRUÇÃO DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

#### 3.5.1 Hospedeiros

A reconstrução das datas de divergência (TMRCA - tempo até o ancestral comum mais recente) com base nas sequências de CytB de *C. lanei* e *C. pterostictum* sugere que essas espécies divergiram há, aproximadamente, 3.500.000 anos (intervalo de confiança de 95% = 2.750.000–7.000.000 anos) (Figura 18).

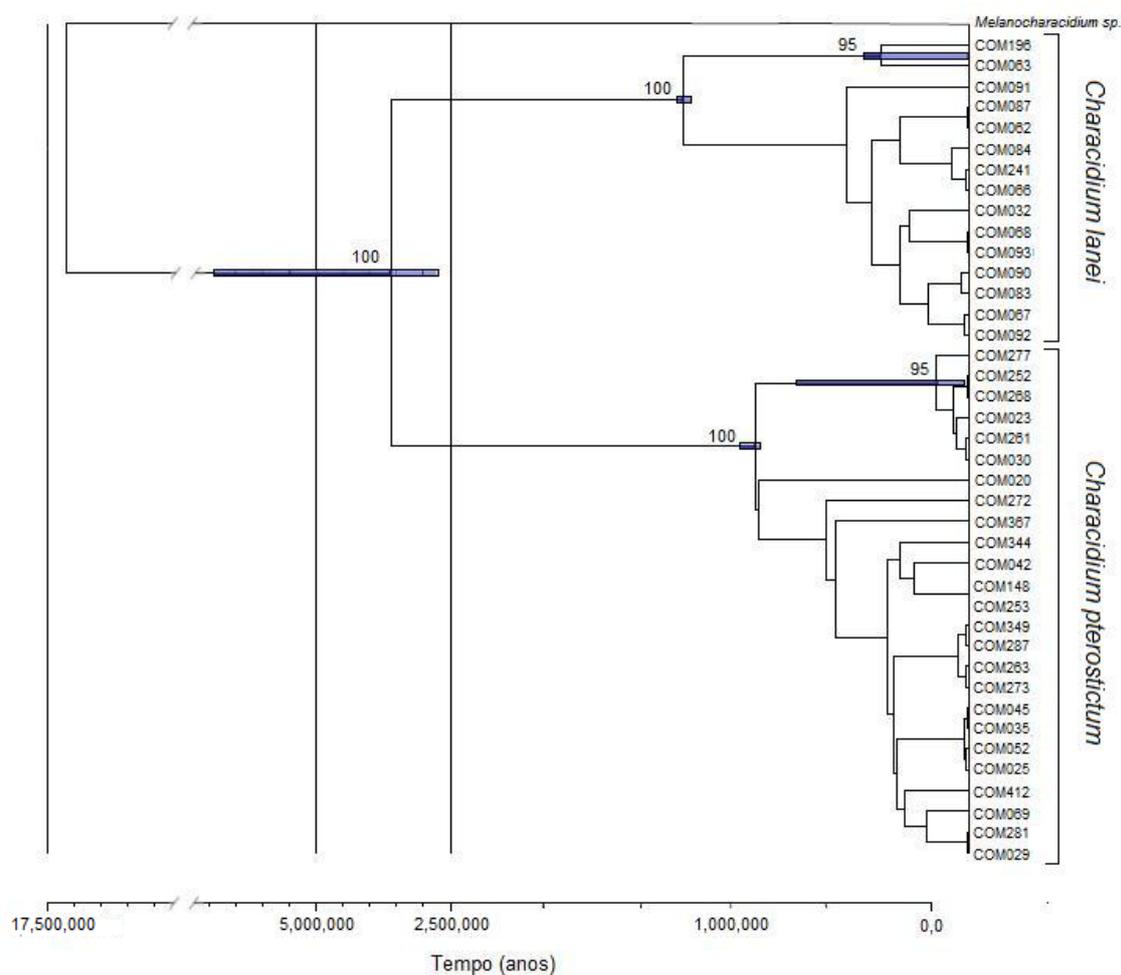


FIGURA 18 - Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada no gene CytB, mostrando o relacionamento filogenético de populações de *Characidium*. Barras horizontais azuis representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade para cada data de divergência obtida pela análise de relógio molecular. São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

A reconstrução da história demográfica para *C. lanei* e *C. pterostictum*, inferida por coalescência Bayesiana pode ser observada na Figura 19 (a) e (b). Esta análise sugere que houve um declínio populacional de *C. lanei* e *C. pterostictum* há, aproximadamente 150.000 anos e uma expansão populacional há, aproximadamente, 40.000 anos (Fig. 19 a, b). A frequência das diferenças pareadas para o gene CytB dos dois hospedeiros corrobora o resultado da coalescência Bayesiana, mostrando que as populações encontram-se em expansão (Fig. 19 c, d).

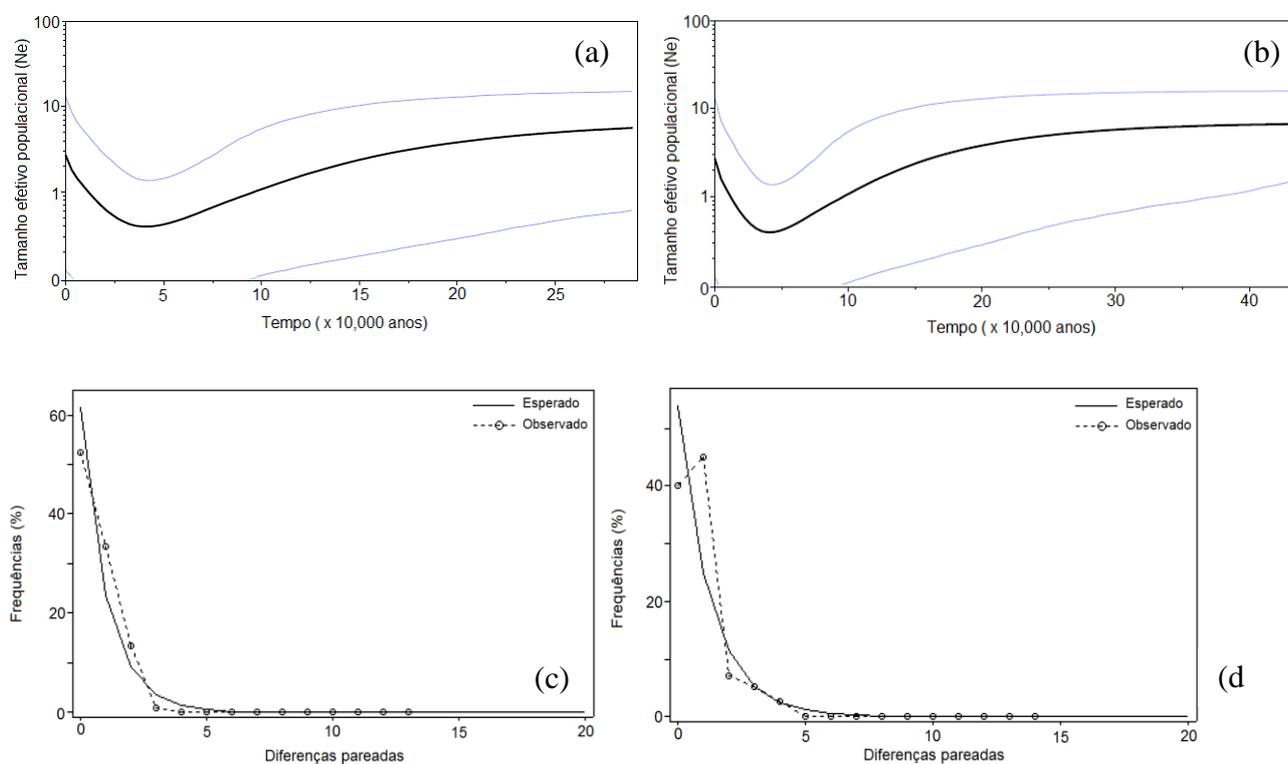


FIGURA 19 - Reconstrução da história demográfica e populações de *Characidium*. Os gráficos (a) e (b) representam a reconstrução bayesiana da história demográfica das populações *C. lanei* (a) e *C. pterostictum* (b). A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio (Ne); as linhas azuis representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade. Os gráficos (c) e (d) representam a frequência das diferenças pareadas para o gene CytB dos hospedeiros *C. lanei* (c) e *C. pterostictum* (d). A linha contínua indica o padrão de expansão populacional esperado para essas sequências e a linha tracejada mostra o padrão observado.

### 3.5.2 Parasitos

A Figura 20 representa a reconstrução das datas de divergência (tempo até o ancestral comum mais recente – TMRCA) para os parasitos, inferida com o programa BEAST com base nas sequências do gene mitocondrial COI.

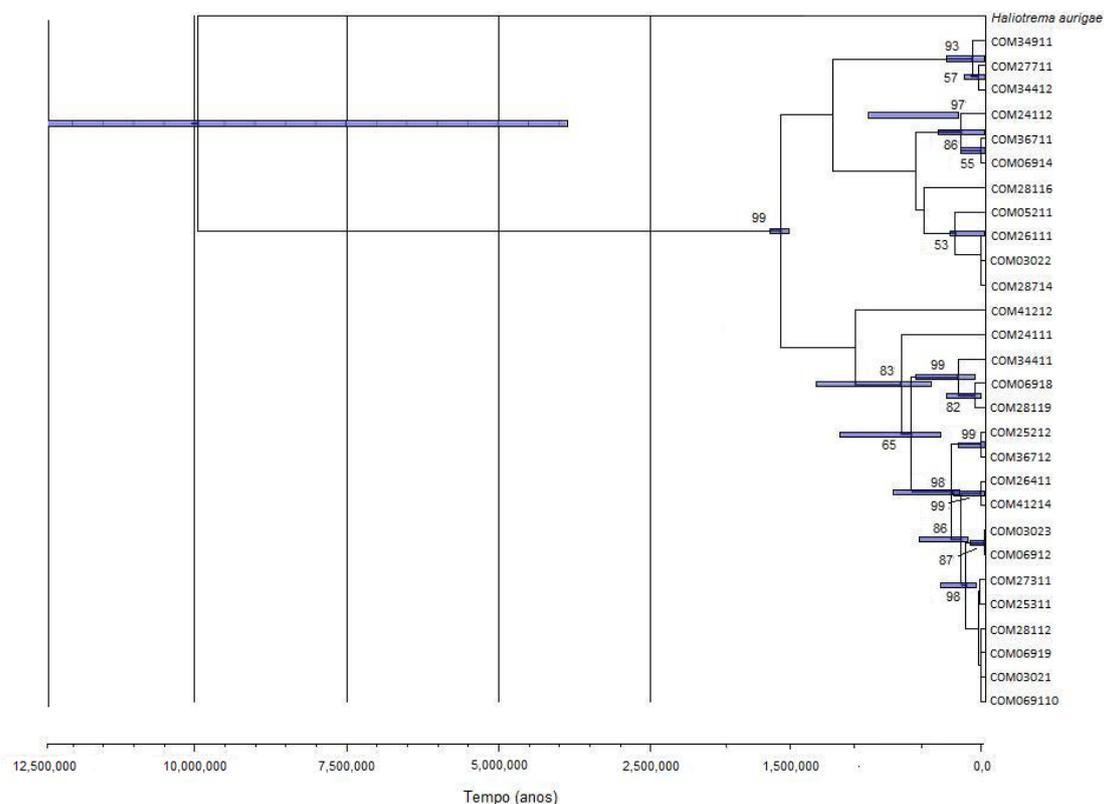


FIGURA 20 - Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada no gene COI, mostrando o relacionamento filogenético dos parasitos deste estudo. Barras horizontais azuis representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade para cada data de divergência obtida pela análise de relógio molecular. São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

O gráfico da reconstrução da história demográfica para os parasitos obtido através da análise de coalescência bayesiana pode ser observado na Figura 21a. Esta análise sugere que a expansão populacional dos parasitos de *C. lanei* e *C. pterostictum* ocorreu na mesma época há, aproximadamente, 50.000 anos. A frequência das diferenças pareadas para o gene COI corrobora o resultado da coalescência bayesiana mostrando, que a suprapopulação de parasitos encontram-se em expansão (Fig. 21b).

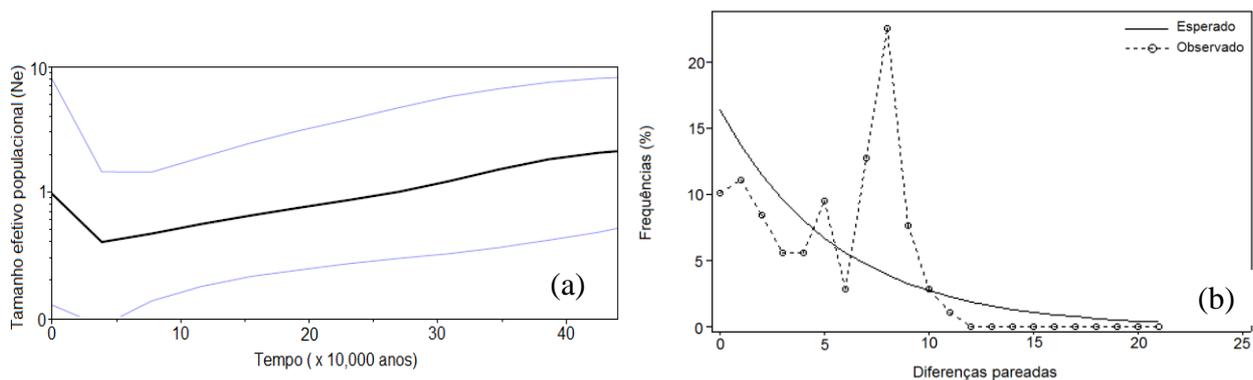


FIGURA 21 - Reconstrução da história demográfica da suprapopulação do Gênero *n. sp. n.*. O gráfico (a) representa a reconstrução bayesiana da história dos parasitos. A linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio ( $N_e$ ); as linhas azuis representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade. O gráfico (b) representa a frequência das diferenças pareadas para o gene COI. A linha contínua indica o padrão de expansão populacional esperado para as sequências e a linha tracejada mostra o padrão observado.

## 4 DISCUSSÃO

Este estudo buscou compreender a estrutura genética de uma suprapopulação de parasitos Dactylogyridae de brânquias em um contexto em que uma única espécie de parasito ocorre em dois hospedeiros sintópicos e filogeneticamente próximos. Ele permitiu, ainda, testar hipóteses propostas para processos de especiação adaptativos e suas causas em Gyrodactylidae, uma vez que estes organismos pertencem à mesma classe mas possuem estratégias de transmissão distintas. Em síntese, o estudo permitiu avaliar se a transmissão contínua (não presente em Dactylogyridae) representa, de fato, uma inovação chave que explica a alta taxa de diversificação observada em Gyrodactylidae.

Tanto dados ecológicos quanto moleculares sugerem que a espécie de parasito, alvo deste estudo, mostra maior associação pela espécie hospedeira *C. pterostictum*. Nessa espécie de hospedeiro, a abundância de parasitos é maior (3,76) do que a observada em *C. lanei* (0,5) e os valores de prevalência e intensidade média de infestação também suportam esta afirmação. A análise dos dados moleculares mostram que Gênero novo sp.n. não apresenta nenhuma evidência de possuir linhagens genéticas especializadas para cada uma das espécies hospedeiras, como sugerido por Bueno-Silva *et al.* (2011) para uma espécie de Gyrodactylidae. Não existem evidências de especialização de haplótipos de parasitos por haplótipos de peixes, como mostrado na análise de coespeciação e também de sinal filogenético. O resultado da análise de reconstrução de caráter ancestral sobre o dendograma de dados de ISSR também indicou que a distribuição dos parasitos em seus hospedeiros foi ao acaso. Portanto, os espécimes de parasitos estão distribuídos de forma aleatória nos haplótipos de hospedeiros, mas apresentam uma evidente associação com *C. pterostictum*. Não existe qualquer evidência de especialização de linhagens de parasitos às linhagens de *C. pterostictum* e a presença de Gênero novo sp. n. sobre *C. lanei* é provavelmente fortuita. Suporte adicional para essas conclusões é dado pelo fato de que apenas *C. lanei* apresenta haplótipos não parasitados (Figura 14).

Os dactilogirídeos produzem ovos dos quais eclodem larvas ciliadas que nadam ativamente em busca de seus hospedeiros. Uma vez sobre um

hospedeiro, a larva, conhecida como oncomiracídio, perde os cílios e desenvolve-se em um jovem animal. Aparentemente, se fixado sobre um hospedeiro inadequado, o parasito morre ou, pelo menos hipoteticamente, sofre pressões fisiológicas e imunológicas negativas que podem causar sua morte ou mesmo reduzir a capacidade de realizar funções biológicas fundamentais (e.g. reprodução). O fato de existirem haplótipos não parasitados de *C. lanei* (ao contrário do que ocorre com *C. pterostictum*) sugere a ocorrência de seleção negativa sobre parasitos que se estabelecem nessa espécie hospedeira.

Portanto, os resultados disponíveis sugerem que a hipótese nula desse estudo deva ser aceita parcialmente. Ao contrário do que ocorre em Gyrodactylidae, a transmissão limitada à fase larval de oncomiracídio não favorece o processo de adaptação divergente de Dactylogyridae em hospedeiros compatíveis sintópicos. Ao contrário do que foi estabelecido na hipótese nula, entretanto, Gênero n. sp. n. estudado aqui, não utiliza as espécies de hospedeiros de forma indiscriminada.

Parasitos que possuem transmissão apenas durante a fase larval localizam seus hospedeiros através de estímulos químicos (KEARN 1967, 1988). Desdevises *et al.* (2002a) acreditam que interações químicas podem ser consideradas determinantes na especificidade por hospedeiro que favorecem um cenário de coadaptação. Estudo recente com *Lamellodiscus* (Monogenoidea, Diplectanidae) mostrou que espécies generalistas estão sob processo de especialização em seus diferentes hospedeiros, o que pode levar à especiação (POISOT E DESDEVISE, 2010).

Ao contrário do que foi observado em *Lamellodiscus*, que depende da transmissão por oncomiracídios, como a espécie desse estudo, e em espécies de *Gyrodactylus*, cujas espécies apresentam transmissão contínua ao longo de sua vida, a espécie estudada não apresentou evidência de especialização divergente em espécies de *Characidium* sintópicas. O cenário observado por vários estudos que buscam compreender a dinâmica das espécies de *Gyrodactylus* (e.g. ZIETARA E LUMME, 2002; BOEGER *et al.*, 2003, 2005; HANSEN *et al.*, 2003; MEINILÄ *et al.*, 2004; BUENO-SILVA *et al.*, 2011a) está representado pela Figura 22a. Em Gyrodactylidae, ao contrário da maioria das espécies de Monogenoidea, a transmissão de parasitos dessa família se dá

através dos estágios pré-adulto e adulto, sendo contínua ao longo de seu ciclo de vida (BOEGER *et al.*, 2003). Assim, um girodactílideo que eventualmente entre em contato com um hospedeiro inadequado, tem a oportunidade de sair desse hospedeiro, podendo, ao final de um ou mais eventos de transmissão, colonizar um hospedeiro com o qual apresente maior compatibilidade (i.e. hospedeiro adequado) (vide Figura 22 a).

Os dois outros cenários (Figura 22 b, c) representam parasitos com larva ciliada (oncomiracídio) no ciclo de vida, como Gênero n. sp. n. O cenário apresentado na Figura 22 b indica uma condição na qual os parasitos exploram os dois hospedeiros de forma indiscriminada, como proposto na hipótese nula desse estudo. Já o cenário indicado na Figura 22 c sugere uma condição na qual as larvas de parasitos adaptados a uma das espécies de hospedeiro podem encontrar um outro hospedeiro compatível (mas não necessariamente adequado) e sofrer as pressões de seleção negativa como descritas acima. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, o padrão descrito pelo cenário da Figura 22 c é o que mais se aproxima das associações estudadas aqui.

A maior aparente afinidade do Gênero novo. sp.n. pela espécie *C. pterostictum* pode ser consequência de um vínculo histórico desse parasito por esse hospedeiro. Esse vínculo pode representar uma história em comum mais antiga, e a baixa afinidade por *C. lanei* pode ter relação com a origem do parasito em *C. pterostictum* refletir eventos de coespeciação ou de especiação seguida por troca de hospedeiro.

A análise da história demográfica das três espécies envolvidas (os dois hospedeiros e o parasito) indica que a diversificação dos hospedeiros (Figura 18) ocorreu há, aproximadamente, 1.000.000 de anos e isso pode estar relacionado com fatores climáticos ou geológicos. Bueno-Silva (2011b) também observou eventos de expansão demográfica em populações de *Scleromystax barbatus* e *S. macropterus* sem bacias do litoral paranaense. O autor discute, baseando-se em estudos (HEWITT, 2000; LECOMTE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006), que mudanças climáticas drásticas durante o Pleistoceno (época entre 10,000 e 1.800.000 anos atrás) podem ter exercido forte influência na distribuição e flutuação demográfica de espécies de peixes em várias regiões do mundo.

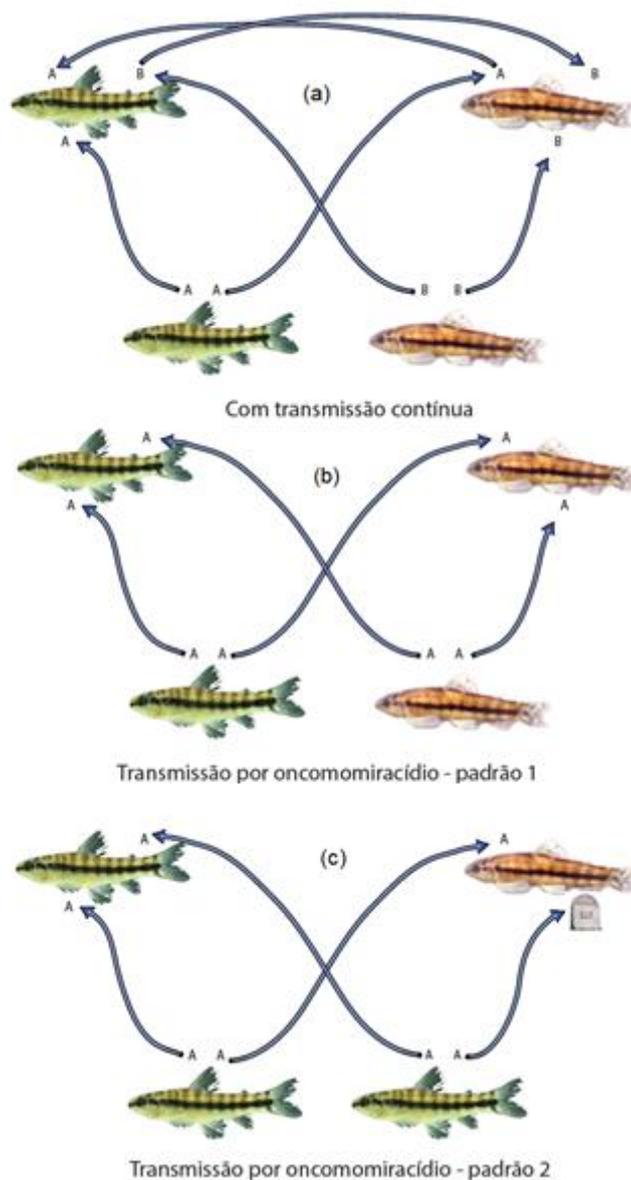


FIGURA 22 - Modelo esquemático dos tipos de transmissão e Monogenoidea. (a) Parasitos com transmissão contínua como é o caso dos Gyrodactylidae vivíparos. Os parasitos exploram os dois hospedeiros sintópicos da mesma maneira e são capazes de realizar troca de hospedeiro, uma vez que não estejam em seus hospedeiros adequados. (b) Padrão 1 esperado para parasitos com larvas ciliadas livre natantes no ciclo de vida. Os parasitos utilizam os hospedeiros sintópicos da mesma maneira, mas ao contrário dos Gyrodactylidae, não são capazes de trocar de hospedeiro uma vez estabelecidos nas brânquias. (c) Padrão 2, observado neste estudo para parasitos com larvas ciliadas livre natantes no ciclo de vida. Os parasitos encontram-se adaptados a apenas uma espécie hospedeira e quando encontram um hospedeiro inadequado, sofrem as pressões de seleção negativa e são eliminados. (A) e (B)

representam conjuntos de linhagens específicas de parasitos por um ou outro hospedeiro, ou ambos.

O litoral do Paraná apresenta evidências de ter sofrido eventos de flutuação no nível do mar relacionados à última era glacial (Figura 23) e esses eventos podem ter exercido grande influência nas populações de peixes das bacias locais. Tanto a suprapopulação de parasitos quanto as populações das duas espécies de peixes começaram a sofrer início de declínio populacional há, aproximadamente, 150.000 anos, provavelmente associado com o início do período glacial. Bueno-Silva (2011b) sugere que retrações e expansões populacionais em *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. estão associadas, respectivamente, com períodos glaciais e interglaciais entre o final do Pleistoceno e parte do Holoceno (entre 5.000–250.000 anos atrás) o que também pode ter ocorrido para os parasitos e hospedeiros deste estudo.

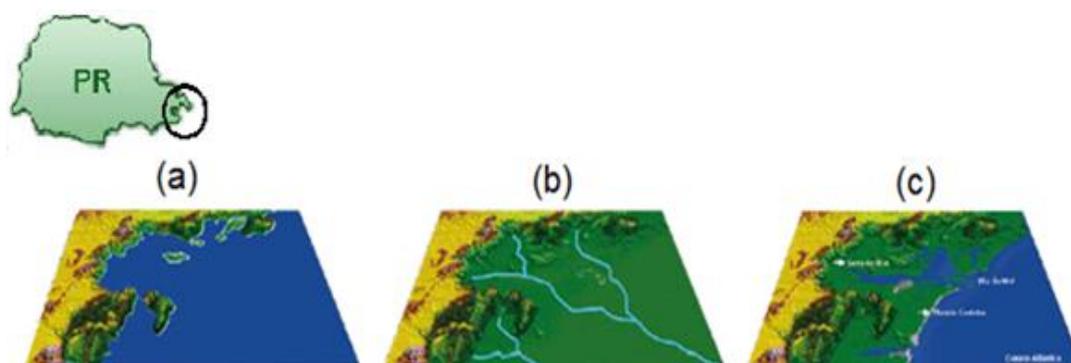


FIGURA 23 - Representação esquemática da variação do nível do mar na costa paranaense nos últimos 120.000 anos. O círculo indica a localização da costa litorânea no mapa do Estado do Paraná. No primeiro período (a), há 120.000 anos, o nível do mar estava 8 metros acima do atual. A planície costeira praticamente não existia e a linha de costa estava localizada quase no sopé da Serra do Mar. A seguir (b) o mar desceu até alcançar um nível de, aproximadamente, 120 metros abaixo do atual há 18.000 anos, máximo do último período glacial, formando extensas planícies costeiras sulcadas por rios. Nesta época alinhada da costa paranaense localizava-se a mais de 100 km a leste da costa atual. Após o pico do último período glacial (c) as geleiras derreteram e o mar subiu rapidamente até alcançar um nível de 3m acima do atual, há cerca de 5.600 anos. Neste período, a linha de costa se localizava entre 2km e 5km mais para o interior em relação à costa atual. Após esse período, o mar desceu até alcançar o nível atual.

FONTE: Projeto "Sítios Geológicos e Paleontológicos do Paraná" MINEROPAR. (Alterado pelo autor)

Os dados de demografia dos parasitos apresentados aqui, quando contrastados com os de Bueno-Silva *et al.* (2011a), chamam a atenção para a diferença nos padrões observados. O autor observou expansão demográfica, sem evidência de gargalo populacional, em parasitos coletados em rios do primeiro planalto paranaense. Por outro lado, o presente estudo e o de Bueno-Silva (2011b) detectaram gargalo populacional seguido de expansão demográfica em diferentes suprapopulações de parasitos de bacias localizadas no litoral, sugerindo que os eventos de flutuação do nível do mar tiveram grande influência na estrutura de populações de peixes e seus parasitos nesses locais.

Concluindo, a espécie de parasito estudada apresenta maior associação pela espécie hospedeira *C. pterostictum*, mas quando se analisa a sua distribuição em haplótipos de hospedeiros, esses parasitos ocorrem aleatoriamente e inclusive podem parasitar (com menor ocorrência) haplótipos de *C. lanei*. Isso sugere que essa associação acontece casualmente e esse parasito provavelmente não possui associação histórica com *C. lanei*.

Assim, padrões na distribuição e estruturação de parasitos Gyrodactylidae e Dactylogyridae e os processos que levaram a esse fim (e.g. diferenças no ciclo de vida e transmissão) diferem de forma significativa. A transmissão contínua parece representar uma inovação chave dos girodactilídeos vivíparos e é suportada pelos dados deste estudo.

## REFERÊNCIAS

ARCHIE, E.A.; LUIKART, G.; EZENWA, V.O. Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, 24, 21–30, 2009.

ARCHIE, E.A.; EZENWA, V.O. Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. **International Journal for Parasitology**. 41, 89–98, 2011.

AVISE, J. C. Philogeography. The history and formation of species. **Cambridge: Harvard University Press**, 447 p., 2000.

BARRETT, L.G.; THRALL, P.H.; BURDON, J.J.; LINDE, C.C. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. **Trends in Ecology and Evolution**. 23, 678–685, 2008.

BAKKE, T. A.; HARRIS, P. D.; CABLE, J. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. **International Journal for Parasitology**, 32: 281-308, 2002.

BAKKE, T.A.; CABLE, J.; HARRIS, P.D. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian Doll-killers”. **Advanced Parasitology**. 64, 161-376, 2007.

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

BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology** 15, 3087–3113, 2006.

BLOMBERG, S.P.; GARLAND, T. JR.; IVES, E. A. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. **Evolution**, **57**(4), 717–745, 2003.

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

BOEGER, W.A.; KRITSKY, D.C.; PIE, M.R.; ENGERS, K.B. Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). **Journal of Parasitology**. **91**(5), 1000-1007, 2005.

BROOKS, D.R.; MCLENNAN, D.A. **Parascript. Parasites and the language of evolution**, Smithsonian Institution Press, 1993.

BUENO-SILVA M.; BOEGER W.A.; PIE M.R. Choice matters: incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). **International Journal for Parasitology** **41**, 657–667, 2011 (a).

BUENO-SILVA, M. **Cofilogeografia: estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (monogenoidea: gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (siluriformes: callichthyidae)**. 169 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011 (b).

BUSH, A. O.; LAFFERTY ,K. D.; LOTZ ,J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**. **83**, 575–583, 1997.

CASU, M.; SANNA, D.; COSSU, P.; LAI, T.; FRANCALACCI, P.; CURINI-GALLETTI, M. Molecular Phylogeography of the microturbellarian *Monocelis lineata* (Platyhelminthes: Proseriata) in the North-East Atlantic. **Biological Journal of the Linnean Society**. **103**, 117-135, 2011.

CLEMENT, M.; POSADA, D. E.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**. **9**(10), 1657-1660, 2000.

CÓRDOVA, L. **Dactylogyridae (Platyhelminthes; Monogeneoidea) de *Serrasalmus maculatus* e *S. spilopleura* (Characiformes, Serrasalminae) na bacia amazônica, sub-bacias Mamoré e Iténez da Bolívia**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CRISCIONE, C.D.; POULIN, R.; BLOUIN, M.S. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. **Molecular Ecology**. **14**, 2247– 2257, 2005.

CRISCIONE, C.D. Parasite co-structure: broad and local scale approaches. **Parasite** **15**, 439–443, 2008.

CRISCIONE, C.D.; ANDERSON, J.D.; SUDIMACK, D.; SUBEDI, J.; UPADHAYAY, R.P.; JHA, B.; WILLIAMS, K.D.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; ANDERSON, T.J.C. Landscape genetics reveals focal transmission of a human macroparasite. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. **4**, p. 665., 2010.

DESDEVISES, Y.; MORAND, S.; JOUSSON, O.; LEGENDRE, P. Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. **56**, n. 12, p. 2459-71, 2002 (a).

DESDEVISES, Y.; MORAND, S.; LEGENDRE, P. Evolution and determinants of host specificity in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. **77**, n. 4, p. 431-443, 2002 (b).

DRUMMOND, A.J.; ASHTON B.; BUXTON S.; CHEUNG M.; COOPER A.; DURAN C.; FIELD M.; HELED J.; KEARSE M.; MARKOWITZ S.; MOIR R.;

STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; THIERER, T.; WILSON, A. Geneious v5.4, 2011. Disponível em <http://www.geneious.com>

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. "Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7" **Molecular Biology And Evolution** "in press".

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**. **32**, 1792-1797, 2004.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. **1**, 47–50, 2005.

GLENNON, V.; PERKINS, E.M.; CHISHOLM, L.A.; WHITTINGTON, I.D. Comparative phylogeography reveals host generalists, specialists and cryptic diversity: Hexabothriid, microbothriid and monocotylid monogeneans from rhinobatid rays in southern Australia. **International Journal for Parasitology**. **38**, 1599-1692, 2008.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST – Paleontological Statistics. Versão 2.09, 2001. Disponível em: [folk.uio.no/ohammer/past/](http://folk.uio.no/ohammer/past/).

HANSEN, H.; BACHMANN, L.; BAKKE, T. A. Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp.(Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling and rainbow trout in Norway and Sweden. **International Journal for Parasitology**. **33**, 1471–1478, 2003.

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

KACI-CHAOUCH, T.; VERNEAU, O.; DESDEVISES, Y. Host specificity is linked to intraspecific variability in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). **Parasitology**, v. **135**, n. 5, p. 607-16, 2008.

KEARN, G. C. Experiments on host-finding and host-specificity in the monogenean skin parasite *Entobdella soleae*. **Parasitology**. **57**, 585–605, 1967.

KEARN, G. C. The monogenean skin parasite *Entobdella soleae*: movement of adults and juveniles from host to host (*Solea solea*). **International Journal for Parasitology** **18**, 313–319, 1988.

KEMBEL, S.W.; COWAN, P.D.; HELMUS, M.R.; CORNWELL, W.K.; MORLON, H.; ACKERLY, D.D.; BLOMBERG, S.P.; WEBB, C.O. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. **Bioinformatics**. **26**, 1463-1464. 2010.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A.; JÉGU, M. Neotropical Monogenoidea. 29. Ancyrocephalinae (Dactylogyridae) of Piranha and Their Relatives (Teleostei, Serrasalminae) from Brazil: Species of *Amphitecium* Boeger e Kritsky, 1988, *Heterothecium* gen. n. and *Pithanothecium* gen. n. **Journal of Helminthology**. **64**, 25 – 54, 1997.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A.; JÉGU, M. Neotropical Monogenoidea. 31. Ancyrocephalinae (Dactylogyridae) of Piranha and Their Relatives (Teleostei, Serrasalminae) from Brazil: Species of *Notothecium* Boeger e Kritsky, 1988, e *Enallothecium* gen. n. **Journal of Helminthology**. **65**, 31 – 49, 1998.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. **25**, 1451-1452. 2009.

LÓPEZ, S. Parasitized female guppies do not prefer showy males. **Animal Behaviour**, **57**, 1129-1134, 1999.

MADDISON, W. P. Calculating the probability distributions of ancestral states reconstructed by parsimony on phylogenetic trees. **Systematic Biology**. **44**, 474-481, 1995.

MADDISON, W.P. E MADDISON, D.R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.6, 2009. Disponível em <http://mesquiteproject.org>.

MEINILÄ, M.; KUUSELA, J. ZIETARA, M.; LUMME, J. Primers for amplifying 820 bp highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. **Hereditas**. **137**, 72–74, 2002.

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

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, New Orleans, LA, 1 – 8, 2010.

MIZELLE, J. D.; KRITSKY, D. C.; CRANE, J. W. Studies on Monogenetic Trematodes. XXXVIII. Ancyrocephalinae from South America with the Proposal of *Jainus* gen. n. **American Midland Naturalist**. **80**, 186-198, 1968.

MLADINEO, I.; MARSIC-LUCIC, J. Host switch of *Lamellodiscus elegans* (Monogenea: Monopisthocotylea) and *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) between cage-reared sparids. **Veterinary research communications**. **31**, 153-60, 2007.

NADLER, S.A. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. **Journal of Parasitology**. **81**, 395–403, 1995.

OLIVEIRA, R.N. **Testando a extensão da troca contínua de hospedeiros em *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidae, Monogenoidea, Platyhelminthes) utilizando marcadores moleculares ISSR**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ORNELAS-GARCÍA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, E. I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**. **8**, 340, 2008.

PAGE, R. D. M. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms and areas. **Systematic Biology** **43**, 58–77, 1994 (a).

PALUMBI, S. R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In **Molecular Systematics** (ed. D. M. Hillis, C. Moritz B. K. Mable), pp. 205-247. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **19**, 468–478, 2001.

POISOT, T.; DESDEVISES, Y. Putative speciation events in *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) assessed by a morphometric approach. **Biological Journal of the Linnean Society** **99**, 559–569, 2010.

POPAZOGLO, F.; BOEGER, W. A. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbis* (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 Parasitologica**, **47**, 105-110, 2000.

POULIN, R. The evolution of monogenean diversity. **International Journal of Parasitology**. **32**, 245–254, 2002.

POSADA D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**. **25**, 1253 – 1256, 2008.

RICHARDS, G. R.; CHUBB, J. C. Longer-term population of *Gyrodactylus bullatarudis* and *G. turnbulli* (Monogenea) on adult guppies (*Poecilia reticulata*) in 50-l experimental arenas. **Parasitology Research**, **84**, 753-756, 1998.

SOLENG, A.; JANSEN, P. A.; BAKKE, T. A. Transmission of the monogenean *Gyrodactylus salaris*. **Folia Parasitologica**. **46**, 179-184, 1999.

STOLTZE, K.; BUCHMANN, K. Effect of *Gyrodactylus derjavini* infections on cortisol production in rainbow trout fry. **Journal of Helminthology**. **75**, 291-294, 2001.

WHITEHEAD, P.J.P.; BAUCHOT, M.L.; HUREAU, J.C.; NIELSEN, J.; TORTONESE, E. Checklist of the fishes of the North- Eastern Atlantic and of the Mediterranean, Vol. III. Paris: UNESCO, 1986.

WILLIAMS, B.D.; SCHRANK, B.; HUYNH, C.; SHOWNKEEN, R.; WATERSTON, R.H. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. **Genetics**. **131**, 609-624, 1994.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**. **7**, 1107-1125 1998.

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

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