

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS
CONTINENTAIS

GEZA THAIS RANGEL E SOUZA

**Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos
diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais**

Maringá
2014

GEZA THAIS RANGEL E SOUZA

**Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos
diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Dr. Ricardo Massato Takemoto

Maringá
2014

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

S729d

Souza, Geza Thais Rangel e, 1977-

Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais / Geza Thais Rangel e Souza. -- Maringá, 2014.

103 f. : il. (algumas color.).

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2014.

Orientador: Dr. Ricardo Massato Takemoto.

1. Diplostomoidea (Digenea) "diplostomídeo" - Caracterização genética - América do Sul. 2. Parasitos diplostomídeos - Metapopulações - Peixes de água doce - América do Sul. 3. Peixes de água doce - Parasitismo. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -592.48135098
NBR/CIP - 12899 AACR/2

GEZA THAIS RANGEL E SOUZA

Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Dr. Ricardo Massato Takemoto
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Figueiredo Lacerda
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof.^a Dr.^a Cláudia Moura Melo
Universidade Tiradentes (UNIT)

Prof.^a Dr.^a Marion Haruko Machado
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2014.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Diante do término da tese de doutoramento não poderia deixar de registrar meus sinceros agradecimentos àqueles que contribuíram de forma ímpar para a realização deste trabalho.

À Deus, em primeiro lugar, por lapidar minha vida pessoal e profissional, seja dada toda honra e toda a glória.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Massato Takemoto pela amizade, paciência, valerosos ensinamentos e por encarar comigo este novo desafio.

Aos meus primeiros orientadores, Prof.^a Dr.^a Marion Haruko Machado e Prof. Dr. Gilberto Cezar Pavanelli por iniciarem e moldarem meus conhecimentos na parasitologia.

Aos amigos de todas as horas, que riram e choraram comigo em momentos inusitados e diversos, me fortalecendo, questionando, empurrando e puxando, em um contínuo aprendizado sobre as relações humanas: Antônio, Eliane, Guilherme, Ivanete e Thamy.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Ictioparasitologia do Nupélia, responsáveis por criar um ambiente de convívio alegre em meio a tantas horas de trabalho: Ana Paula, Ana Paula (Brisa), Eloisa, Fabrício, Flávia, Janaína, Letícia, Michelle e Priscila.

Em especial, a Maria de los Angeles Perez Lizama, pela disposição e pronto auxílio, Bruno Ueda, pelas diversas ajudas tecnológicas e Rodrigo Graça, pelo companheirismo nas análises moleculares.

À secretária geral Sra. Aldenir Cruz Oliveira e à secretária Sra. Jocemara Celestino dos Santos, pela atenção dedicada aos assuntos burocráticos durante o curso.

À coordenadora da Biblioteca Setorial do Nupélia Sra. Maria Salete Ribelatto Arita e ao bibliotecário Sr. João Fábio Hildebrandt, por orientarem e facilitarem muito as pesquisas dentro da biblioteca e além.

Aos pesquisadores que ofereceram seu apoio durante as coletas realizadas nas diversas localidades, Jorge Manuel Carligos Cardenas (Peru), Patrícia Oliveira Maciel (Tocantins) e Silvina Beatriz Chemes (Argentina).

Aos professores Dr. David Marcogliese e Dr. J. Daniel McLaughlin e aos membros de seus grupos de pesquisa no Environment Canada e Concordia University, Canadá, por tornarem minha estadia mais suave e por contribuírem para a realização do trabalho durante os meses de estágio nestas instituições.

Ao Prof. Dr. Alberto Prioli pelos ensinamentos em Biologia Molecular e no uso do programa Arlequin 3.5.

À Dr.^a Cláudia Moura Melo pelo auxílio nos primeiros passos em Biologia Molecular.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado e da Bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) (processo nº 13741-12-8).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto que possibilitou o desenvolvimento do trabalho (processo nº 480180/2011-3).

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) pelo apoio logístico e facilidades concedidas durante todo o desenvolvimento do trabalho, incluindo aqui todos os docentes, técnicos, pescadores e colegas de campo.

Ao IBAMA pela concessão da licença de pesca e de captura de aves.

Aos meus pais e família pelo amor e apoio incondicionais.

A todos o meu profundo agradecimento.

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."

Albert Einstein

Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais

RESUMO

Espécies de Diplostomoidea (Digenea) são relatadas como sendo cosmopolitas. Entretanto, suas reais diversidade e especificidade podem estar mascaradas por classificações incorretas na identificação taxonômica. O gene COX1 foi utilizado como ferramenta para a discriminação das espécies destes parasitos com o objetivo de avaliar a diversidade de diplostomídeos presentes nos olhos dos peixes, distribuídos em quatro ordens (Characiformes, Gymnotiformes, Perciformes e Siluriformes), na planície de inundação do alto rio Paraná. Testou-se a hipótese de especificidade ao hospedeiro, predizendo-se de que a maioria das espécies encontrada teria distribuição específica para o peixe hospedeiro e o sítio de infecção explorado (micro-habitat). Seis espécies foram caracterizadas molecularmente e demonstraram especificidade ao hospedeiro, com nítida partição de nicho quanto à distribuição dos parasitos entre os hospedeiros, onde as espécies encontradas explorando o humor vítreo não ocorrem concomitantemente nas espécies de peixes. Concluiu-se que as metacercárias são específicas ao recurso explorado (espécie de hospedeiro e micro-habitat) e que existem espécies crípticas na área. Além disso, a adaptação local da população de *Austrodiplostomum ostrowskiae* foi analisada em cinco ambientes na América do Sul, sendo dois na Bacia Amazonas (Iquitos, Peru e Manaus, Brasil), dois na Bacia Paraná (Porto Rico, Brasil e Santa Fé, Argentina) e um ambiente de cultivo (Palmas, Tocantins). Uma espécie amplamente distribuída nos peixes da América do Sul, *Austrodiplostomum ostrowskiae*, foi utilizada para testar a hipótese de adaptação local, analisando a existência de fluxo gênico dos parasitos entre diferentes hospedeiros presentes em cinco ambientes (dois na Bacia Amazonas: Iquitos, Peru e Manaus, Brasil; dois na Bacia Paraná: Porto Rico, Brasil e Santa Fé, Argentina; e um ambiente de cultivo: Palmas, Tocantins). A estrutura genética populacional de *A. ostrowskiae* foi avaliada, em escala regional e continental, por meio de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA). Não houve estruturação genética, uma vez que as mutações presentes na região COX1 estavam aleatoriamente distribuídas entre os hospedeiros e os locais analisados, provavelmente pelo baixo tempo evolutivo destas alterações. Além disso, características do ciclo de vida alogênico e a migração dos hospedeiros definitivos podem estar influenciando nesta distribuição. As associações parasito-hospedeiro parecem ser recentes (baixo tempo evolutivo), o que pode ser demonstrado pela alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, distribuídas entre as subpopulações amostradas. As subpopulações de parasitos amostrados nas bacias hidrográficas estudadas correspondem a uma única metapopulação, de distribuição continental.

Palavras chave: Diplostomoidea. América do Sul. Peixes dulcícolas. COX1. *Host Switch*. *Ecological Fitting*. Metapopulação.

Diversity, specificity and populational genetic structure of diplostomoid parasites from the neotropical freshwater fishes

ABSTRACT

Diplostomoidea species are related as cosmopolitan, however their real diversity and specificity may be covered by identification mistakes. The CO1 gene was used to identify the parasite species, aiming to analyze the diversity of the diplostomoid found on the fish's eyes and to examine the population local adaptation of *Austrodiplostomum ostrowskiae* on South America. It was tested the host specificity hypothesis, predicting that most of the species observed would present a strong specific distribution to the fish host and to the micro-habitat explored was tested. Six species were molecularly characterized and they demonstrated specificity to the host, to the explored resource or to both of them. The parasite distribution among the studied hosts demonstrated a niche partition between the specialist species on the vitreous humor resources, not occurring co-occurring on the same niche. It was concluded that the metacercariae are specific to the explored resource, that there are cryptic species on the area and that ecological factors may direct the host switch in some parasite groups. A parasite species widely distributed on fishes from South America was used to test the local adaptation hypothesis, analyzing the existence of the parasite gene flux between different hosts of these areas. The population genetic structure of *A. ostrowskiae* was evaluated, on regional and continental scale, by a Molecular Variance Analysis (AMOVA). There was not a genetic structure, especially due to the allogenic life cycle particularities and to the migration of the definitive hosts. The host-parasite interactions appear to be recent (with low evolutionary time), which can be demonstrated by high haplotype diversity and low nucleotide diversity, distributed among subpopulations. The parasites subpopulations sampled on the studied hydrographic basins correspond to a single metapopulation, of continental distribution.

Keywords: Diplostomoidea. South America. COX1. Freshwater Fishes. Host Switch. Ecological Fitting. Metapopulation.

A tese posteriormente será transformada em artigos e submetidos às publicações científicas nos seguintes periódicos: *International Journal for Parasitology* (Normas disponíveis em: <http://www.elsevier.com/journals/international-journal-for-parasitology/00207519/guide-for-authors#25000>) e *Proceedings of the Royal Society of London B* (Normas disponíveis em: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/site/misc/preparing-article.xhtml>), respectivamente. Introdução e Considerações Finais foram incorporadas ao texto a fim de torná-lo mais coesivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	22
2 DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE DE METACERCÁRIAS DE DIPLOSTOMIDAE EM PEIXES DE UMA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO NEOTROPICAL REVELADO PELO DNA <i>BARCODES</i>	29
RESUMO.....	29
<i>ABSTRACT</i>.....	30
2.1 INTRODUÇÃO.....	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.3 RESULTADOS	39
2.4 DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	59
3 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO DE <i>AUSTRODIPLOSTOMUM OSTROWSKIAE</i> DRONEN, 2009 (DIGENEA: DIPLOSTOMIDAE) EM DIFERENTES ESCALAS GEOGRÁFICAS.....	68
RESUMO.....	68
<i>ABSTRACT</i>.....	69
3.1 INTRODUÇÃO.....	70
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.3 RESULTADOS	77
3.4 DISCUSSÃO	88
REFERÊNCIAS	94
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
GLOSSÁRIO.....	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região Neotropical apresenta alta diversidade de espécies animais e vegetais, propiciada pela grande variedade de microclimas e pela conseqüente formação dos mais variados habitats. O Brasil é o maior país desta região e tem uma fauna de peixes de água doce extremamente diversificada. Segundo Levêque et al. (2008) somente em relação aos peixes dulcícolas, este apresenta mais de 4.000 espécies descritas (31% da diversidade mundial), sendo que, aproximadamente, 2.590 espécies foram registradas somente em território brasileiro (BUCKUP; MENEZES; GHASSI, 2007).

Os peixes de águas interiores são um importante recurso natural, devido, em especial, à sua comercialização e utilização como recurso alimentar (SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2006). Apesar desta alta gama de possíveis hospedeiros, os estudos parasitológicos incluem somente uma pequena porção desta diversidade íctica (EIRAS et al., 2011).

Os parasitos são extremamente importantes para a dinâmica das comunidades parasitárias. Minchella e Scott (1991) ressaltam a importância destes organismos dentro do sistema:

“Parasitos são onipresentes, apesar de muitas vezes invisíveis. Eles se movem pela teia trófica e podem formar grande parte da biomassa dos indivíduos hospedeiros; eles impõem demandas energéticas a seus hospedeiros, alteram seu comportamento, frequentemente aumentam sua taxa de mortalidade e diminuem sua taxa de natalidade; eles afetam seu estado nutricional e seu crescimento e têm se mostrado capazes de alterar o resultado da competição intra e interespecífica; eles podem aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à predação, influenciar na sua escolha do parceiro e aumentar a proporção entre os sexos na população. Em outras palavras, há uma miríade de formas pelas quais os parasitos influenciam a dinâmica da população de hospedeiros. Por extrapolação direta, eles devem influenciar a abundância e diversidade de organismos no ambiente” (MINCHELLA; SCOTT, 1991, p. 250).

Portanto, os parasitos normalmente atuam em seus hospedeiros com um “duplo sentido”, modificando o comportamento ou a forma do hospedeiro intermediário (presa) tornando a predação mais fácil e incrementando a transmissão do parasito ao próximo hospedeiro (POULIN, 2007). Esta estratégia é viável aos participantes da interação já que propicia a continuidade do ciclo de vida do parasito e ocasiona uma economia energética na captura de presas (quando infectadas tornam-se suscetíveis à predação) pelo hospedeiro (predador), sendo o incremento energético no hospedeiro definitivo maior que o custo do parasitismo (LAFFERTY, 1992; LAFFERTY; MORRIS, 1996).

Os altos índices de infecção parasitária encontrados em peixes se devem às peculiaridades do meio aquático, que facilitam a propagação, reprodução e complementação do ciclo de vida dos parasitos, sendo de relevante importância para sua sobrevivência (MALTA, 1984). Apesar da alta diversidade de parasitos com potencial patogênico, em ambientes naturais, os peixes raramente demonstram sinais clínicos evidentes (BACHMANN et al., 2012), entretanto, isto pode ser uma consequência da predação dos indivíduos mais debilitados.

Entre os metazoários parasitos mais comuns em peixes encontram-se os digenéticos, com aproximadamente 24.000 espécies, muitas das quais ainda não descritas (POULIN; MORAND, 2004). Estes são parasitos do Filo Platyhelminthes que se caracterizam por possuir ciclo de vida bastante complexo, tendo, no mínimo, dois hospedeiros, o intermediário, onde ocorrem as fases larvais e a reprodução assexuada, e o definitivo, no qual se encontram os adultos que realizam reprodução sexuada. Os primeiros hospedeiros intermediários são representados, quase sempre, por moluscos, os segundos podem ser anfíbios e peixes, e o definitivo pode ser um peixe ou uma ave piscívoros (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002). Geralmente, os digenéticos apresentam

especificidade por determinados tecidos em seus hospedeiros, sendo que alguns podem ocorrer em uma única espécie de hospedeiro ou espécies próximas (mesmo Gênero ou Família) (especialistas) ou possuir uma ampla gama de hospedeiros, que podem inclusive pertencer a táxons filogeneticamente distantes (generalistas) (EIRAS et al., 2011).

Entre os digenéticos mais comuns, elencam-se os pertencentes à Superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886, denominados comumente de diplostomídeos. Metacercárias de Diplostomidae parasitam peixes de água doce, em especial tecidos nervosos (olhos e cérebro), e apresentam problemas na identificação específica, em especial devido ao pequeno número de caracteres morfológicos.

As espécies desta família têm distribuição cosmopolita, sendo registradas em peixes na Ásia, Europa, África, América do Norte e América do Sul (NIEWIADOMSKA, 1996; CHIBWANA; NKWENGULILA, 2010). Nesta fase de desenvolvimento, estes parasitos são conhecidos como *eye flukes* (vermes do olho) e infectam várias regiões dos olhos de peixes, tais como retina, cristalino (lentes) e humor vítreo e aquoso (NIEWIADOMSKA, 1996) (Fig. 01), podendo ser encontrados em diferentes intensidades de infecção devido ao efeito cumulativo ocasionado pela idade (MARCOGLIESE; COMPAGNA, 1999). Algumas espécies deste grupo demonstram uma crescente ampliação na gama de hospedeiros utilizados, indicando baixa especificidade (YAMADA et al., 2008) e alta abundância (MACHADO; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2005) em algumas regiões brasileiras.

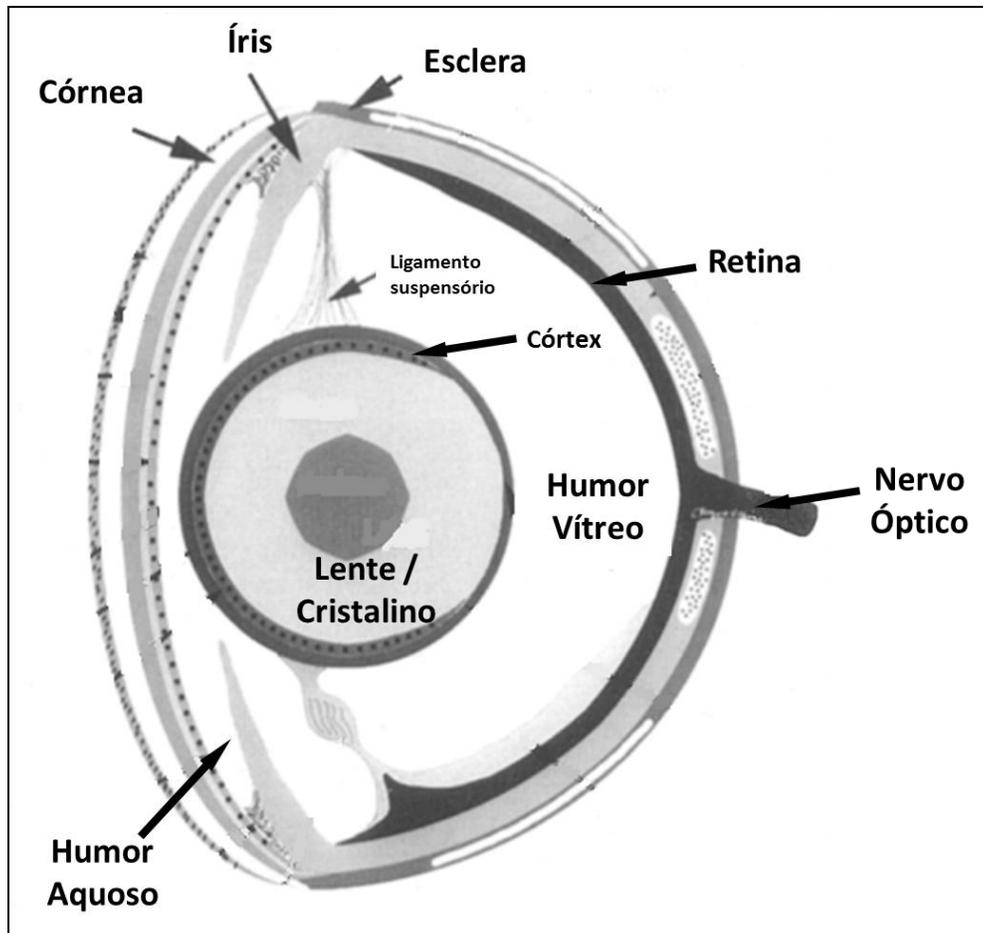


Figura 01 – Corte transversal de olho de peixes e as regiões analisadas quanto à presença de metacercárias de diplostomídeos. Adaptado de http://www.katembe.com.pt/visao_dos_peixes.pdf pelos autores.

Uma espécie em especial, *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (= *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum*) (Digenea: Diplostomidae) teve sua baixa especificidade ressaltada por Takemoto et al. (2009), que registraram nove espécies de peixes na planície de inundação do alto rio Paraná como hospedeiros: *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794), *Satanoperca pappaterra* (Heckel, 1840), *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), *Creniclichia britskii* Kullander, 1982, *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006, *Cichlasoma paranaense* Kullander, 1983, *Hypostomus regani* (Ihering, 1905), *Schizodon borellii* (Boulenger, 1900) e *Auchenipterus osteomystax*

(Miranda-Ribeiro, 1918). Entretanto, a identificação das formas larvais de *Austrodiplostomum* ainda é obscura, principalmente na América do Sul (GALAZZO et al. 2002; NIEWIADOMSKA 2005). Em um estudo recente sobre diversidade de metacercárias desta Família em peixes do Canadá, Locke et al. (2010a) distinguiram 12 espécies morfológicamente similares com a utilização de ferramentas moleculares, isto é, o que antes era considerado um parasito generalista (capaz de infectar alta gama de hospedeiros) passou a ser um conjunto de espécies crípticas especialistas. A mesma diversidade críptica pode estar ocorrendo com *Austrodiplostomum* nas bacias hidrográficas da América do Sul.

A existência de espécies crípticas ocorre devido à alta similaridade morfológica e parece ser amplamente distribuída entre os metazoários e as regiões geográficas (PFENNINGER; SCHWENK, 2007). Segundo Bickford et al. (2007), estas podem ser definidas como sendo duas ou mais linhagens distintas que são classificadas como uma única espécie, devido a falta de diferenças morfológicas marcantes. Quando reveladas, estes complexos de espécies podem ampliar a visão científica a respeito da biodiversidade e biogeografia, do ciclo de vida, da teoria evolutiva e das interações ecológicas (BICKFORD et al., 2007).

O reconhecimento de espécies crípticas permite uma estimativa mais precisa sobre a diversidade dos parasitos, um indicador biológico da riqueza de espécies em comunidades de hospedeiros de vida livre (HUDSON; DOBSON; LAFFERTY, 2006), inclusive naquelas que utilizam o mesmo nicho, tanto em termos de sítio de infecção quanto em recurso utilizado.

A necessidade de uma correta identificação específica destes parasitos é urgente, uma vez que a patogenia, o monitoramento e as medidas de controle podem variar entre as espécies (CHAPPELL, 1995). Além disso, a correta identificação é importante em estudos

que lidam com suscetibilidade e resistência (KARVONEN et al., 2004 a, b; 2005), infectividade (VOUTILAINEN; TASKINEN, 2009), manipulação dos hospedeiros (RINTAMÄKI-KINNUNEN et al., 2004; SEPPÄLÄ; KARVONEN; VALTONEN, 2005 a, b; 2006), genética populacional (RAUCH; KALBE; REUSCH, 2005) e biologia evolutiva (RAUCH; KALBE; REUSCH, 2006; 2008), especialmente quando múltiplas espécies, crípticas ou não, podem infectar um único sítio dentro de um único hospedeiro.

A identificação das espécies de diplostomídeos é difícil em todos os estágios de seu ciclo de vida, mas, principalmente, para metacercárias (NIEWIADOMSKA; SZYMANSKI, 1991; NIEWIADOMSKA; NIEWIADOMSKA-BUGAJ, 1995). A morfologia *per se* varia com a idade e a espécie de hospedeiro e não é capaz de discriminar as espécies (GRACZYK, 1992). Como consequência direta da variabilidade morfológica, inúmeros registros anteriores de diferentes espécies de diplostomídeos em peixes estão baseados em identificações incorretas (NIEWIADOMSKA, 1996). Estes fatos enfatizam a importância dos estudos sobre a identificação específica e a ocorrência destes parasitos em seus organismos hospedeiros.

Segundo Locke, McLaughlin e Marcogliese (2010 b), a identificação (ou discriminação) específica das metacercárias de diplostomídeos não pode ser realizada baseada somente na morfologia. Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular torna-se imprescindível para a correta separação e conexão entre as fases do ciclo de vida, metacercárias e adultos, observadas em vários organismos hospedeiros.

Dados moleculares têm sido utilizados como alternativa para a identificação de espécies (LOCKE et al., 2010 a, b). Ao contrário da morfologia, as sequências de DNA podem ser utilizadas para identificar espécies em todos os estágios de desenvolvimento,

uma grande vantagem para estudar parasitos com ciclos de vida complexos (CRISCIONE; POULIN; BLOUIN, 2005).

Genes mitocondriais têm sido utilizados para facilitar as análises moleculares das relações filogenéticas entre diferentes espécies e com variação genética (intra e interespecífica) de parasitos (LAWTON et al., 2011). As sequências da região do gene do citocromo oxidase I (COX1) do DNA mitocondrial de trematódeos, por serem mais variáveis do que regiões de marcadores nucleares (região do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal - ITS), podem fornecer um maior número de marcadores úteis para identificação específica (VILAS; CRISCIONE; BLOUIN, 2005). O primeiro fragmento do gene COX1, com 650 pares de bases (pb), tem sido amplamente utilizado como um DNA *Barcodes* (código de barras), uma abordagem que tem se provado útil para discriminar espécies em taxa superiores (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008). Mszczynska et al. (2009) desenvolveram *primers* específicos para replicar a região *Barcodes* do citocromo oxidase 1 em diplostomídeos e apresentaram dados preliminares demonstrando que as sequências obtidas foram úteis para discriminar espécies congênicas em Diplostomoidea, e que a utilização desta região permite resolver questões sobre a diversidade de espécies, a distribuição geográfica e a especificidade de cada espécie. Além disso, sequências curtas da região do gene do COX1 do DNA mitocondrial, chamadas de “mini-barcodes”, podem ser utilizadas para distinguir parasitos da mesma família e, na maioria dos casos, em espécies (MEUSNIER et al., 2008).

Interações parasito-hospedeiro podem ocorrer em populações subdivididas que trocam genes em ambientes heterogêneos. Este fato pode levar a interações complexas entre processos intra e interpopulacionais ao longo do tempo e do espaço (THOMPSON, 1994), uma vez que dentro da hipótese coevolutiva, hospedeiros e parasitos experienciam

eventos de evolução concomitantes (BROOKS, 1979), gerando padrões de adaptação dos parasitos a hospedeiros locais (EBERT; HAMILTON, 1996).

A teoria de adaptação local postula que a estrutura populacional espacial de parasitos e hospedeiros, suas taxas de dispersão e diferenças na demografia direcionam a coevolução hospedeiro-parasito formando um mosaico geográfico de pontos com altas e baixas taxas coevolutivas (*hotspots* e *coldspots*) (THOMPSON, 1994; LIVELY, 1999; KING et al., 2009). Uma das predições desta teoria é que os parasitos são geralmente mais adaptados à população de hospedeiros local se a taxa de migração dos parasitos é maior do que a taxa de migração de seus hospedeiros (GANDON et al., 1996). Isto ocorre, pois a migração traz para a população de parasitos locais novos alelos que promovem adaptação a novos alelos de resistência dos hospedeiros.

Altos fluxos gênicos conduzem a mistura e dispersão de alelos locais vantajosos tornando a resposta à seleção vagarosa (LOUHI et al., 2010), demonstrando ter um importante papel na dispersão e na persistência de alelos resistentes a drogas entre as populações de parasitos (ROPER et al., 2003). Em outras palavras, diferenças nas taxas de dispersão do hospedeiro e do parasito podem, em grande parte, determinar as taxas de mudança nos genes de hospedeiros e parasitos que estão sob seleção em populações que estão interagindo (GANDON et al., 1996; MUTIKAINEN; KOSKELA, 2002) e contribuem significativamente para o mosaico espacial coevolutivo (THOMPSON, 1994).

As populações podem sofrer processos de especiação, sejam simpátricos (ausência de fluxo gênico entre populações com distribuição geográfica sobreposta) ou alopátricos (ausência de fluxo gênico por barreiras físicas, ocasionando isolamento geográfico das populações). Parasitos com ampla variedade de hospedeiros tendem a ser menos adaptados localmente, principalmente porque a exposição a muitos hospedeiros pode tornar fraca a

seleção espécie-específica em uma população de parasitos com reprodução interna (LAJEUNESSE; FORBES, 2002). Portanto, é esperado um alto fluxo gênico entre linhagens de parasitos ‘generalistas’, que utilizam diferentes espécies de hospedeiros.

Neste contexto metapopulacional, com extinção, recolonização e fluxo gênico, pressões de seleção e estocasticidade variáveis podem obscurecer processos locais e mudar o nível no qual a adaptação local ocorre (KALTZ; SHYKOFF, 1998). Alternativamente, o fluxo gênico pode introduzir variação adaptativa, então, diferentes taxas de migração entre os participantes da interação podem modificar a assimetria das taxas evolutivas dos hospedeiros e parasitos (KALTZ; SHYKOFF, 1998).

Os diplostomídeos apresentam ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros aquáticos e terrestres, sendo denominado ciclo alogênico. A hipótese autogênica-alogênica (ESCH et al., 1988) postula que parasitos que circulam entre hospedeiros dulcícolas e terrestres (ciclos de vida alogênicos) terão uma maior habilidade de se dispersar entre os ambientes aquáticos do que os parasitos que circulam somente em hospedeiros dulcícolas (ciclos de vida autogênicos).

Os diplostomídeos, objeto de estudo do presente trabalho, ocorrem nos olhos dos peixes hospedeiros intermediários, e podem ocasionar algumas patologias, dependendo do micro-habitat que exploram. A penetração destes parasitos em diferentes estruturas, como superfície do corpo, cavidade bucal e brânquias, e a migração da larva até o olho podem ocasionar danos e hemorragias em vários tecidos obstruindo os vasos sanguíneos, fenômeno que pode estar associado com a morte do peixe em caso de altas taxas de infecção (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982). Um estudo realizado por Whyte, Secomber e Chappell (1991) sobre a infectividade de *Diplostomum spathaceum* em *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), revelou que esta migração até o sítio específico (cristalino), local

imunologicamente privilegiado para um parasito, ocorre em até 24 horas (período chamado de “janela de oportunidade”), entretanto menos de 50% das cercárias que penetraram no peixe sobreviveram à imunidade do hospedeiro durante o período migratório.

No sítio de infecção, a presença destas metacercárias ocasiona uma doença associada denominada “catarata verminosa”, ou diplostomíase (MARTINS et al., 1999), sendo que em casos extremos podem ocasionar exoftalmia, deslocamento de retina, opacidade do cristalino e cegueira (BAUER; VLADIMIROV; MINDEL, 1964). As metacercárias podem alterar a visão dos hospedeiros resultando em alterações na alimentação e outros comportamentos, como a natação errática quando localizadas no cérebro (CORRÊA et al., 2014), levando a baixo crescimento em altas intensidades (KARVONEN; SEPPÄLÄ, 2008). Devido a estes fatores, os diplostomídeos estão relacionados a perdas em ambientes silvestres e de cultivo por efeitos diretos (mortalidade dos hospedeiros) e indiretos (aumento da suscetibilidade de predação de hospedeiros infectados) (CHAPPELL; HARDIE; SECOMBES, 1994).

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade de diplostomídeos presentes nos olhos de peixes em bacias hidrográficas da América do Sul (Amazonas, Paraná, Tocantins) utilizando sequências *Barcodes* da região do COX1 do DNA mitocondrial para delimitação das espécies. O primeiro capítulo deste trabalho discursa a respeito da diversidade de espécies de parasitos encontrada nos olhos de peixes da planície de inundação do alto rio Paraná, testando a hipótese de que a maioria das espécies encontradas apresenta distribuição específica ao hospedeiro. Além disso, a existência de espécies crípticas e de interações específicas parasito-hospedeiro-sítio de infecção foi verificada, bem como a estrutura genética populacional de uma das espécies encontradas. O segundo capítulo estendeu a hipótese de adaptação local para o nível de variação genética

intraespecífica, testando a existência de fluxo gênico entre hospedeiros das bacias hidrográficas amostradas na América do Sul, levando em consideração que *Austrodiplostomum*, por possuir ciclo alogênico, ou seja, com hospedeiros terrestres, mantém alto fluxo gênico entre as subpopulações amostradas.

REFERÊNCIAS

BACHMANN, F. et al. Parasitofauna e hematologia de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Pimelodidae) do rio Itajaí Açu, Blumenau, Brasil. In: SOUZA-SILVA, A.T.; LIZAMA, M.A.P.; TAKEMOTO, R.M. (Eds) **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**, Maringá: Editora Masson, 2012, p. 81–104.

BAUER, O.N.; VLADIMIROV, V.L.; MINDEL, N.V. New knowledge about the biology of Strigeata causing mass diseases of fish. In: ERGENS, R.; RYSAVY, B. (Ed.). **Parasitic worms and aquatic conditions**. Prague: Academy of Sciences of the Czech Republic, 1964, p. 77-82.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Limerick, v. 22, p. 148–155, 2007.

BROOKS, D.R. Testing the context and extent of host–parasite coevolution. **Systematic Zoology**, Washington, v. 28, p. 299–307, 1979.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S.A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007, 195 pp.

CHAPPELL, L.H. The biology of diplostomatid eye flukes of fishes. **Journal of Helminthology**, Wallingford, v. 69, p. 97–101, 1995.

CHAPPELL, L.H.; HARDIE, L.J.; SECOMBES, C.J. Diplostomiasis: the disease and host–parasite interactions. In: PIKE, A.W.; LEWIS, J.W. (Eds.) **Parasitic Diseases of Fish**. Tresaith: Samara Publishing, 1994, p. 59–86.

CHIBWANA, F.D.; NKWENGULILA, G. Variation in the morphometrics of diplostomid metacercariae (Digenea: Trematoda) infecting the catfish, *Clarias gariepinus* in Tanzania. **Journal of Helminthology**, Wallingford, v. 84, p. 61–70, 2010.

CORRÊA, L.L. et al. Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, p. 499–503, 2014.

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

EBERT, D; HAMILTON, W.D. Sex against virulence: the coevolution of parasite diseases. **Trends in Ecology and Evolution**, Limerick, v. 11, p. 79-82, 1996.

EIRAS, J.C. et al. About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. **European Association of Fish Pathology**, v. 31, p. 161–168, 2011.

ESCH, G.W. et al. Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternative strategies for colonization. **Parasitology**, Cambridge, v. 96, p. 519–532, 1988.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection Genetics and Evolution**, Oxon, v. 8, p. 727–736, 2008.

GALAZZO, D.E. et al. Molecular systematic of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 30, p. 2207-2217, 2002.

GANDON, S. et al. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, London, v. 263, p. 1003–1009, 1996.

GRACZYK, T. Variability of metacercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda: Diplostomidae). **Acta Parasitologica Polonica**, Warsaw, v. 37, p. 5-9, 1992.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase 1 divergences among closely related species. **Philosophical Transactions of Royal Society of London, B Biological Sciences**, London, v. 270, S596–S599, 2003.

HUDSON, P.J.; DOBSON, A.P.; LAFFERTY, K.D. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? **Trends in Ecology and Evolution**, Limerick, v. 21, p. 381–385, 2006.

KALTZ, O., SHYKOFF, J.A. Local adaptation in host–parasite systems. **Heredity**, Hantz, v. 4, p. 361–370, 1998.

KARVONEN, A.; SEPPÄLÄ, O. Effect of eye fluke infection on the growth of whitefish (*Coregonus lavaretus*) – An experimental approach. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 279, p. 6–10, 2008.

KARVONEN, A. et al. Transmission dynamics of a trematode parasite: exposure, acquired resistance and parasite aggregation. **Parasitology Research**, Berlin, v. 94, p. 183–188, 2004a.

KARVONEN, A. et al. Parasite resistance and avoidance behaviour in preventing eye fluke infection in fish. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, p. 159–164, 2004b.

KARVONEN, A. et al. Resistance against eye flukes: naive versus previously infected fish. **Parasitology Research**, Berlin, v. 91, p. 55–59, 2005.

KING, K.C. et al. The geographic mosaic of sex and the red queen. **Current Biology**, Cambridge, v. 19, p. 1–4, 2009.

LAFFERTY, K.D. Foraging on prey there are modified by parasites. **American Naturalist**, Chicago, v. 140, p. 855–867, 1992.

LAFFERTY, K.D.; MORRIS, A.K. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final host. **Ecology**, Bratislava, v. 77, p. 1390–1397, 1996.

LAJEUNESSE, M.J.; FORBES, M.R. Host range and local parasite adaptation. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, London, v. 269, p. 703–710, 2002.

LAWTON, S.P. et al. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. **Parasites & Vectors**, Penglais, v. 4, n. 13, 2011. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/131>. Acesso em: 13 de agosto de 2012.

LEVÊQUE, C. et al. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, Bucharest, v. 595, p. 545–567, 2008.

LIVELY, C.M. Migration, virulence and the geographic mosaic of adaptation by parasites. **American Naturalist**, Chicago, v. 153, p. S34–S47, 1999.

LOCKE, S.A. et al. Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences. **International Journal for Parasitology**, Oxon, v. 40, p. 333–343, 2010a.

LOCKE, S.D.; MCLAUGHLIN, J.D.; MARCOGLIESE, D.J. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 2813–2827, 2010b.

LOUHI, K.R. et al. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? **Infection Genetics and Evolution**, Oxon, v. 10, p. 1271–1277, 2010.

MACHADO, P.M.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) (Platyhelminthes, Digenea) metacercaria in fish from the floodplain of the Upper Paraná River, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 436-444, 2005.

MALTA, J.C.O. Os peixes de um lago de várzea da Amazônia Central (Lago Janauacá Rio Solimões) e suas relações com os crustáceos ectoparasitas (Branchiura: Argulidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 14, p. 355-372, 1984.

MARCOGLIESE, D.J.; COMPAGNA, S. Diplostomatid eye flukes in young-of-the year and forage fishes in the St. Lawrence River, Quebec. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 11, p. 275–282, 1999.

MARTINS, M.L. et al. Ocorrência de *Diplostomum* sp. Nordmann, 1832 (Digenea: Diplostomidae) em *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) proveniente do reservatório de Volta Grande, MG, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 21, n. 2, p. 263-266, 1999.

MEUSNIER, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. **BMC Genomics**, London, v. 9, 2008. DOI: 10.1186/1471-2164-9-214.

MINCHELLA, D.J.; SCOTT, M.E. Parasitism: A Cryptic Determinant of Animal Community Structure. **Trends in Ecology and Evolution**, Limerick, v. 6, p. 250-254, 1991.

MOSZCZYNSKA, A. et al. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of

barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, S75–S82, 2009.

MUTIKAINEN, P., KOSKELA, T. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. **Heredity**, Hants, v. 89, p. 318–324, 2002.

NIEWIADOMSKA, K. The genus *Diplostomum* – taxonomy, morphology and biology. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 41, p. 55–66, 1996.

NIEWIADOMSKA, K. Family Diplostomidae Poirier, 1886. In: GIBSON, D.I.; JONES, A.; BRAY, R.A. (Ed.) **Keys to the Trematoda**, Vol. 1. London: CAB International, 2005, p. 167–196.

NIEWIADOMSKA, K.; SZYMANSKI, S. Host-induced variability of *Diplostomum paracaudum* (Iles, 1959) metacercariae (Digenea). **Acta Parasitologica Polonica**, Warsaw, v. 36, p. 11–17, 1991.

NIEWIADOMSKA, K.; NIEWIADOMSKA-BUGAJ, M. Optimal Identification Procedure for *Diplostomum paracaudum* and *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 Metacercariae Based on Morphological Characters. **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 30, p. 165–171, 1995.

OSTROWSKI-NÚÑEZ, M. The life histories of *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970 and *D. (A.) mordax* (Szidat and Nani, 1951) n. comb. in South America. **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v. 208, p. 393–404, 1982.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Eduem, 2002. 305 p.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogenously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 121, 2007.

POULIN, R.; MORAND, S. **Parasite Biodiversity**. Washington: Smithsonian Books, 2004. 216 p.

RAUCH, G.; KALBE, B.; REUSCH, T.B.H. How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. **Journal of Evolutionary Biology**, Paris, v. 18, p. 1069–1075, 2005.

RAUCH, G.; KALBE, B.; REUSCH, T.B.H. One day is enough: rapid and specific host–parasite interactions in a stickleback–trematode system. **Biological Letters**, v. 2, p. 382–384, 2006.

RAUCH, G.; KALBE, B.; REUSCH, T.B.H. Partitioning average competition and extreme-genotype effects in genetically diverse infections. **Oikos**, Oxford, v. 117, p. 399–405, 2008.

RINTAMÄKI-KINNUNEN, P. et al. *Diplostomum spathaceum* metacercarial infection and color change in salmonid fish. **Parasitology Research**, Berlin, v. 93, p. 51–55, 2004.

ROPER, C. et al. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. **Lancet**, New York, v. 361, p. 1174–1181, 2003.

SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.F.G.; ZUANON, J.A.S. **Peixes Comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/AM, 2006, 144 p.

SEPPÄLÄ, O.; KARVONEN, A.; VALTONEN, E.T. Host manipulation by parasites and risk of non-host predation: is manipulation costly in an eye fluke–fish interaction? **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 8, p. 871–879, 2005a.

SEPPÄLÄ, O.; KARVONEN, A.; VALTONEN, E.T. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. **Animal Behavior**, London, v. 70, p. 889–894, 2005b.

SEPPÄLÄ, O.; KARVONEN, A.; VALTONEN, E.T. Susceptibility of eye fluke-infected fish to predation by bird hosts. **Parasitology**, Cambridge, v. 132, p. 575–579, 2006.

TAKEMOTO, R.M. et al. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, p. 691–705, 2009.

THOMPSON, J.N. **The Coevolutionary Process**. Chicago: The University of Chicago Press, 1994, 383 p.

VILAS, R.; CRISCIONE, C.D.; BLOUIN, M.S. A comparison between mitochondrial DNA and ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. **Parasitology**, Cambridge, v. 131, p. 839–846, 2005.

VOUTILAINEN, A.; TASKINEN, J. Infectivity of *Diplostomum* spp. in arctic charr: aspects of exposure duration and cercariae morphology. **Journal of Parasitology**, Oxon, v. 95, p. 527–531, 2009.

WHYTE, S.K.; SECOMBER, C.J.; CHAPPELL, L.H. Studies on the infectivity of *Diplostomum spathaceum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Helminthology**, Wallingford, v. 65; p. 169-178, 1991.

YAMADA, F. H. et al. Novas ocorrências de metacercária de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Platyhelminthes: Digenea) parasito de olhos de peixes da bacia do Rio Paraná. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Botucatu, v. 17, n. 3, p. 163-166, 2008.

2 DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE DE METACERCÁRIAS DE DIPLOSTOMIDAE EM PEIXES DE UMA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO NEOTROPICAL REVELADO PELO DNA *BARCODES*

RESUMO

Espécies de Diplostomoidea são relatadas como sendo cosmopolitas, entretanto suas reais diversidade e especificidade podem estar mascaradas por classificações errôneas. O gene COX1 foi utilizado para a identificação específica destes parasitos com o objetivo de avaliar a diversidade de diplostomídeos presentes nos olhos dos peixes da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil, testando a hipótese de que a maioria das espécies encontrada terá distribuição altamente específica para o hospedeiro e o micro-habitat explorado. Foram analisadas 56 espécies de peixes, sendo que 34% destas caracterizaram-se como hospedeiro para pelo menos uma das sete espécies de parasitos encontradas. Seis espécies foram caracterizadas molecularmente e demonstraram especificidade ao hospedeiro, ao micro-habitat (recurso) ou a ambos. A distribuição dos parasitos entre os hospedeiros explorados demonstrou uma partição de nicho entre as espécies especialistas nos recursos presentes no humor vítreo, não sendo registradas coocorrências no mesmo nicho. Somente uma espécie foi encontrada no cristalino, o que contrasta com outros estudos realizados na América do Norte, e aponta para a existência de pressões evolutivas divergentes entre estas regiões biogeográficas. Infere-se que, pela existência de vários hospedeiros e sítios de infecção, *Sphincterodiplostomum* seja um complexo de espécies que requer estudos moleculares futuros, uma vez que sequências moleculares distintas entre as fases do ciclo de vida foram encontradas. *Austrodiplostomum* spp. foram caracterizadas como um complexo de espécies formado por *Austrodiplostomum* sp. 2 (especialista) e *A.*

ostrowskiae (falso generalista). Concluiu-se que as metacercárias são específicas ao recurso explorado, que existem espécies crípticas na área e que fatores ecológicos podem estar direcionando a permuta de hospedeiros em alguns grupos de parasitos.

Palavras-chave: Diplostomoidea; América do Sul; COX1; espécies crípticas; *Ecological Fitting*; *Host switch*.

DIVERSITY AND SPECIFICITY OF DIPLOSTOMIDAE METACERCARIAE ON FISHES OF A NEOTROPICAL FLOODPLAIN REVEALED BY DNA *BARCODES*

ABSTRACT

Diplostomoidea species are reported as cosmopolitan, however their real diversity and specificity may be masked by erroneous species identification. The COX1 gene was used to the specific identification of these parasites aiming to evaluate the diplostomoid diversity that occurs on eyes of fishes from the high Paraná River floodplain, Brazil, predicting that the majority of the parasite species will present a high specificity for the host and for the micro-habitat. It has been analyzed 56 fish species, 34% of them characterized as host for at least one of the seven parasite species reported for this location. Six parasite species have been molecularly characterized and demonstrated specificity to the host, to the resource or to both. The parasites distribution demonstrated a niche partition among the specialists on the resources of the vitreous humor, and co-occurrence on the same niche was not observed. Only one species was registered on the lens, contrasting to other studies in North

America, what points to the existence of divergent evolutionary pressures between different biogeographic regions. Our study pointed out that *Sphinctrodiplostomum* may be a species complex, due to its presence on several infection sites on scientific reports, and that more molecular studies are necessary to elucidate this question. *Austrodiplostomum* sp. 2 (specialist) and *A. ostrowskiae* (faux generalist) were also considered as species belonging to an *Austrodiplostomum* spp. species complex. It is concluded that the metacercariae are specific to the explored resource, that there are cryptic species on the area and that ecological factors may be directing the host switch among some parasite group.

Keywords: Diplostomoidea; South America; COX1; cryptic species; ecological fitting; host switch.

2.1 INTRODUÇÃO

A diversidade e a ecologia de muitos grupos de parasitos metazoários são pouco conhecidas (Poulin e Morand, 2004; Poulin, 2007), sendo a maioria destes registrada em um pequeno número de hospedeiros, no entanto sua especificidade é, geralmente, difícil de avaliar (Poulin, 2007; Poulin e Keeney, 2007). Além disso, muitos parasitos mostram diferentes graus de especificidade em diferentes estágios do seu ciclo de vida (Locke et al., 2010 a).

Muitas espécies de Diplostomidea (Digenea) são tratadas como cosmopolitas (Niewiadomska, 1996), originando relatos de poucas espécies distribuídas em uma ampla gama de hospedeiros. Esta Família abrange espécies de endoparasitos com complexo ciclo de vida, com estágios larvais que ocorrem nos olhos de peixes, as metacercárias. Estas causam patogenia, em populações de ambientes dulcícolas naturais e em pisciculturas (Szidat, 1969; Chappell, 1995; Overstreet e Curran, 2004; Violante-González et al., 2009), denominada “catarata verminosa” ou “diplostomíase” (Martins et al., 1999). Associados a esta observa-se uma série de sintomas, tais como, exoftalmia, hemorragias locais, catarata e redução do crescimento (Bauer et al., 1964; Chappell et al., 1994; Chappell, 1995; Niewiadomska, 1996).

Entretanto, pouco se conhece sobre a verdadeira diversidade e especificidade das metacercárias desta Família (Poulin, 2007), em especial pela dificuldade na identificação específica (Niewiadomska, 1996), à morfologia simples dos estágios larvais, à presença de espécies crípticas (morfologicamente similares, porém molecularmente distintas) e ao fato que diferentes estágios do ciclo de vida de uma espécie têm sido tratados como espécies distintas (Valtonen e Gibson, 1997). Moszczyńska et al. (2009) ressaltaram a importância

de uma acurada identificação destes parasitos para a diagnose, o tratamento e o controle da infecção, bem como para os estudos sobre a diversidade, a distribuição e a ecologia.

Estudos moleculares têm sido aplicados como uma alternativa para a identificação específica deste grupo e têm evidenciado a alta diversidade críptica destes parasitos (Locke et al., 2010 a, b; Georgieva et al., 2013). Uma abordagem molecular pode ser capaz de produzir uma rápida aceleração nos estudos sobre os ciclos de vida e sobre as associações parasito-hospedeiro (Perez-Ponce de León e Nadler, 2010). Além disso, sequências de DNA podem ser utilizadas para identificar todos os estágios de desenvolvimento, o que se constitui em uma grande vantagem para o estudo de parasitos com ciclos de vida complexos (Criscione et al., 2005).

Um melhor entendimento da complexidade genotípica e fenotípica dentro de Diplostomidae poderá ser gerada pela utilização de genes mais variáveis, como região *Barcodes* do gene do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial (Georgieva et al., 2013). Esta região (COX1) de parasitos platelmintos exhibe taxas de variação maiores do que as encontradas na região do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (ITS) e pode servir como um marcador mais sensível para a detecção de espécies (Vilas et al., 2005), pois o ITS possui “evolução concertada” que permite a homogeneização de sequências de DNA pertencentes a mesma Família (Elder e Turner, 1995), reduzindo as diferenças evolutivas.

Moszczyńska et al. (2009) e Locke et al. (2010 a, b) demonstraram que sequências da região *Barcodes* do COX1 conseguem diferenciar entre espécies congênicas, revelando uma diversidade de espécies muito maior do que a previamente estimada pelo uso de caracteres morfológicos.

A conservação dos hospedeiros (alta especificidade por hospedeiro) tanto em escalas ecológicas (locais), quanto evolutivas (temporais) é uma das características do parasitismo, portanto, a especificidade a este detém a chave para a compreensão da evolução das associações parasito-hospedeiro (Agosta et al., 2010). Estas associações são assumidas como sendo ecologicamente especializadas, onde sistemas firmemente coevoluídos foram dirigidos por modificações mútuas, nas quais a troca de hospedeiros (*host switch*) foram fenômenos raros (Brooks et al., 2006). Coevolução é um termo que descreve os casos onde parasitos e hospedeiros experienciaram eventos de evolução concomitantes (Brooks, 1979), portanto, é esperado que a maior parte das espécies de parasitos encontrada em determinada região seja específica ao seu hospedeiro (ou que estes sejam filogeneticamente próximos).

Dentro desta hipótese coevolutiva, o objetivo primordial deste estudo foi avaliar a composição e a diversidade de diplostomídeos presentes nos olhos dos peixes da planície de inundação do alto rio Paraná, predizendo-se que a maioria das espécies encontrada terá distribuição altamente específica para o hospedeiro e o micro-habitat explorado.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes foram coletados durante o mês de junho de 2011, com redes de espera padronizadas, de diferentes malhas, em vários pontos dos três subsistemas (Ivinhema, Baía e Paraná) componentes da planície de inundação do alto rio Paraná, PR/MS, Brasil, concomitantemente ao projeto PELD (Pesquisas Ecológicas de Longa Duração/CNPq) – sítio 6 (Fig. 1).

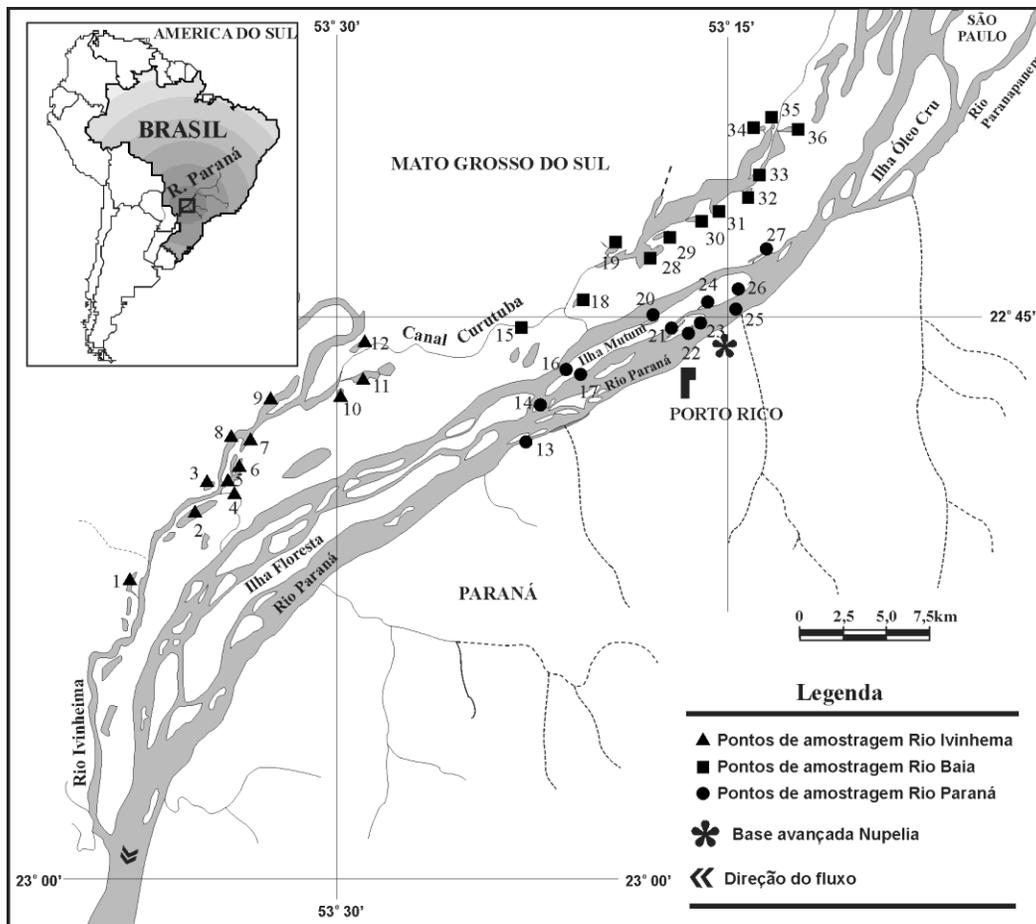


Figura 01. Localização dos pontos de coleta na Planície de inundação do alto Rio Paraná, nos subsistemas Paraná, Baía e Ivinhema. 1. Lagoa Peroba; 2. Lagoa Ventura; 3. Lagoa Zé do Paco; 4. Canal Ipoitã; 5. Lagoa Boca do Ipoitã; 6. Lagoa dos Patos; 7. Lagoa Capivara; 8. Rio Ivinhema; 9. Lagoa Finado Raimundo; 10. Lagoa do Jacaré; 11. Lagoa Sumida; 12. Lagoa do Cervo; 13. Canal Cortado; 14. Lagoa das Pombas; 15. Canal Curutuba; 16. Ressaco do Manezinho; 17. Lagoa do Osmar; 18. Lagoa da Traíra; 19. Lagoa do Guaraná; 20. Ressaco do Bilé; 21. Ressaco do Leopoldo; 22. Lagoa Genipapo; 23. Lagoa Clara; 24. Ressaco do Pau Véio; 25. Rio Paraná; 26. Lagoa Pousada; 27. Lagoa das Garças; 28. Rio Baía; 29. Lagoa Fechada; 30. Lagoa Pausada das Garças; 31. Lagoa dos Porcos; 32. Lagoa do Aurélio; 33. Canal Baía; 34. Lagoa Maria Luiza; 35. Lagoa do Gavião; 36. Lagoa da Onça.

O mês de coleta foi escolhido baseando-se na dinâmica do ciclo de vida dos digenéticos, em especial da fase cercarial. Como as cercárias (fase evolutiva anterior à metacercária) são liberadas nos meses de altas temperaturas (dezembro a março), podendo infectar os peixes (Souza et al., 2008) e estas levam, em média, três meses para seu completo desenvolvimento em metacercárias (Ostrowski de Núñez, 1982), e tendo em vista que o nível hidrológico baixo do rio favorece a predação dos peixes pelas aves (hospedeiros

finais), inferiu-se que o desenvolvimento das metacercárias já estaria completo em junho, conforme sugerido por Dias (2002) para o digenético *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814).

Os peixes foram sacrificados por secção medular, sob autorização do Conselho de Ética da Universidade Estadual de Maringá (CEAE – Parecer 123/2010) e identificados segundo Graça e Pavanelli (2007). Os dados individuais de comprimento padrão, peso, sexo e local de amostragem foram anotados como informação adicional, para análises posteriores sobre a distribuição dos hospedeiros.

O exame parasitológico teve início com a remoção do globo ocular dos peixes, sendo o órgão mantido em solução salina a 0,65% até a necropsia. O globo ocular foi seccionado sendo utilizada a linha da íris como base para a secção com bisturi, seguida da retirada da córnea com pinça. O olho foi então subdividido nas seguintes regiões: humor aquoso e vítreo, cristalino e retina, sendo as duas últimas analisadas separadamente em placas de Petri. Para a confirmação do sítio de infecção foram realizados cortes histológicos dos olhos das espécies consideradas hospedeiras.

Para as análises histológicas, os olhos de hospedeiros parasitados e não parasitados foram cuidadosamente removidos e fixados em formalina 10%, emblocadas individualmente em parafina, cortadas, com auxílio de micrótomo, em fragmentos com cinco μm de espessura, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina, sendo observadas em microscopia ótica. As imagens histológicas foram obtidas com auxílio do Microscópio Nikon Eclipse E200, com contraste de fase e tubo de desenho, acoplado a câmera fotográfica Samsung DV100.

Os parasitos recolhidos foram fixados em etanol 70% e mantidos em etanol 95%, sob refrigeração. A classificação inicial foi realizada pelo morfotipo, utilizando a chave de

Gibson et al. (2002), e pelo sítio de infecção para posterior análise molecular. Os índices parasitológicos foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

Os espécimes utilizados para análise molecular, após a identificação prévia, foram fotografados em microscópio estereoscópico Leica M185C, sendo seccionados com bisturi esterilizado e mantidos como *vouchers* para depósito *a posteriori*. Alguns espécimes com pequenas dimensões foram mantidos inteiros para maximizar a extração de DNA.

A identificação molecular foi realizada em todas as metacercárias com baixa abundância em nichos específicos (como no caso de *Diplostomum* sp. C e *Diplostomum* sp. D, coletados em um único espécime de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) e *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948), respectivamente). Já para as metacercárias especialistas e com alta abundância (humor vítreo e retina) e para as generalistas uma subamostragem foi realizada levando-se em consideração todos os hospedeiros registrados, para que as sequências fossem obtidas para o maior número possível de associações parasito-hospedeiro.

A extração, a amplificação e o sequenciamento da região COX1 do DNA mitocondrial foram realizados no Centro Canadense para DNA Barcoding (Canadian Centre for DNA Barcoding – CCDB) em Guelph (Ontário, Canadá), utilizando os *primers* Plat-diploCOX1F/R e MplatCOX1F/R, seguindo o protocolo descrito por Moszczyńska et al. (2009). Informações adicionais sobre os espécimes, tais como cromatogramas originais, hospedeiro, local de amostragem e fotografias (em alguns casos) estão disponíveis no site <http://www.barcodinglife.org>, no projeto DIPSA.

O DNA extraído dos espécimes de diplostomídeos foi usado como uma ferramenta para a delimitação de espécies, pois as metacercárias são difíceis de serem identificadas em nível específico somente com métodos morfológicos tradicionais. Na maioria dos casos os

cromatogramas das sequências F e R (*forward* e *reverse*, respectivamente) foram alinhados, requerendo pouca edição, sendo obtidas sequências *consensus* para cada espécime. O objetivo desta prática foi obter sequências COX1 do maior número de metacercárias. O programa Chromas Lite 2.1 (www.technelysium.com.au) foi utilizado para a visualização dos cromatogramas como ferramenta auxiliar nas edições das sequências. O alinhamento foi realizado utilizando o método MUSCLE (Edgar, 2004; Nuin et al., 2006) e as divergências evolutivas (intra e interespecíficas) foram calculadas com a distância Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) com deleção parcial de *gaps*, com o auxílio do programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011).

Para confirmar a delimitação das espécies potenciais, inicialmente realizada pelo morfotipo, foi construída uma árvore filogenética, pelo Método de Máxima Verossimilhança, calculada pela distância Kimura 2-parâmetros entre as sequências COX1 (Kimura, 1980), com alinhamento parcial, sendo a robustez avaliada pelo Método de Bootstrap com 1000 replicações, utilizando o programa MEGA 5.0. Sequências representativas dos espécimes coletados na planície de inundação do alto rio Paraná foram submetidas à pesquisa por BLAST no GenBank com o objetivo de identificar se estas espécies já haviam sido previamente registradas e publicadas em outros estudos com diplostomídeos.

Uma dispersão em coordenadas principais foi construída com as distâncias evolutivas interespecíficas obtidas com as sequências de cada parasito, após correção de Lingoos, pelo programa DistPCoA (Legendre e Anderson, 1998), para observar a divisão dos grupos de espécies na planície de inundação do alto rio Paraná, sendo esta evidenciada por meio de um gráfico em coordenadas principais, com o uso do programa STATISTICA 7.1 (Statsoft INC, 2005).

Para cada espécie de diplostomídeo encontrada em mais de uma espécie de hospedeiro, a especificidade foi quantificada usando o número de espécies hospedeiras (isto é, o espectro de hospedeiros) assim como dois índices filogenéticos: Distância Filogenética dos Hospedeiros e a Variância da Diversidade Filogenética dos Hospedeiros. A distância filogenética dos hospedeiros foi estimada usando S_{TD} , a distância média taxonômica entre todas as espécies de hospedeiros infectadas por um parasito, e sua variância associada $VarS_{TD}$, a qual reflete a heterogeneidade das relações filogenéticas entre os hospedeiros (Poulin e Mouillot, 2003). Estes índices foram calculados utilizando o programa TaxoBiodiv2 (Poulin e Mouillot, 2005) (<http://www.otago.ac.nz/parasitegroup/downloads.html>).

A hierarquia taxonômica do hospedeiro usada para o cálculo dos índices de especificidade inclui as categorias Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, baseado em Graça e Pavanelli (2007). Usando estes níveis taxonômicos, o valor máximo que o índice S_{TD} poderá alcançar será 4 (quando todos os hospedeiros pertencerem a diferentes Ordens). O valor de $S_{TD}=1$ significa que todas as espécies de hospedeiros para uma dada espécie de parasito são congênicas e o valor de $S_{TD}=0$ significa que existe somente um hospedeiro conhecido para uma dada espécie de parasito.

2.3 RESULTADOS

Foram coletados 837 peixes, distribuídos em 4 ordens, 20 famílias, 46 gêneros e 56 espécies (Tab. 01), representando aproximadamente 44% da riqueza total de espécies da área amostrada. Entretanto, aproximadamente 34% das espécies de peixes analisados caracterizaram-se como hospedeiro para pelo menos uma espécie de diplostomídeo (Fig. 02).

Tabela 01. Classificação taxonômica dos peixes coletados na planície de inundação do alto rio Paraná em junho de 2011 e número amostral (N).

Ordem	Família	Gênero	Espécie	Autor	N		
	Acestrorhynchidae	<i>Acestrorhynchus</i>	<i>A. lacustris</i> *	(Lütken, 1875)	37		
	Anostomidae	<i>Leporinus</i>	<i>L. elongatus</i>	Valenciennes, 1850	3		
			<i>L. friderici</i>	(Bloch, 1794)	9		
			<i>L. lacustres</i>	Campos, 1945	30		
			<i>L. macrocephalus</i>	Garavello & Britski, 1987	5		
			<i>L. obtusidens</i>	(Valenciennes, 1836)	31		
			<i>Schizodon</i>	<i>S. borellii</i> *	(Boulenger, 1900)	41	
	Characiformes	Characidae	<i>Schizodon</i>	<i>S. nasutus</i>	Kner, 1858	2	
			<i>Aphyocharax</i>	<i>A. dentatus</i>	Eigenmann & Kennedy, 1903	1	
			<i>Astyanax</i>	<i>A. altiparanae</i>	Garutti & Britski, 2000	34	
			<i>Brycon</i>	<i>B. orbignyanus</i>	(Valenciennes, 1850)	1	
			<i>Moenkhausia</i>	<i>M. aff. intermedia</i>	Eigenmann, 1908	2	
			<i>Piaractus</i>	<i>P. mesopotamicus</i>	(Holmberg, 1887)	6	
			<i>Psellogrammus</i>	<i>P. kennedyi</i>	(Eigenmann, 1903)	1	
<i>Roeboides</i>			<i>R. descalsvadensis</i>	Fowler, 1932	29		
<i>Salminus</i>			<i>S. brasiliensis</i>	(Cuvier, 1816)	13		
<i>Serrasalmus</i>			<i>S. maculatus</i>	Kner, 1858	12		
<i>Serrasalmus</i>			<i>S. marginatus</i>	Valenciennes, 1837	29		
<i>Cyphocharax</i>			<i>C. nagelii</i>	(Steindachner, 1881)	1		
Curimatidae			<i>Steindachnerina</i>	<i>S. brevipinna</i> *	(Eigenmann & Eigenmann, 1889)	4	
				<i>S. insculpta</i> *	(Fernández-Yépez, 1948)	20	
Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>H. unitaeniatus</i> *	(Agassiz, 1829)	7			
		<i>H. aff. malabaricus</i> *	(Block, 1794)	28			
Hemiodontidae	<i>Hemiodus</i>	<i>H. orthonops</i>	Eigenmann & Kennedy, 1903	21			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>A. affinis</i>	(Steindachner, 1879)	1			
Prochilodontidae	<i>Prochilodus</i>	<i>P. lineatus</i> *	(Valenciennes, 1836)	42			
Gymnotidae	<i>Gymnotus</i>	<i>G. inaequilabiatus</i>	(Valenciennes, 1839)	3			
Gymnotiformes	Rhamphichthyidae	<i>Rhamphichthys</i>	<i>R. hahni</i>	(Meiken, 1937)	2		
	Sternopygidae	<i>Eigenmannia</i>	<i>E. trilineata</i>	López & Castello, 1966	4		
Perciformes	Cichlidae	<i>Astronotus</i>	<i>A. crassipinnis</i>	(Heckel, 1840)	54		
		<i>Cichla</i>	<i>C. kelberi</i> *	Kullander & Ferreira, 2006	37		
		<i>Cichla</i>	<i>Cichla</i> sp.		2		
		<i>Crenicichla</i>	<i>C. britskii</i> *	Kullander, 1982	1		
		<i>Geophagus</i>	<i>G. cf. proximus</i> *	(Castelnau, 1855)	14		
		<i>Satanoperca</i>	<i>S. pappaterra</i> *	(Heckel, 1840)	1		
		<i>Plagioscion</i>	<i>P. squamosissimus</i> *	(Heckel, 1840)	6		
		Siluriformes	Auchenipteridae	<i>Ageneiosus</i>	<i>A. inermis</i>	(Linnaeus, 1766)	1
				<i>Auchenipterus</i>	<i>A. osteomystax</i>	(Miranda-Ribeiro, 1918)	9
				<i>Parauchenipterus</i>	<i>P. galeatus</i> *	(Linnaeus, 1766)	26
Callichthyidae	<i>Hoplosternum</i>		<i>H. littorale</i>	(Hancock, 1828)	5		
	<i>Lepthoplosternum</i>		<i>L. pectorale</i>	(Boulenger, 1895)	1		
Clariidae	<i>Clarias</i>		<i>C. gariepinus</i>	(Burchell, 1822)	2		
Doradidae	<i>Pterodoras</i>		<i>P. granulatus</i>	(Valenciennes, 1821)	20		
	<i>Trachydoras</i>		<i>T. paraguayensis</i>	(Eigenmann & Ward, 1907)	18		
Heptapteridae	<i>Pimelodella</i>		<i>P. avanhandavae</i>	Eigenmann, 1917	1		
Siluriformes	Loricariidae		<i>Hypostomus</i>	<i>H. aff. hermanni</i>	(Ihering, 1905)	1	
		<i>Loricariichthys</i>	<i>L. platymetopon</i> *	Isbrücker & Nijssen, 1979	34		
	<i>Pterygoplichthys</i>	<i>P. ambrosettii</i> *	(Holmberg, 1893)	106			
	<i>Rhinelepis</i>	<i>R. aspera</i> *	Spix & Agassiz, 1829	4			
	<i>Hemisorubim</i>	<i>H. platyrhynchus</i> *	(Valenciennes, 1840)	3			
	<i>Iheringichthys</i>	<i>I. labrosus</i>	(Lütken, 1874)	9			
	Pimelodidae	<i>Pimelodus</i>	<i>P. maculatus</i>	La Cepède, 1803	22		
			<i>P. misteriosus</i>	Azpelicueta, 1998	4		
			<i>P. ornatus</i> *	Kner, 1858	1		
			<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>P. corruscans</i>	(Spix & Agassiz, 1829)	11	
<i>Sorubim</i>	<i>S. lima</i> *	(Bloch & Schneider, 1801)	25				

* Parasitada por pelo menos uma espécie de diplostomídeo.

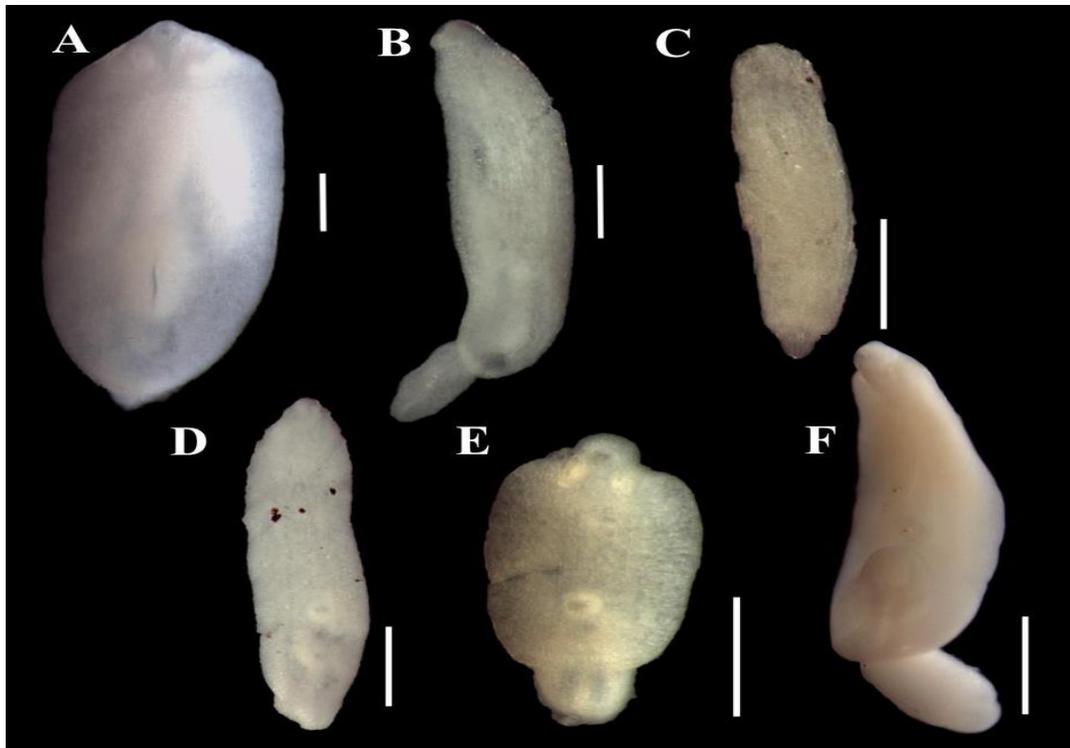


Figura 02. Morfotipos metacercariais encontrados em olhos de peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil, em junho de 2011. A. *Austrodiplostomum* sp. coletado no humor aquoso de *Satanoperca pappaterra*. Barra = 200 μ m. B. *Diplostomum* sp. A coletado no cristalino (lentes) de *Parauchenipterus galeatus*. Barra = 200 μ m. C. *Diplostomum* sp. C coletado no humor vítreo de *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Barra = 200 μ m. D. *Diplostomum* sp. D coletado no humor vítreo de *Steindachnerina insculpta*. Barra = 200 μ m. E. *Diplostomum* sp. F coletado no humor vítreo de *Hoplias* aff. *malabaricus*. Barra = 200 μ m. F. *Sphincterodiplostomum* sp. coletado na retina de *Steindachnerina insculpta*. Barra = 500 μ m.

Foram coletadas 4.168 metacercárias, sendo reconhecidos dois grupos de parasitos, o primeiro especialista quanto ao sítio e ao hospedeiro (Fig. 02; 03A; Tab. 02), formado por cinco “morfotipos” distintos: quatro tratados como *Diplostomum* (Fig. 02B, C, D e E) e um como *Sphincterodiplostomum* (Fig. 02F); e outro generalista quanto ao hospedeiro, porém especialista para o recurso, formado pelo “morfotipo” *Austrodiplostomum* (Fig. 02A, Fig. 03B, Tab. 02), que devido ao grande número de hospedeiros foi tratado como um complexo de espécies crípticas específicas. Somente dois morfotipos, *Diplostomum* sp. D e *Sphincterodiplostomum* sp., ocorreram simultaneamente em uma mesma espécie de hospedeiro (três espécimes de *Steindachnerina insculpta*

(Fernández-Yépez, 1948)), entretanto ocupando sítios de infecção distintos, humor vítreo e retina, respectivamente (Fig. 03, 04). Entretanto, todos os morfotipos amostrados demonstraram alta variabilidade morfológica, mesmo em espécimes de parasitos coletados dentro do mesmo hospedeiro.

Ao todo 186 metacercárias foram submetidas à análise molecular, sendo estas selecionadas por subamostragem realizada por meio dos seguintes parâmetros: morfotipo, espécie de hospedeiro e sítio de infecção. Destas, em 94 amostras (50,5%) o sequenciamento, e o posterior alinhamento, foram possíveis (Tab. 02). O morfotipo *Diplostomum* sp. D não foi caracterizado molecularmente, em especial devido à pequena dimensão e ao baixo número amostrado (seis espécimes), porém a especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção, assim como as características morfológicas (menor tamanho), permitiram distingui-lo dos demais morfotipos coletados Fig. 02, 03, 04). As maiores abundâncias médias foram alcançadas pelo morfotipo *Diplostomum* sp. F coletadas no humor vítreo de *Hoplias* aff. *malabaricus* (em somente um espécime foram coletadas 1230 metacercárias).

Quando as sequências foram utilizadas para a distinção de espécies potenciais por meio de uma árvore filogenética (Fig. 05), seis espécies apresentaram grupos bem distintos e demonstraram a existência de espécies crípticas congênicas no morfotipo *Austrodiplostomum*. Além disso, observou-se uma divisão pelo Gênero, sendo que *Austrodiplostomum* sp. 1 e *Austrodiplostomum* sp. 2 ocuparam clados próximos (região azul da árvore filogenética, Fig. 05), *Sphincterodiplostomum* sp. ficou mais próximo de *Austrodiplostomum* spp. (região laranja da árvore filogenética, Fig. 05) e duas espécies do Gênero *Diplostomum* (A e F) foram filogeneticamente próximas (região verde, Fig. 05). Entretanto, *Diplostomum* sp. C ficou separado das demais congênicas, possivelmente,

pela ausência de divisão distinta do corpo em *forebody* e *hindbody*. A divergência média interespecífica foi de 17,48%, variando entre 6,7% e 23,2% (Tab. 03).

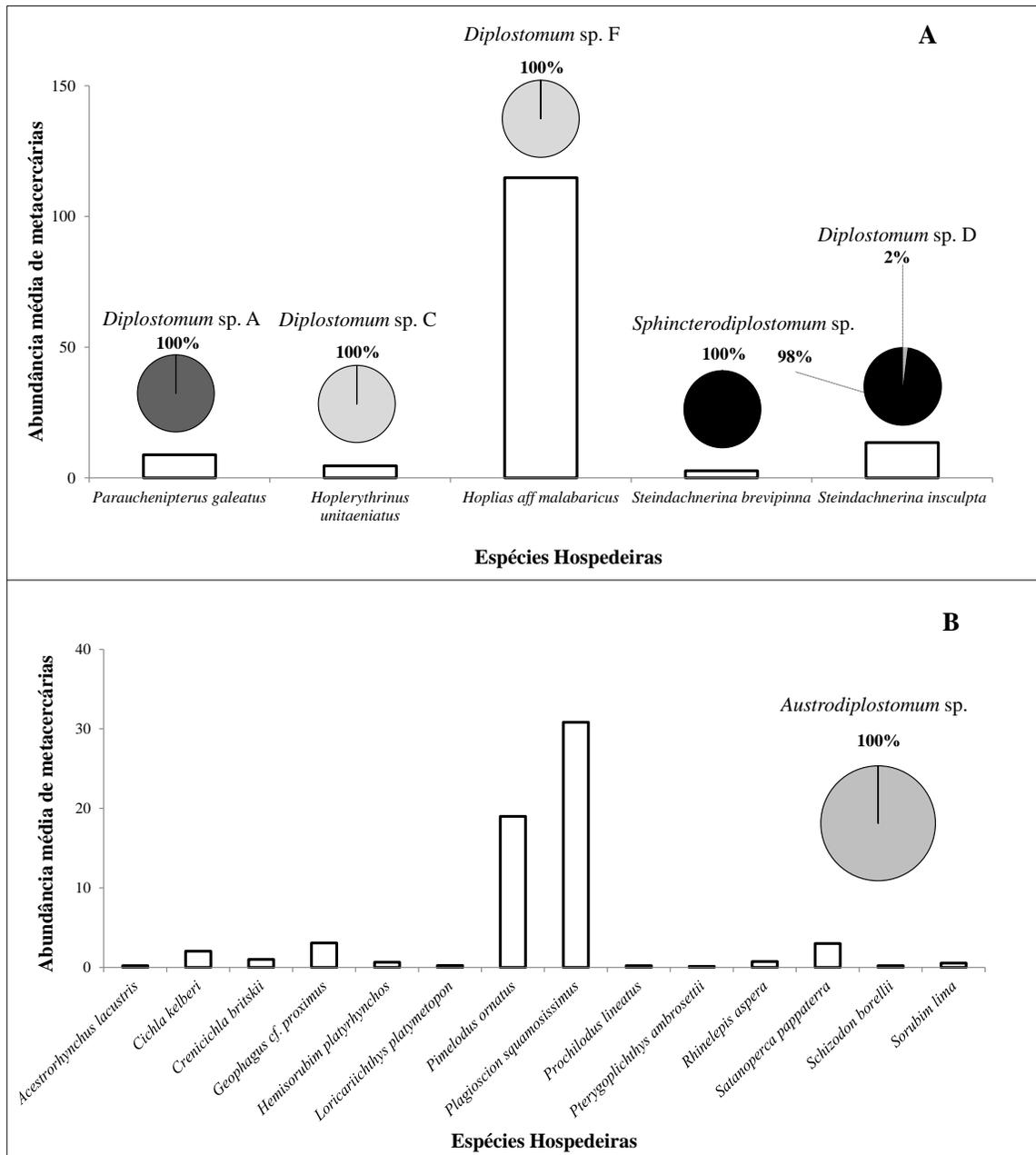


Figura 03. Abundância média de todos os “morfotipos” de diplostomídeos coletados em peixes na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil, em junho de 2011. A. Espécies especialistas quanto ao hospedeiro e recurso. Os círculos correspondem à porcentagem de metacercárias coletadas por sítio de infecção onde: Círculo cinza escuro = cristalino; Círculo cinza claro = Humor vítreo; Círculo preto = retina. B. Peixes hospedeiros de *Austrodiplostomum* sp., espécie generalista quanto ao hospedeiro. Círculo cinza claro = Humor aquoso e vítreo.

Tabela 02. Índices parasitológicos calculados para as metacercárias de diplostomídeos coletados em peixes da planície de inundação do alto rio Paraná, em junho de 2011. NA= número de peixes amostrados; Prev (%) = prevalência; P = Número total de parasitos; IM = Intensidade Média (\pm desvio padrão); AM = Abundância Média (\pm desvio padrão); Nseq = número de sequências moleculares obtidas para cada hospedeiro registrado.

Morfotipo	Sítio de Infecção	Hospedeiros	NA	Prev (%)	P	IM	AM	Nseq
<i>Austrodiplostomum</i> sp.	Humor aquoso e vítreo	<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	37	8,11	8	2,7 (\pm 1,69)	0,22 (\pm 0,88)	2
		<i>Cichla kelberi</i>	37	54,05	76	3,8 (\pm 2,8)	2,05 (\pm 2,85)	6
		<i>Crenicichla britskii</i>	1	100,00	1	1,0 (\pm 0)	1,0 (\pm 0)	0
		<i>Geophagus cf. proximus</i>	14	64,29	43	4,8 (\pm 3,26)	3,07 (\pm 3,60)	5
		<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	3	66,67	2	1,0 (\pm 0,0)	0,67 (\pm 0,57)	2
		<i>Loricariichthys platymetopon</i>	34	5,88	8	4,0 (\pm 3,0)	0,24 (\pm 1,20)	1
		<i>Pimelodus ornatos</i>	1	100,00	19	19,0 (\pm 0,0)	19,0 (\pm 0,0)	0
		<i>Plagioscion squamosissimus</i>	6	66,67	563	281,5 (\pm 105,5)	93,83 (\pm 149,19)	6
		<i>Prochilodus lineatus</i>	42	2,38	9	9,0 (\pm 0,0)	0,21 (\pm 0,0)	0
		<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i>	106	8,49	14	1,6 (\pm 1,26)	0,13 (\pm 0,57)	3
		<i>Rhinelepis aspera*</i>	4	50,00	3	1,5 (\pm 0,5)	0,75 (\pm 1,0)	1
		<i>Satanoperca pappaterra</i>	1	100,00	3	3,0 (\pm 0,0)	3,0 (\pm 0,0)	3
		<i>Schizodon borellii</i>	41	12,20	9	1,8 (\pm 0,75)	0,22 (\pm 0,65)	2
		<i>Sorubim lima</i>	25	28,00	14	2 (\pm 1,98)	0,56 (\pm 1,41)	5
<i>Diplostomum</i> sp. A	Cristalino	<i>Parauchenipterus galeatus</i>	26	34,62	230	25,6 (\pm 21,84)	8,8 (\pm 18,0)	26
<i>Diplostomum</i> sp. C	Humor vítreo	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	7	14,29	32	32,0 (\pm 0)	4,6 (\pm 12,09)	3
<i>Diplostomum</i> sp. D	Humor vítreo	<i>Steindachnerina insculpta</i>	21	19,05	6	1,5 (\pm 0,86)	0,29 (\pm 0,71)	0
<i>Diplostomum</i> sp. F	Humor vítreo	<i>Hoplias aff.malabaricus</i>	28	64,29	3215	178,6 (\pm 233,9)	114,8 (\pm 209,90)	8
<i>Sphincterodiplostomum</i> sp.	Retina	<i>Steindachnerina brevipinna</i>	4	75,00	21	7 (\pm 4,5)	5,25 (\pm 5,73)	1
		<i>Steindachnerina insculpta</i>	21	85,71	270	15 (\pm 18,05)	12,9 (\pm 18,83)	20

* Parasitos posteriormente classificados como *Austrodiplostomum* sp. 2.

O morfotipo *Austrodiplostomum* foi registrado em 14 hospedeiros, sendo que em 11 foi possível a obtenção de pelo menos uma sequência da região COX1 (Tab. 02). Foram utilizadas 34 sequências cujo comprimento variou entre 179 (para *Rhinelepis aspera* Spix & Agassiz, 1829) e 587 nucleotídeos (para *Schizodon borellii* (Boulenger, 1900)). Quando a divergência evolutiva entre as sequências foi calculada, observou-se a presença de duas espécies distintas: *Austrodiplostomum* sp. 1, composta por 33 sequências com variação média intraespecífica de 0,5% (variando entre 0 e 2,4%), que compreende a maioria dos hospedeiros amostrados; e *Austrodiplostomum* sp. 2 com um espécime, coletado em *R. aspera*, com variação interespecífica média de 6,7% (variando de 5 a 10%). Isto evidencia a

existência de um complexo de espécies do morfotipo *Austrodiplostomum*, composto por, pelo menos, duas espécies distintas, indistinguíveis pela morfologia. Entretanto, como a caracterização molecular não foi possível em metacercárias de três hospedeiros, *Crenicichla britskii*, *Pimelodus ornatos* e *Phochilodus lineatus*, o número de espécies deste complexo ainda pode aumentar caso estes apresentem parasitos com sequências distintas das obtidas.

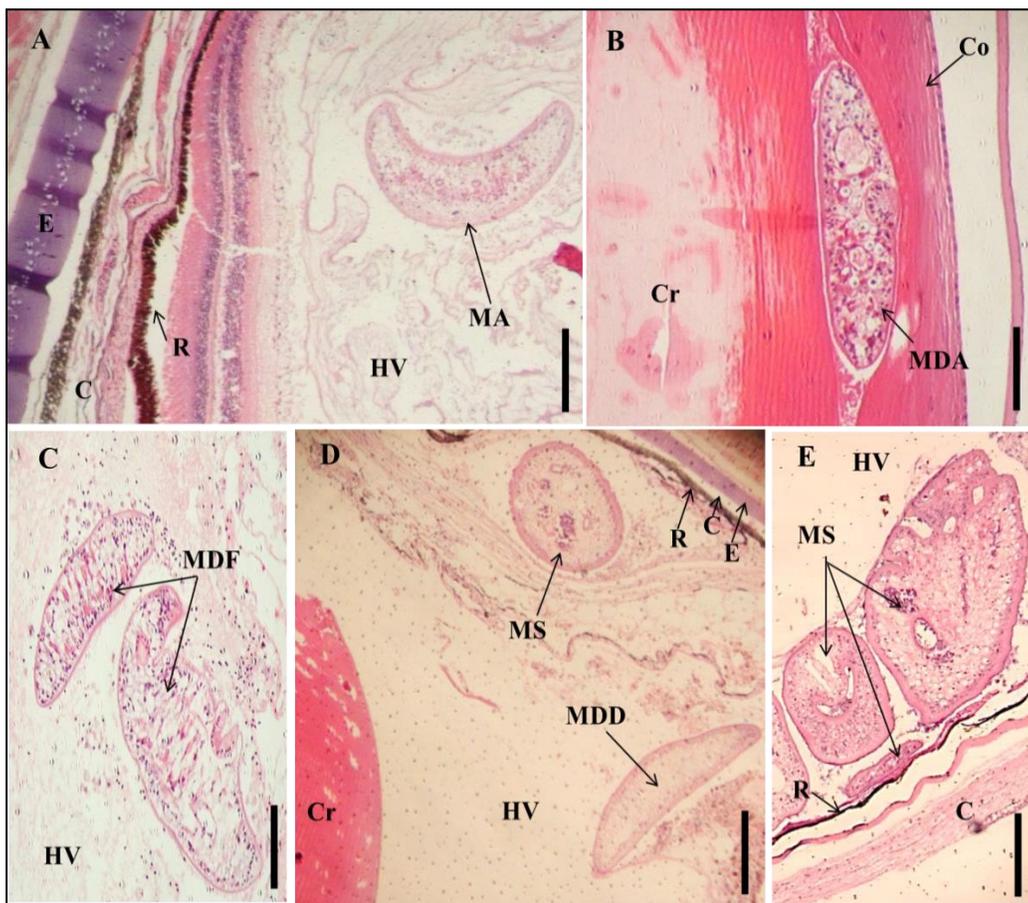


Figura 04. Cortes histológicos dos olhos de peixes hospedeiros coletados na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil, em junho de 2011. A. *Austrodiplostomum* sp. (MA) coletado no humor vítreo (HV) de *Cichla kelberi*. R = Retina, C = Coroide, E = Esclera. Barra = 16 μ m. B. *Diplostomum* sp. A (MDA) coletado na região do córtex (Co) do cristalino (Cr) de *Parauchenipterus galeatus*. Barra = 8 μ m. C. *Diplostomum* sp. F (MDF) coletado no humor vítreo (HV) de *Hoplias* aff. *malabaricus*. Barra = 5 μ m. D. *Diplostomum* sp. D (MDD) e *Sphinctrodiplostomum* sp. (MS) coletados no humor vítreo (HV) e retina (R), respectivamente, de *Steindachnerina insculpta*. C = Coroide, E = Esclera. Barra = 10 μ m. E. *Sphinctrodiplostomum* sp. (MS) coletado na retina de *Steindachnerina brevipinna*. HV = Humor Vítreo, C = Coroide. Barra = 14 μ m.

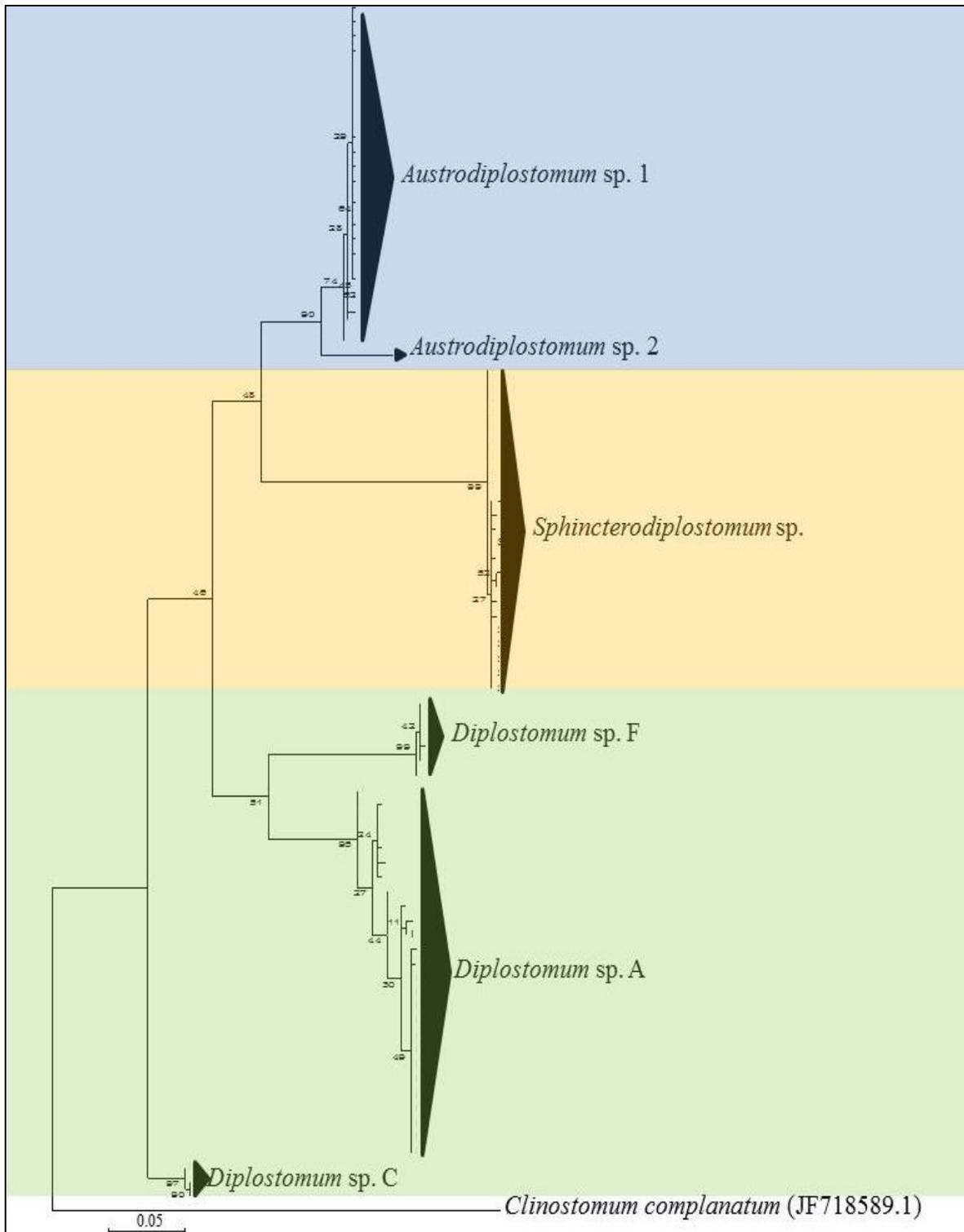


Figura 05. Análise Filogenética de Máxima Verossimilhança, calculada pela distância Kimura 2-parâmetros e deleção parcial de *gaps*, de espécies de diplostomídeos obtidos em olhos de peixes hospedeiros coletados em junho de 2011, na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil, utilizando *Clinostomum complanatum* (JF718589.1, Caffara et al., 2011) como grupo externo. A base dos triângulos é proporcional ao número de espécimes sequenciados.

Tabela 03. Variabilidade intra e interespecífica da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de diplostomídeos coletados em peixes da planície de inundação do alto rio Paraná em junho de 2011.

ESPÉCIES	1	2	3	4	5	6
1 <i>Austrodiplostomum</i> sp. 1	0,6% (0,0 - 2,4%)					
2 <i>Austrodiplostomum</i> sp. 2	6,7% (5,7 - 10,4%)	0,00%				
3 <i>Diplostomum</i> sp. A	17,3% (15,4 - 20,5%)	17,3% (16,8 - 19,0%)	1,2% (0,0 - 3,0%)			
4 <i>Diplostomum</i> sp. C	13,9% (11,4 - 16,3%)	16,1% (15,1 - 16,8%)	13,2% (11,2 - 14,2%)	0,00%		
5 <i>Diplostomum</i> sp. F	18,1% (16,7 - 20,6%)	23,2% (22,7 - 24,4%)	15,9% (14,4 - 16,9%)	19,5% (17,1 - 22,5%)	0,4% (0,0 - 1,1%)	
6 <i>Sphincterodiplostomum</i> sp.	19,6% (18,0 - 21,9%)	18,3% (17,5 - 19,6%)	21,4% (19,7 - 24,0%)	18,8% (16,9 - 20,6%)	23% (20,4 - 24,5%)	0,4% (0,0 - 1,0%)

Valores em destaque (cinza) representam a variabilidade intraespecífica; os demais valores representam a variabilidade interespecífica, ambas foram calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros.

Uma correspondência específica foi encontrada para as sequências de *Austrodiplostomum* sp. 1, sendo identificados como *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (número de acesso no GenBank: JX468066, O’Hear et al. (2014)), descritos em biguás (*Phalacrocorax auritus* (Lesson)) coletados no Texas, EUA. A similaridade entre estas sequências foi de 99,7% com variação intraespecífica entre 0 e 1,4%. Já para *Austrodiplostomum* sp. 2 nenhuma correspondência foi encontrada, sendo provável que esta espécie seja *A. compactum* (Lutz, 1928), amplamente reportada na área de estudo.

O morfotipo *Diplostomum* sp. A foi comprovadamente uma espécie distinta das demais congêneras tanto pela análise molecular, quanto pela morfologia, especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção, uma vez que ocorreram somente no cristalino (região do córtex) de *Parauchenipterus galeatus*. A análise molecular foi realizada com a utilização de 26 sequências (Tab. 02), com comprimento variando entre 329 e 591 nucleotídeos. O grande número de ramificações do clado desta espécie (Fig. 05) pode ser justificado pela alta variabilidade intraespecífica que atingiu até 3% (média de 1,2%). Quando estas sequências foram submetidas à pesquisa BLAST no GenBank nenhuma

correspondência foi encontrada, sendo que a espécie mais próxima foi *Alaria* sp. 2 (número de acesso no GenBank: JX904535; Locke et al. (2011)) porém com somente 87,3% de similaridade.

A análise molecular do morfotipo *Diplostomum* sp. C foi realizada com três sequências (Tab. 02), sendo que uma destas apresentou pequeno comprimento (195 nucleotídeos) quando comparada às demais (424 e 497 nucleotídeos). Esta foi comprovadamente uma espécie distinta das demais congênicas tanto pela análise molecular, quanto pela morfologia, especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção, uma vez que ocorreram somente no humor vítreo de *Hoplerythrinus unitaeniatus*, apresentando alta variabilidade interespecífica (Tab. 03). Nenhuma correspondência foi encontrada por meio da pesquisa BLAST no GenBank, sendo que a espécie com maior similaridade (87,7%) foi *Fibricola* sp. 1 (número de acesso no GenBank: JX904538; Locke et al. (2011)).

Para o morfotipo *Diplostomum* sp. F a caracterização molecular foi realizada com oito sequências (Tab. 02), que apresentaram comprimento variando entre 288 e 494 nucleotídeos. Esta também foi comprovadamente uma espécie distinta das demais congênicas tanto pela análise molecular, quanto pela morfológica, especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção, uma vez que ocorreram somente no humor vítreo de *Hoplias* aff. *malabaricus*. Todas as metacercárias deste tipo ocorriam no humor vítreo agrupadas no ligamento suspensório próximas ao cristalino (mas não em seu interior), apresentaram variabilidade intraespecífica média de 0,4% e alta variabilidade interespecífica (15,9% com relação a *Diplostomum* sp. A e 23,2% com *Austrodiplostomum* sp. 2) (Tab. 03). Quando pesquisado para semelhanças, a espécie mais próxima foi *Alaria*

sp. 2 (número de acesso no GenBank: JF904532, Locke et al. (2011)), com 86,3% de similaridade.

Com relação às metacercárias de *Sphincterodiplostomum* sp., a análise molecular foi realizada com 21 sequências (Tab. 02) obtidas exclusivamente com o *primer* MplatCOX1F/R, apresentando entre 323 e 551 nucleotídeos. Esta foi comprovadamente uma espécie distinta das demais congêneras tanto pela análise molecular, quanto pela morfologia, especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção, uma vez que ocorreram na retina de duas espécies congêneras: *Steindachnerina brevipinna* e *S. insculpta*. Apesar da alta variabilidade morfológica, a variabilidade intraespecífica média foi 0,4%. A maior similaridade encontrada pela pesquisa BLAST foi de 83,2% com a espécie *Diplostomum* sp. 1 (número de acesso no GenBank: HM064678, Locke et al. (2010a)).

Quando as distâncias evolutivas foram utilizadas para realizar uma dispersão em coordenadas principais, estas agruparam as espécies de parasitos (Fig. 06) na área estudada, apesar da baixa explicação (40,27% da variância, explicada pelos três primeiros autovalores), em especial, devido às particularidades relacionadas aos próprios parasitos e aos seus hospedeiros, tais como grau de infectividade e disponibilidade de hospedeiros no ambiente. Entretanto três grupos distintos de espécies foram formados e corresponderam ao gênero dos parasitos: *Austrodiplostomum*, *Diplostomum* e *Sphincterodiplostomum* (círculos) e ao sítio de infecção (recurso utilizado): cristalino, humor vítreo e retina (quadrados) (Fig. 06).

A especificidade das metacercárias de diplostomídeos aos hospedeiros e aos sítios de infecção foi avaliada nas sete espécies encontradas. Entretanto, os índices de distância taxonômica média (S_{TD}) e variância da diversidade taxonômica ($VarS_{TD}$) somente foram calculados para duas espécies de parasitos: *A. ostrowskiae* e *Sphincterodiplostomum* sp.,

uma vez que as demais espécies, caracterizadas pelo morfotipo (*Diplostomum* sp. D) e molecularmente foram encontradas em somente uma espécie de hospedeiro ($S_{TD} = 0$) (Tab. 02, Fig. 07).

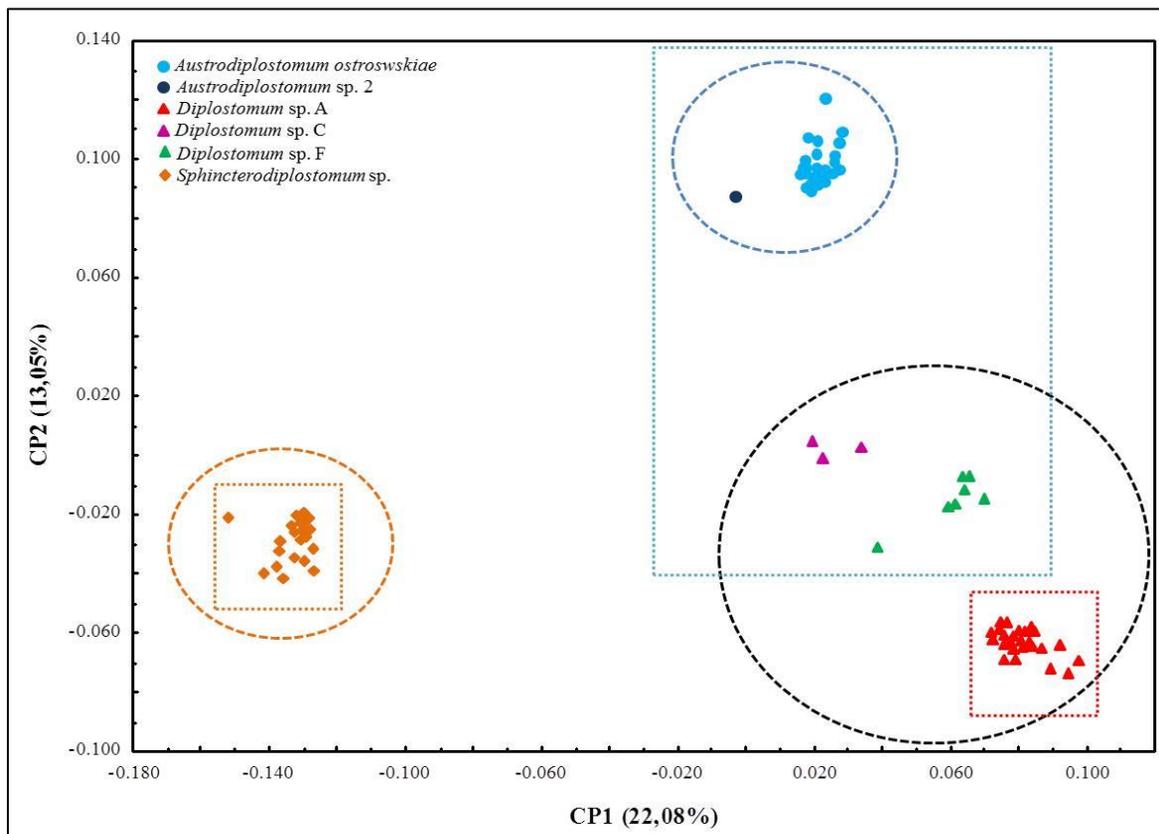


Figura 06. Dispersão dos escores das coordenadas principais calculados com as distâncias evolutivas das espécies de diplostomídeos coletadas em diferentes hospedeiros na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil, em junho de 2011. Círculos correspondem ao gênero dos parasitos: azul – *Austrodiplostomum*; laranja – *Sphincterodiplostomum*; preto – *Diplostomum*. Quadrados correspondem ao sítio de infecção: azul – humores aquoso e vítreo; vermelho – cristalino; laranja – retina.

Duas espécies de humor vítreo foram abundantes, *A. ostrowskiae* e *Diplostomum* sp. F. *Austrodiplostomum ostrowskiae* foi uma espécie generalista, uma vez que apresenta ampla gama de hospedeiros distantes filogeneticamente ($S_{TD} = 3,58$, máximo possível $S_{TD} = 4$) (Fig. 07), e a distribuição de suas metacercárias não foi uniforme, sendo a alta abundância registrada somente em *P. squamosissimus* (Tab. 02). Todas as demais espécies

registradas foram especialistas quanto ao hospedeiro e ao sítio de infecção explorado, inclusive *Sphinctrodiplostomum* sp., que possuiu dois hospedeiros congêneros ($S_{TD} = 1$) e por isso foi considerada especialista. As espécies *Austrodiplostomum* sp. 2, *Diplostomum* sp. C e *Diplostomum* sp. D foram consideradas raras, pois foram registradas em poucos indivíduos de somente uma espécie de hospedeiro (Tab. 02, Fig. 07).

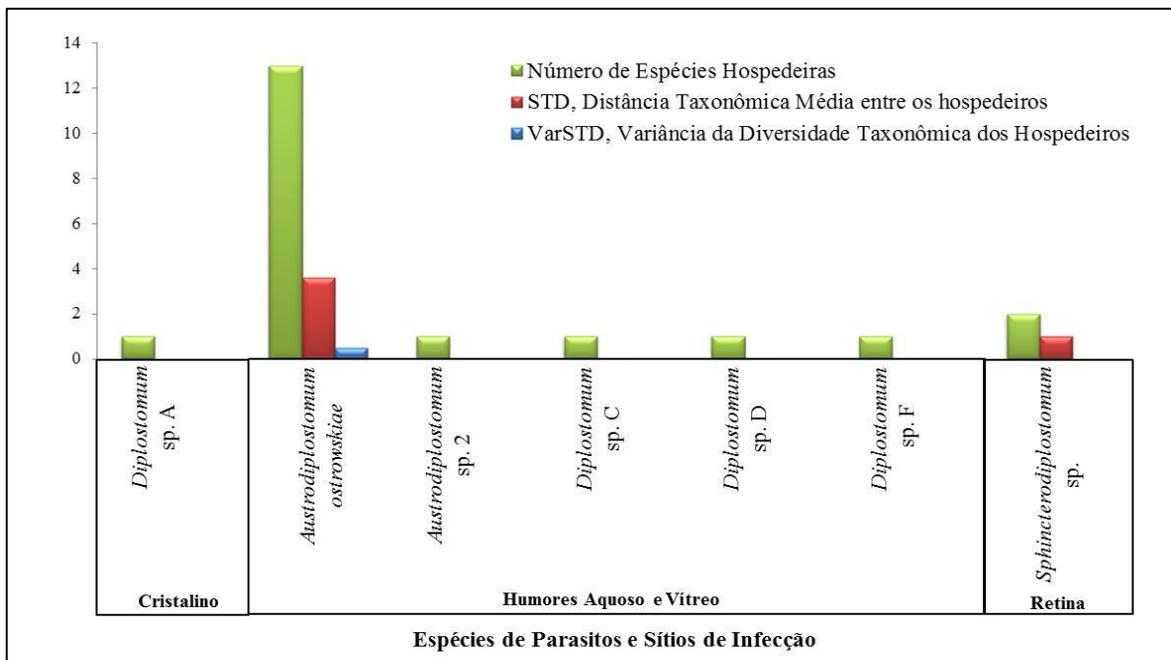


Figura 07. Especificidade ao hospedeiro e ao sítio de infecção das metacercárias de diplostomídeos coletadas em diferentes peixes hospedeiros em junho de 2011, na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil. Distância taxonômica média calculada de acordo com Poulin e Mouillot (2005), como sendo uma estimativa da afinidade filogenética dos hospedeiros. A espécie *Diplostomum* sp. D não foi caracterizada molecularmente. A legenda indica os parâmetros mensurados no eixo y.

As espécies que exploram o humor vítreo possuem uma gama de hospedeiros maior do que as espécies que exploram outros sítios de infecção (micro-habitat / recurso). Entretanto, nenhum dos parasitos observados no presente estudo apresentou competição pelo sítio de infecção, inclusive *A. ostrowskiae*, que foi generalista somente em relação ao hospedeiro. A única coocorrência parasitária, *Diplostomum* sp. D e *Sphinctrodiplostomum*

sp. em *S. insculpta*, parece não demonstrar competição, uma vez que os parasitos são especializados em recursos distintos.

2.4 DISCUSSÃO

Na América do Sul, os estudos de parasitos de peixes utilizando a ferramenta molecular são escassos (Gasques et al., 2013), o que dificulta interpretações sobre a real distribuição destes dentro e entre os ambientes. Os estudos de parasitos de peixes por meio de metodologias tradicionais haviam anteriormente registrado poucas espécies de diplostomídeos neste continente, em especial, *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928), em inúmeras espécies de hospedeiros em diferentes ecossistemas (Takemoto et al., 2009; Ramos et al., 2013). Contudo, o presente trabalho revelou a presença da espécie *A. ostrowskiae*, descrita na América do Norte, amplamente distribuída nos peixes da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. Este trabalho representou, ainda, um grande incremento no conhecimento sobre a diversidade de diplostomídeos em peixes neotropicais, uma vez que seis espécies foram caracterizadas molecularmente.

Os dados moleculares revelaram uma diversidade de metacercárias de diplostomídeos parasitando os olhos de peixes na planície de inundação do alto rio Paraná, demonstrando padrões distintos de especificidade e partição de recursos. Os resultados não demonstraram competição, já que poucas coocorrências foram registradas sem sobreposição na utilização do recurso explorado (disponível no sítio de infecção).

A maioria das espécies de parasitos foi específica ao hospedeiro, corroborando a hipótese testada, na qual parasito e hospedeiro evoluíram conjuntamente, o que propiciaria o reconhecimento do hospedeiro pelas fases infectantes (cercárias) e a seleção de sítios de infecção imunologicamente privilegiados (no caso, os olhos). Os tecidos explorados por

diplostomídeos são imunologicamente privilegiados, o que pode explicar por que as metacercárias não formam cistos como a maior parte dos Strigedea (Locke et al., 2010a). A ausência de sistema imunológico altamente ativo em certos tecidos (como o tecido nervoso) teria a função de prevenir mudanças patológicas severas que poderiam ser causadas por reações imunes, como a inflamação destes sítios (Stein-Streilein e Streilein, 2002).

Na planície de inundação do alto rio Paraná, os resultados demonstram que somente uma espécie, *Diplostomum* sp. A, foi encontrada parasitando o córtex do cristalino em *P. galeatus* (Fig. 4B), sendo considerada uma espécie específica ao hospedeiro e ao sítio de infecção. Já Locke et al. (2010b) registraram, em uma abordagem molecular, seis espécies de diplostomídeos parasitando o cristalino (lentes) de diversas espécies de peixes no Canadá, e postularam que as espécies que parasitam as lentes são generalistas devido a um princípio fisiológico. Isto é, os parasitos conseguem se estabelecer neste sítio de infecção (lentes) em várias espécies de hospedeiros, pois este é um compartimento avascularizado e com atividade imune restrita em vertebrados (Stein-Streilein e Streilen, 2002; Sitjà-Bobadilla, 2008).

Estes resultados podem apontar para diferentes pressões evolutivas nas regiões Neártica (Canadá) e Neotropical (Brasil), que levaram os parasitos de cristalino a diferentes graus de especificidade ao hospedeiro, mantendo a capacidade de explorar este recurso. De acordo com Krasnov e Poulin (2010) é esperado que com o aumento da latitude (regiões temperadas e polares) ocorra uma diminuição no nível de especialização, com consequente aumento do nicho e diminuição da riqueza de espécies, o que justificaria a baixa especificidade dos parasitos registrada por Locke et al. (2010b). Em contrapartida em regiões tropicais haveria um estreitamento de nicho, com consequente aumento de riqueza de espécies (correlação negativa entre latitude e riqueza). Os resultados do presente estudo

apontam que esta correlação negativa entre a riqueza de espécies (e seu nível de especialização) e a latitude pode não ser universal, conforme sugerido por Vázquez e Stevens (2004). Isto ocorreria, em especial, em organismos que estejam envolvidos em redes de interação assimétricas, como é o caso dos parasitos (Vázquez et al., 2007).

No Brasil, metacercárias de *A. compactum* já foram registradas no cristalino de várias espécies de peixes no Rio Paraná (Santos et al., 2012), entretanto estes autores não utilizaram ferramentas moleculares para a identificação específica das espécies. A utilização deste recurso (córtex do cristalino), além de fornecer nutrientes aos parasitos, forma uma barreira física adicional para as respostas imunes mediadas por células (Sharif et al., 1980; Reite e Evenson, 2006), o qual é um mecanismo importante nas defesas contra larvas de helmintos (Kreider et al., 2007).

Uma hipótese evolutiva associada à ocorrência de metacercárias nas lentes foi sugerida por Szidat (1969), que postula que a cápsula das lentes (córtex) pode proteger os parasitos de ações danosas do suco gástrico durante o processo de digestão nas aves hospedeiras definitivas, permitindo uma maior proporção de sobreviventes capazes de chegar ao intestino (sítio de infecção das aves). Isto seria uma enorme vantagem para parasitos troficamente transmitidos, como no caso das espécies aqui estudadas.

Na área estudada, as espécies especialistas quanto ao hospedeiro e especializadas em explorar o recurso humor vítreo, *Diplostomum* sp. C e *Diplostomum* sp. F, utilizaram hospedeiros da mesma Família, Erythrinidae, porém de espécies diferentes: *H. unitaeniatus* e *H. aff. malabaricus*, que apesar de demonstrarem baixa variação intraespecífica (entre 0,0 e 0,4%), apresentam, em média, 19% de variação interespecífica. Isto indica um processo coevolutivo entre estas associações, uma vez que o recurso explorado (substância presente no humor vítreo), provavelmente, é um composto comum a ambas as espécies de peixe

devido à proximidade filogenética. De acordo com Janz e Nylin (1998), na busca pelo mesmo recurso, um parasito pode ter uma hierarquia de preferência por hospedeiro, que ocorre uma vez que o custo para o parasito acessar o recurso explorado pode não ser idêntico entre todas as espécies de hospedeiros e mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Singer et al., 1992). Isto parece ser verdadeiro para ambas as espécies analisadas e pode explicar os diferentes valores de abundância registrados para estas espécies.

Um maior esforço amostral deve ser aplicado em *H. unitaeniatus* para: 1. verificar a real abundância de *Diplostomum* sp. C nesta população de hospedeiro; e 2. obter sequências moleculares representativas da espécie que possam ser utilizadas para analisar a variabilidade intraespecífica (aproximadamente 20 sequências individuais para a região COX1 em *Diplostomum* (Locke et al., 2010b)).

Sphincterodiplostomum Dubois, 1936 é monoespecífico e difere dos outros membros de Diplostomidae pela presença de uma invaginação dorsal com um esfíncter ao nível do testículo posterior (Lunaschi e Drago, 2006). No Brasil, este parasito já foi reportado parasitando outros peixes em diversos sítios de infecção: olhos de *Cyphocarrax gilbert* Quoy et Gaimard, 1824 (Abdallah et al., 2005), *S. insculpta* (Zago et al., 2013) e *Hoplias* aff. *malabaricus* (Takemoto et al., 2009); ovários de *S. brevipinna* (Ceschini et al., 2010); brânquias de *Prochilodus lineatus* (Lizama et al., 2006); e a cavidade visceral de *Hemisorubim platyrhynchos* (Guidelli et al., 2003) e *S. insculpta* (Zago et al., 2013).

Os resultados do presente estudo revelaram que as metacercárias de *Sphincterodiplostomum* sp. têm especificidade ao recurso explorado, no caso a retina, e, em geral, à hospedeiros filogeneticamente próximos (congenéricos). Porém, registros de ampla gama de hospedeiros e de sítios de infecção diferenciados podem ser um indicativo da existência de espécies crípticas neste gênero. A existência de espécies crípticas ocorre

devido à alta similaridade morfológica e parece ser amplamente distribuída entre os metazoários e as regiões geográficas (Pfenninger e Schwenk, 2007). Outro indicativo da presença de espécies crípticas neste gênero foi a obtenção, pelos autores, de uma sequência molecular de adulto, presente nas aves da planície de inundação do alto rio Paraná molecularmente, distinta das metacercárias (19% de variabilidade interespecífica, dados não apresentados neste trabalho).

As metacercárias de *Austrodiplostomum* spp. foram registradas em 14 hospedeiros, com diferentes distâncias filogenéticas. A baixa especificidade parece estar diretamente relacionada à capacidade de explorar um dado recurso, comum entre as espécies de hospedeiros (no caso os humores aquoso e vítreo), e à afinidade fisiológica entre parasitos e hospedeiros, uma vez que existiram espécies não hospedeiras, conforme sugerido por Locke et al. (2010a). A identificação molecular do morfotipo *Austrodiplostomum* sp. 1 como *A. ostrowskiae*, apesar de surpreendente, é justificada pela ausência de barreiras físicas em aves, em especial *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789), utilizadas como hospedeiros definitivos.

Outros autores descreveram a ocorrência de *A. compactum* em peixes da bacia hidrográfica do rio Paraná (Yamada et al., 2008; Takemoto et al., 2009; Zica et al., 2009; Santos et al., 2012; Ramos et al., 2013), bem como em outras regiões brasileiras (Azevedo et al., 2006; Carvalho et al., 2012). Entretanto, os presentes resultados demonstraram que a espécie que ocorre na maior parte dos peixes desta região é *A. ostrowskiae*, o que sugere identificação errônea devido à similaridade morfológica das formas metacercariais. Apesar de outra espécie deste morfotipo ter sido identificada em peixes, indicando a existência de espécies crípticas neste grupo, a obtenção de somente uma sequência com pequeno número de nucleotídeos e a inexistência de outras metacercárias para comparação morfológica,

impediram a identificação específica destes espécimes. Além disso, assim como em *Sphincterodiplostomum* sp., uma sequência de adulto das aves (dados não demonstrados no presente trabalho) foi obtida sem sucesso na conexão entre as fases, demonstrando que a diversidade críptica deste grupo pode ser muito maior.

Dronen (2009) revisando os espécimes utilizados na redescrição de *A. mordax* (realizada por Ostrowski de Núñez, 1982) observou que estes são na verdade *A. ostrowskiae*, e sinonimizou as duas espécies registradas na América do Sul, *A. compactum* e *A. mordax*. O encontro de três espécies molecularmente distintas (duas em peixes e uma em ave) na planície de inundação retoma a discussão sobre a distribuição e diversidade deste gênero, e pode ser um indicativo da existência de ambas as espécies previamente descritas para a América do Sul, reforçando a necessidade da identificação molecular em trabalhos de levantamentos de espécies (*check lists*). Portanto, este trabalho manterá a denominação *Austrodiplostomum* sp. 2, em virtude da ausência de outros espécimes para a comparação morfológica e molecular. Para a descoberta da diversidade deste gênero no Brasil, bem como sua distribuição, biologia, ecologia e patologia, a utilização da ferramenta molecular será imprescindível para a identificação específica.

De acordo com Rohde (1993), é necessário distinguir “especificidade”, que depende da intensidade e da frequência com que as espécies hospedeiras são infectadas, de “número de espécies de hospedeiro em que o parasito foi encontrado”. Hospedeiros representam recursos, e então uma definição operacional de especificidade ao hospedeiro idealmente deveria refletir a distribuição e a heterogeneidade do recurso (Nyman, 2009). Somado a isso, Brooks e McLennan (2002) sugeriram a existência de “falsos generalistas”, que são especializados em um recurso que é filogeneticamente de ampla distribuição. Este parece ser o caso das metacercárias de *A. ostrowskiae*, já que estas parecem não ser

especializadas em espécies particulares de hospedeiros (filogeneticamente relacionados), mas sim especializadas em recursos (humores aquoso e vítreo) que, de acordo com Nyman (2009), podem ser compartilhados por muitas espécies.

Os organismos interagem com o meio ambiente, apresentando plasticidade fenotípica, que é a capacidade de um genótipo se expressar em uma variedade de fenótipos sem alterar as frequências genotípicas da população (Poulin, 2007). Isto ocorreu com *A. ostrowskiae*, que mesmo dentro de um único hospedeiro, apresentou diferenças morfológicas que poderiam gerar identificações errôneas, sem o auxílio da ferramenta molecular. A plasticidade fenotípica fornece um mecanismo para o *ecological fitting* (Janzen, 1985), que explica como um parasito pode ser ecologicamente especializado, mas ainda ser capaz de trocar de hospedeiro. Se o recurso utilizado pelo parasito é amplamente distribuído entre muitos hospedeiros, então o parasito pode ter a vantagem de se estabelecer em uma ‘nova’ associação especializada sem o custo adicional que envolveria o desenvolvimento de novas habilidades (Brooks e McLennan, 2002).

Os resultados apresentados sugerem que: 1. a região *Barcodes* do DNA mitocondrial (COX1) é suficiente para a discriminação de espécies de Diplostomidae; 2. as metacercárias de diplostomídeos presentes nos olhos de peixes da planície de inundação são especialistas, em especial ao recurso explorado (‘falsos generalistas’); 3. existe uma diversidade críptica que merece futura exploração (sob a ótica molecular); 4. a descrição do sítio de infecção deve ser especificado como micro-habitat em estudos futuros (o que poderá necessitar de protocolos mais acurados de necropsia); e 5. o depósito de espécimes em álcool como procedimento metodológico padrão, em estudos futuros, para este grupo, viabilizando estudos moleculares posteriores.

Este estudo foi pioneiro no levantamento de dados moleculares destes parasitos no continente sul-americano. As informações aqui contidas poderão ser consideradas em estudos ecológicos na comunidade parasitária, os quais normalmente ignoram os estágios larvais e seu efeito sobre a comunidade de hospedeiros. Também poderão servir de subsídio para uma identificação inicial das fases larvais que infectam os olhos de peixes em ambientes naturais e de cultivo, nos quais a correta identificação é a primeira etapa para ações de manejo e controle.

REFERÊNCIAS

Abdallah, V.D., Azevedo, R.K., Luque, J.L.F., 2005. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do sairú *Cyphocharax gilbert* (Quoy e Gaimard, 1824) (Characiformes: Curimatidae) do rio Guandu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 14, 154–159.

Agosta, S.J., Janz, N., Brooks, D.R., 2010. How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. Zoologia 27(2), 151-162.

Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., Luque, J.L.F., 2006. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos de acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Perciformes: Cichlidae) do rio Gandu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 28(4), 403-411.

Bauer, O.N., Vladimirov, V.L., Mindel, N.V., 1964. New knowledge about the biology of Strigeata causing mass diseases of fish. In: Ergens, R., Rysavy, B. (Ed.), Parasitic worms and aquatic conditions. Academy of Sciences of the Czech Replubic, Prague, pp. 77-82.

Brooks, D.R., 1979. Testing the context and extent of host–parasite coevolution. *Syst. Zool.* 28, 299–307.

Brooks, D.R., McLennan, D.A., 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. University of Chicago Press, Chicago.

Brooks, D.R., León-Régagnon, V., McLennan, D.A., Zelmer, D., 2006. Ecological fitting as a determinant of the community structure of Platyhelminth parasites of anurans. *Ecology* 87(7), S76–S85.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.

Caffara, M., Locke, S.A., Gustinelli, A., Marcogliese, D.J., Fioravanti, M.L., 2011. Morphological and molecular differentiation of *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) metacercariae and adults. *J. Parasitol.* 97, 884–891.

Carvalho, A.R., Azevedo, R.K., Abdallah, V.D.; Luque, J.L.F., 2012. Metacercárias de Diplostomidae (Digenea: Diplostomoidea) em *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) do rio Guandu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 34(2), 233–239.

Ceschini T.L., Takemoto R.M., Yamada F.H., Moreira L.H.A., Pavanelli G.C., 2010. Endoparasites of *Steindachinerina brevipinna* (Eigenmann and Eigenmann, 1889), collected in the tributaries Corvo and Guairacá of Paranapanema River, Paraná State, Brazil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 32, 125–130.

Chappell, L.H., 1995. The biology of diplostomatid eye flukes of fishes. *J. Helminthol.* 69, 97–101.

Chappell, L.H., Hardie, L.J., Secombes, C.J., 1994. Diplostomiasis: the disease and host-parasite interactions. In: Pike, A.W., Lewis, J.W. (Ed.), *Parasitic Diseases of Fish*. Samara Publishing, Tresaith, pp. 59–86.

Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S., 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.* 14, 2247–2257.

Dias, M.L.G.G., 2002. Ciclo de vida e aspectos ecológicos de *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) (Trematoda: Clinostomidae). 76 f., il. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Estadual de Maringá, 2002.

Dronen, N.O., 2009. *Austrodiplostomum ostrowskiae* n. sp. (Digenea: Diplostomidae: Diplostominae) from the Double-crested Cormorant, *Phalacrocorax auritus* (Phalacrocoracidae) from the Galveston, Texas Area of the Gulf of Mexico, U.S.A. *Comp. Parasitol.* 76(1), 34-39.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.

Elder, J.F. Jr., Turner, B.J., 1995 Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* 70, 297–320.

Gasques, L.S., Souza, G.T.R., Graça, R.J., 2013. Das moléculas aos parasitos: a aplicação da biologia molecular nos estudos de Ictioparasitologia. In: Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M., Eiras, J.C. (Org.). *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. EDUEM, Maringá, pp. 149-167.

Georgieva, S., Soldánová, M., Pérez-Del-Olmo, A., Dangel, D.R., Sitko, J., Sures, B., Kostadinova, A., 2013. Molecular prospecting for European *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) reveals cryptic diversity. *Int. J. Parasitol.* 43, 57-72.

Gibson, D.I., Jones, A., Bray, R.A., 2002. Keys to the Trematoda. Volume 1. CAB International and the Natural History Museum, London.

Graça, W.J., Pavanelli, C.S., 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM, Maringá.

Guidelli G.M., Isaac A., Takemoto R.M., Pavanelli G.C., 2003. Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the Baía river, upper Paraná River floodplain, Brazil: Specific composition and ecological aspects. Braz. J. Biol. 63, 261–268.

Janz, N., Nylin, S. 1998. Butterflies and plants: a phylogenetic study. Evolution 52, 486-502.

Janzen, D.H., 1985. On ecological fitting. Oikos 45, 308-310.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111–120.

Krasnov, B.R., Poulin, R., 2010. Ecological properties of a parasite: species-specific stability and geographical variation. In: Morand, S., Krasnov, B.R. (Ed). The Biogeography of host-parasite interactions. Oxford University Press, New York, pp. 99-113.

Kreider T., Anthony, R.M., Urban Jr, J.F., Gause, W.C., 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. Curr. Opin. Immunol. 19, 448–453.

Legendre, P., Anderson, M.J., 1998. Program DistPCoA. Université de Montréal, Montréal.

Lizama M.A.P., Takemoto R.M., Pavanelli G.C., 2006. Parasitism influence on the hepato, splenosomatic and weight/length relation and relative condition factor of *Prochilodus*

lineatus (Valenciennes, 1836) (Prochilodontidae) of the Upper Paraná River Floodplain, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 15, 116–122.

Locke, S.D., McLaughlin, J.D., Marcogliese, D.J., 2010 a. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. Mol. Ecol. 19, 2813–2827.

Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Dayanandan, S., Marcogliese, D.J., 2010 b. Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences. Int. J. Parasitol. 40, 333–343.

Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Lapierre, A.R., Johnson, P.T., Marcogliese, D.J., 2011. Linking larvae and adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysteromorpha triloba* and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. J. Parasitol. 97:846–851.

Lunaschi L.I., Drago F.B., 2006. First report of adult specimens of *Sphincterodiplostomum musculosum* (Digenea, Diplostomidae). Parasitol. Int. 55, 7–10.

Martins, M.L., Fujimoto, R.Y., Nascimento, A.A., Moraes, F.R., 1999. Ocorrência de *Diplostomum* sp. Nordmann, 1832 (Digenea, Diplostomatidae) em *Plagioscion squamosissimus* Heckel, 1840, proveniente do Reservatório de Volta Grande, MG, Brasil. Acta Sci. Biol. Sci. 21 (2), 263-266.

Moszczyńska, A., Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Marcogliese, D.J., Crease, T.J., 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. Mol. Ecol. Res. 9, 75–82.

Niewiadomska, K., 1996. The genus *Diplostomum* – taxonomy, morphology and biology. Acta Parasitol. 41, 55–66.

Nuin, P.A.S., Wang, Z., Tillier, E.R.M., 2006. The accuracy of several multiple sequence alignment programs for proteins. *BMC Bioinf.* 7, 471. (<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-471>).

Nyman, T., 2009. To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant feeding insects. *Biol. Rev.* DOI: 10.1111/j.1469-185X.2009.00109.x

O’Hear, M., Pote, L., Yost, M., Doffitt, C., King, T., Panuska, C., 2014. Morphologic and molecular identifications of Digenetic Trematodes in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Mississippi Delta, USA. *J. Wildl. Dis.* 50(1), pp. 000–000. DOI: 10.7589/2012-10-249.

Ostrowski de Núñez, M., 1982. The life histories of *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970 and *D. (A.) mordax* (Szidat and Nani, 1951) n. comb. in South America. *Zool. Anz.* 208, 393-404.

Overstreet, R.M., Curran, S.S., 2004. Defeating diplostomoid dangers in USA catfish aquaculture. *Folia Parasitol.* 51, 153–165.

Pérez-Ponce de Leon, G., Nadler, S.A., 2010. Critical Comment: What we don’t recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *J. Parasitol.* 96, 453–464.

Pfenninger, M., Schwenk, K., 2007. Cryptic animal species are homogenously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evol. Biol.* 7, 121.

Poulin, R., 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton.

Poulin, R., Keeney, D.B., 2007. Host specificity under molecular and experimental scrutiny. *Trends Parasitol.* 24, 24–28.

Poulin, R., Morand, S., 2004. Parasite Biodiversity. Smithsonian Books, Washington.

Poulin, R., Mouillot, D., 2003. Parasite specialization from a phylogenetic perspective: a new index of host specificity. *Parasitology* 126, 473–480.

Poulin, R., Mouillot, D., 2005. Combining phylogenetic and ecological information into a new index of host specificity. *J. Parasitol.* 91 (3), 511–514.

Ramos, I.P., Franceschini, L., Zago, A.C., Zica, É.O.P., Wunderlich, A.C., Carvalho, E.D., Silva, R.J., 2013. New host records and a checklist of fishes infected with *Austrodiplostomum compactum* (Digenea: Diplostomidae) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22 (4), 511-518.

Reite, O.B., Evenson, O., 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 192–208.

Rohde, K., 1993. Ecology of marine parasites. An introduction to marine parasitology. CAB International, London.

Santos, R.S., Marchiori, N., Santarem, V.A., Takahashi, H.K., Mourino, J.L.P., Martins, M.L., 2012. *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Digenea, Diplostomidae) in the eyes of fishes from Paraná River, Brazil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 34 (2), 225-231.

Shariff, M., Richards, R.H., Sommerville, C., 1980. The histopathology of acute and chronic infections of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson with eye flukes, *Diplostomum* spp. *J. Fish Dis.* 3, 455–465.

Singer, M.C., Ng, D., Thomas, C.D., 1992. Rapidly evolving associations among oviposition preferences fail to constrain evolution of insect diet. *Am. Nat.* 139, 9–20.

Sitjà-Bobadilla, A., 2008. Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 358–372.

Souza, G.T.R., Machado, M.H., Dias, M.L.G.G., Yamada, F.H., Pagotto, J.P.A., Pavanelli, G.C., 2008. Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil, e sua potencialidade como hospedeiros intermediários. *Acta Sci. Biol. Sci.* 30(2), 309-314.

STATSOFT INC. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1.2005. (www.statsoft.com).

Stein-Streilein, J., Streilein, J.W., 2002. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int. Rev. Immunol.* 21, 123–152.

Szidat, L., 1969. Structure, development, and behavior of new strigeatoid metacercariae from subtropical fishes of South America. *J. Fish. Res. Board Can.* 26, 753–786.

Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., Lizama, M.A.P., Lacerda, A.C.F., Yamada, F.H., Moreira, L.H.A., Ceschini, T.L., Bellay, S., 2009. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Braz. J. Biol.* 69, 691–705.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Valtonen, E.T., Gibson, D.I., 1997. Aspects of the biology of diplostomid metacercarial (Digenea) populations occurring in fishes in different localities of northern Finland. *Ann. Zool. Fennici* 34, 47–59.

Vázquez, D., Stevens, R.D., 2004. The latitudinal gradient in niche breadth: concepts and evidence. *Am. Nat* 164 , E1–E19.

Vázquez, D.P., Melián, C.J.; Williams, N.M., Blüthegen, N., Krasnov, B.R., Poulin, R., 2007. Species abundance and asymmetric interaction strength in ecological networks. *Oikos* 116, 1120-1127.

Vilas, R., Criscione, C.D., Blouin, M.S., 2005. A comparison between mitochondrial DNA and ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131, 839–846.

Violante-González, J., García-Varela, M., Rojas-Herrera, A., Guerrero, S.G., 2009. Diplostomiasis in cultured and wild tilapia *Oreochromis niloticus* in Guerrero State, Mexico. *Parasitol. Res.* 105, 803–807.

Yamada, F.H., Moreira, L.H.A., Ceschini, T.L., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2008. Novas ocorrências de metacercária de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Platyhelminthes: Digenea) parasito de olhos de peixes da bacia do rio Paraná. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 163-166.

Zago, A.C., Franceschini, L., Ramos, I.P., Zica, E.O.P., Wundelich, A.C., Carvalho, E.D., Silva, R.J., 2013. *Sphincterodiplostomum musculosum* (Digenea, Diplostomidae) infecting *Steindachnerina insculpta* (Characiformes, Curimatidae) in the Chavantes Reservoir, Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 98–103.

Zica, E.O.P., Santos, K.R., Ramos, I.P., Zanatta, A.S., Carvalho, E.D., Silva, R.J., 2009. First case of an infection of the metacercariae of *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Digenea, Diplostomidae) in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes: Loricariidae). *Pan Am. J. Aquat. Sci.* 4, 35-38.

3 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FLUXO GÊNICO DE *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (DIGENEA: DIPLOSTOMIDAE) EM DIFERENTES ESCALAS GEOGRÁFICAS

RESUMO

Austrodiplostomum ostrowskiae é um parasito amplamente distribuído, sendo que suas metacercárias ocorrem em peixes de vários rios na América do Sul. A hipótese de adaptação local foi testada, para o nível de variação genética intraespecífica, para analisar a existência de fluxo gênico dos parasitos entre diferentes hospedeiros nestas áreas, ocasionada pela migração dos hospedeiros definitivos. Os parasitos foram identificados molecularmente pela região COX1 do DNA mitocondrial e sua estrutura genética populacional foi avaliada, em escala regional e continental, utilizando uma Análise de Variância Molecular (AMOVA). Somente *A. ostrowskiae* foi comum entre as regiões amostradas (Bacias Hidrográficas Amazonas e Paraná, e cultivo no Tocantins), apresentando baixa especificidade ao hospedeiro peixe, sendo encontrado inclusive em uma espécie híbrida. A AMOVA não demonstrou estruturação genética em nenhuma escala, uma vez que como parasitos alogênicos, *Austrodiplostomum* spp. apresenta alto fluxo gênico e baixa variação genética intraespecífica entre os ambientes, o que causa a ausência de estrutura genética populacional e alta miscigenação na América do Sul. O baixo tempo evolutivo destas associações pode diminuir a estrutura genética populacional, portanto estas devem ser acompanhadas na tentativa de se conhecer fatores preditores de deriva genética e fluxo gênico entre as populações de parasitos em cenários alterados, seja pela ação humana direta (obras de engenharia) ou indireta (mudanças climáticas).

Palavras-chave: América do Sul; COX1; parasito generalista; peixes; ciclo de vida, AMOVA.

POPULATION GENETIC STRUCTURE AND GENE FLOW OF *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (DIGENEA: DIPLOSTOMIDAE) IN DIFFERENT GEOGRAPHICAL SCALES

ABSTRACT

Austrodiplostomum ostrowskiae has a wide geographic distribution, and their metacercariae occur in fishes from several rivers on the South America. The hypothesis of local adaptation was tested to the level of intraspecific genetic variation, to analyze the existence of a parasite gene flow between different hosts on these areas, caused by the migration of definitive hosts. Parasites were identified using COX1 region and their population genetic structure was evaluated by Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Just *A. ostrowskiae* was recognized in all sampled regions (Amazon and Paraná River basins and a farm fish in Tocantins State), showing low specificity to fish host, their presence was registered even in a hybrid species. AMOVA did not show genetic organization, usually alogenic parasites, such as *A. ostrowskiae*, present high gene flow and low intraspecific genetic variation between the sampled environments, which cause the absence of a genetic organization and a high miscegenation on the South America parasite populations. The short evolutionary time of these interactions may decrease the population genetic structure, therefore these associations should be observed on the attempt to develop predicting factors of genetic drift and gene flow between these parasite populations on scenarios altered by direct (engineer constructions) or indirect human actions (climatic changes).

Keywords: South America; COX1; generalist parasite; fishes; life cycle, AMOVA.

3.1 INTRODUÇÃO

Em ambientes fragmentados, as pressões seletivas que atuam em hospedeiros e seus parasitos podem diferir entre os locais (Thompson, 1994). Isto pode resultar na implementação de adaptação local: o grau de interação entre parasitos e hospedeiros é maior quando ambos estão em ambientes simpátricos (coocorrência de parasitos e hospedeiros) do que em condições alopátricas (hospedeiros e parasitos isolados geograficamente) (Gandon et al., 1996). Em escala geográfica, a teoria de adaptação local postula que a estrutura populacional espacial de parasitos e hospedeiros, suas taxas de dispersão e diferenças na demografia direcionariam a coevolução hospedeiro-parasito causando um mosaico geográfico de pontos com altas e baixas taxas coevolutivas (*hotspots* e *coldspots*) (Thompson, 1994; Lively, 1999).

Aliado a isto, características do ciclo de vida dos parasitos, incluindo o modo de transmissão, a complexidade do ciclo e a especificidade ao hospedeiro influenciam a estrutura genética das populações parasitárias (Barrett et al., 2008). O grau de especificidade aos hospedeiros, em especial, pode influenciar a estrutura genética de parasitos afetando os seus padrões de fluxo gênico entre as espécies de hospedeiros (Nadler, 1995; Criscione et al., 2005; Poulin e Keeney, 2008). Deste modo, altos níveis de especificidade ocasionam diferenciação genética pela limitação do fluxo gênico entre as espécies de hospedeiros (Archie e Ezenwa, 2011). Por outro lado, baixos níveis de especificidade resultam em altas taxas de fluxo gênico entre as espécies hospedeiras e poucas diferenças genéticas entre os parasitos que infectam diferentes hospedeiros (Archie e Ezenwa, 2011).

O fluxo gênico pode introduzir variação adaptativa, então, diferentes taxas de migração podem modificar a assimetria das taxas evolutivas dos hospedeiros e parasitos

(Kaltz e Shykoff, 1998), ou tornar a adaptação local improvável (Lively, 1999). Alguns fatores podem ocasionar a diminuição na diferenciação genética entre populações locais de parasitos, entre estes a presença de hospedeiros móveis no ciclo de vida (Nadler, 1995). A mobilidade dos hospedeiros tem sido proposta como o fator determinante do fluxo gênico dos parasitos, uma vez que estes normalmente são dependentes da dispersão pelo hospedeiro (Blouin et al., 1995). Em parasitos com ciclos de vida complexos (alogênicos), incluindo múltiplas espécies de hospedeiros, o fluxo gênico normalmente é determinado pelo hospedeiro com a maior taxa de dispersão (Prugnolle et al., 2005).

Este estudo justifica-se: 1. pela ampla distribuição geográfica de *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009, sendo que muitos trabalhos têm registrado a presença de metacercárias deste gênero em diferentes espécies de peixes e sistemas na América do Sul (Takemoto et al., 2009; Morais et al., 2011; Ramos et al., 2013; Corrêa et al., 2014); 2. por possuir ciclo de vida complexo, envolvendo moluscos do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, onde ocorre a reprodução assexuada produzindo cercárias, que infectam ativamente peixes (Ostrowski de Núñez, 1982; Pinto e Melo, 2013), com o desenvolvimento das metacercárias que alcançam o hospedeiro definitivo via cadeia trófica; 3. por apresentar hospedeiro definitivo com alta mobilidade (aves), uma vez que em seu estágio adulto é encontrado no intestino de biguás (*Phalacrocorax* Brisson, 1760) no continente americano (Dronen, 2009; O’Hear et al., 2014).

O presente trabalho estendeu a hipótese de adaptação local para o nível de variação genética intraespecífica, objetivando testar a existência de fluxo gênico dos parasitos entre diferentes hospedeiros de bacias hidrográficas da América do Sul ocasionada pela migração das aves (hospedeiros definitivos). A predição é que, como parasitos alogênicos, os espécimes de *Austrodiplostomum* apresentarão alto fluxo gênico e

baixa variação genética intraespecífica entre os ambientes amostrados, demonstrando ausência de estrutura genética populacional e alta miscigenação na América do Sul.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes foram coletados entre 2011 e 2013, em cinco pontos nas seguintes bacias hidrográficas: Amazônica (Iquitos, Peru e Manaus, Brasil) e Paraná (Porto Rico, PR, Brasil e Santa Fé, Argentina) (Fig. 01). Além destes, uma espécie híbrida de peixe, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) x *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870), foi coletada de criadouro comercial localizado próximo à bacia do rio Tocantins (Brasil) (Fig. 01). Estes peixes foram coletados pela EMBRAPA Aquicultura Tocantins e as amostras foram enviadas, fixadas em álcool 95° GL, ao laboratório de Ictioparasitologia do Nupélia para necropsia e identificação. A Tabela 01 contém as coordenadas de cada local amostrado bem como as espécies de peixes coletados em cada ponto. As coletas em território nacional foram realizadas sob autorização do órgão ambiental competente (SISBIO nº 38165-1/2013). As distâncias entre os locais amostrados variaram entre 1.230 km (dentro na Bacia do Paraná) e 3.371 km (entre Santa Fé – Argentina e Iquitos – Peru).

Os peixes foram sacrificados por secção medular, sob autorização do Conselho de Ética da Universidade Estadual de Maringá (CEAE – Parecer 123/2010) e identificados segundo chaves de identificação específica para cada grupo. Os dados individuais de comprimento padrão, peso, sexo e local de amostragem foram anotados como informação adicional, para análises posteriores sobre a distribuição dos hospedeiros.



Figura 01. Localização dos pontos de coleta nas bacias hidrográficas da América do Sul. Bacia Amazônica: A. Iquitos, Peru; B. Manaus, AM, Brasil. C. Bacia Tocantins, Palmas, TO, Brasil. Bacia Paraná: D. Planície de inundação do alto Rio Paraná, PR/MS, Brasil; E. Rio Paraná, Santa Fé, Argentina. Fonte: Google Maps.

O exame parasitológico teve início com a remoção do globo ocular dos peixes, que foram mantidos em solução salina a 0,65% até a necropsia ou acondicionados em etanol 70° GL (em amostras internacionais). O globo ocular foi seccionado e subdividido nas seguintes regiões: humor aquoso, cristalino, humor vítreo e retina.

Os parasitos recolhidos foram fixados em etanol 70° GL e mantidos em etanol 95° GL, sob refrigeração. A classificação inicial foi realizada pelo morfotipo, utilizando a chave de Gibson et al. (2002), e pelo sítio de infecção específico para posterior análise molecular. Todas as metacercárias inseridas neste estudo foram identificadas

molecularmente. Os índices parasitológicos foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

Para medir a especificidade das metacercárias de *Austrodiplostomum* aos peixes hospedeiros locais foram usados o número de espécies hospedeiras, obtido no presente estudo e dois índices filogenéticos. A diversidade filogenética dos hospedeiros foi estimada usando S_{TD} , a distância média taxonômica entre todas as espécies de hospedeiros infectadas por *A. ostrowskiae*, e sua variância associada $VarS_{TD}$, a qual reflete a heterogeneidade das relações filogenéticas entre os hospedeiros (Poulin e Mouillot, 2003). Estes índices foram calculados utilizando o programa TaxoBiodiv2 (Poulin e Mouillot, 2005) (<http://www.otago.ac.nz/parasitegroup/downloads.html>).

A hierarquia taxonômica do hospedeiro usada para o cálculo dos índices de especificidade inclui as categorias Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, baseado em Graça e Pavanelli (2007) e chaves específicas para cada grupo. Usando estes níveis taxonômicos, o valor máximo do índice S_{TD} pode ser 4 (quando todos os hospedeiros pertenceram a diferentes ordens). O valor de $S_{TD}=1$ significa que todas as espécies de hospedeiros para uma dada espécie de parasito são congênicas e o valor de $S_{TD}=0$ significa que existe somente um hospedeiro conhecido para uma dada espécie de parasito. Todos estes índices foram calculados após a identificação molecular dos parasitos.

Os espécimes de parasitos, coletados nas cinco localidades amostradas, foram utilizados para análise molecular, entretanto, somente *A. ostrowskiae* foi comum a todas as regiões amostradas. A região do citocromo oxidase 1 do DNA mitocondrial foi escolhida para a identificação destes parasitos pois exhibe taxas de variação maiores do que as encontradas na região do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (ITS) e pode servir como um marcador mais sensível para a detecção de espécies (Vilas et al., 2005). A

extração, a amplificação e o sequenciamento desta região foram realizados no Centro Canadense para DNA Barcoding (Canadian Centre for DNA Barcoding – CCDB) em Guelf (Ontário, Canadá), utilizando os *primers* Plat-diploCOX1F/R e MplatCOX1F/R, seguindo o protocolo descrito por Moszczyńska et al. (2009). Informações adicionais sobre os espécimes, tais como cromatogramas originais, hospedeiro, local de amostragem e fotografias (em alguns casos) estão disponíveis no site <http://www.barcodinglife.org>, no projeto DIPSA.

O DNA coletado dos espécimes de *Austrodiplostomum* foi usado como uma ferramenta para a delimitação de espécies, para excluir a possibilidade de utilização de espécies crípticas deste morfotipo nesta análise, o que descaracterizaria a estrutura genética populacional. Isto foi necessário já que as metacercárias desta família são difíceis de serem identificadas em nível específico somente com métodos morfológicos tradicionais (Locke et al., 2010). Na maioria dos casos, os cromatogramas F e R (*forward* e *reverse*, respectivamente) foram alinhados, requerendo pouca edição, sendo obtidas sequências *consensus* para cada espécime. O objetivo desta prática foi obter sequências COX1 do maior número de metacercárias. O programa Chromas Lite 2.1 (www.techneylum.com.au) foi utilizado para a visualização dos cromatogramas como ferramenta auxiliar nas edições das sequências. O alinhamento foi realizado utilizando o método MUSCLE (Edgar, 2004) e as divergências evolutivas (intraespecíficas) foram calculadas com a distância Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) com deleção parcial de *gaps*, com o auxílio do programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). As sequências serão depositadas no GenBank *a posteriori*.

Para a confirmação da identificação destas metacercárias uma árvore filogenética foi construída, pelo Método de Máxima Verossimilhança, calculada pela distância Kimura

2-parâmetros entre as sequências COX1 (Kimura, 1980), com alinhamento parcial, sendo a robustez avaliada pelo Método de Bootstrap com 1000 replicações, utilizando o programa MEGA 5.0, e *Hysteromorpha triloba* (Locke et al., 2011; nº de acesso no GenBank = JF769476.1) como grupo externo. Somente foram utilizados espécimes identificados, por meio de pesquisa BLAST no GenBank, como *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (nº de acesso no GenBank = JX468066, O’Hear et al. (2014)).

Os digenéticos amostrados neste estudo têm um estágio de reprodução assexuada nos moluscos, sendo que as cercárias são liberadas no corpo d’água e infectam os peixes. Conseqüentemente, muitos parasitos do hospedeiro peixe, da mesma localidade, podem ter o mesmo genótipo. Para evitar que estes ‘clones’ aumentem artificialmente a subdivisão genética entre as subpopulações, as metacercárias foram selecionadas do maior número possível de hospedeiros individuais e enviadas para sequenciamento. Para avaliar a presença de clones, sequências dos parasitos obtidos em cada hospedeiro foram alinhadas entre si para análise das divergências nucleotídicas (número de diferenças entre os haplótipos).

Para entender como a variação genética das metacercárias de *A. ostrowskiae* estava distribuída entre as subpopulações foi utilizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992), com o programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2010). Esta análise é baseada na variância da frequência genética e leva em consideração o número de mutações em diferentes *loci* (Wang et al., 2006). O grau de correlação genotípica foi estimado hierarquicamente, pelo programa Arlequin 3.5, sob duas perspectivas: (i) em escala regional - dentro e entre as subpopulações encontradas nos três subsistemas da planície de inundação do alto rio Paraná (Baía, Ivinhema e Paraná) e dentro e entre as

ordens dos peixes hospedeiros registrados; e (ii) em escala continental - dentro e entre as subpopulações dos cinco ambientes amostrados.

O número de haplótipos (h), as diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π), a determinação dos haplótipos, a frequência haplotípica, a partição da diversidade genética pelo cálculo da AMOVA, e a estruturação populacional pelo F_{ST} par a par foram calculados para os locais amostrados (planície de inundação – em escala geográfica regional e América do Sul – em escala geográfica continental), com o auxílio do programa Arlequin 3.5. A rede de haplótipos foi baseada no algoritmo *median-joining* (Bandelt et al., 1999), gerada pelo programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd – <http://www.fluxus-engineering.com>).

3.3 RESULTADOS

Dos 1199 peixes coletados, 18 espécies caracterizaram-se como hospedeiras para *Austrodiplostomum* na América do Sul (Fig. 02), incluindo a espécie híbrida coletada em criadouro no Estado de Tocantins. Uma espécie de hospedeiro, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), foi comum em duas bacias hidrográficas analisadas: Amazônica e Paraná. Apesar de presente na Bacia do Paraná, *Astronotus crassipinnis* (Agassiz, 1831) só foi encontrada parasitada na Bacia Amazônica, entretanto apresentou baixas prevalência e intensidade (Tab. 01).

Das 963 metacercárias recolhidas no humor vítreo, 68 foram submetidas à caracterização molecular, destas 42 apresentaram mais de 300 pb e foram identificadas como *A. ostrowskiae*, permitindo sua utilização neste trabalho (Tab. 01).

A especificidade de *A. ostrowskiae* foi avaliada nas duas bacias hidrográficas analisadas. No Tocantins, estes índices não foram calculados uma vez que somente uma

espécie de peixe foi analisada ($S_{TD} = 0$). *Austrodiplostomum ostrowskiae* é uma espécie generalista quanto ao hospedeiro em ambos os sistemas, uma vez que explora ampla gama de espécies distantes filogeneticamente (S_{TD} Total = 3,37) (Fig. 03), mas é especialista em relação ao recurso utilizado (humores aquoso e vítreo); além disso, a distribuição de suas metacercárias não foi uniforme, sendo a alta abundância registrada somente em *P. squamosissimus* (Tab. 01).

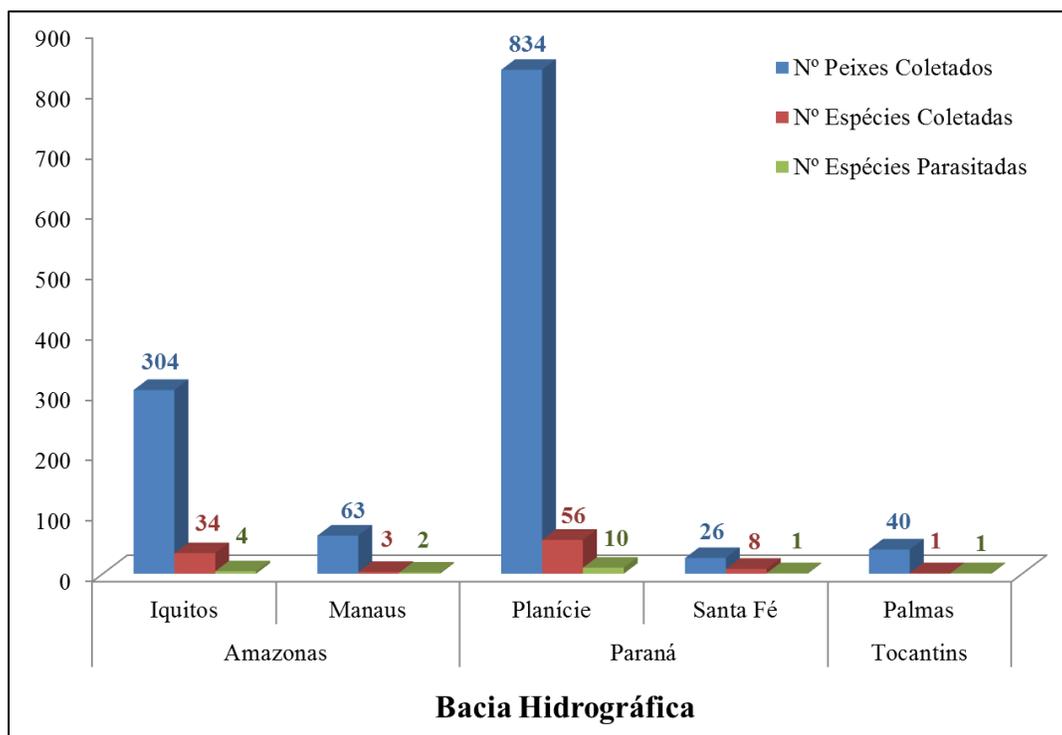


Figura 02. Número de peixes analisados, número de espécies coletadas e número de peixes parasitados em diferentes Bacias Hidrográficas na América do Sul, entre 2011 e 2013. A legenda indica os parâmetros mensurados no eixo y.

A análise filogenética de máxima verossimilhança não demonstrou clados relacionados à região geográfica (Fig. 03), portanto com relação a esta característica as sequências estavam distribuídas aleatoriamente na árvore. A sequência SL1_PR ficou separada das demais já que é um haplótipo único com alta diversidade nucleotídica (Tab. 02).

Tabela 01. Índices parasitológicos para as metacercárias de *Austrodiplostomum ostromowskiae* coletados em peixes de diferentes bacias hidrográficas na América do Sul, entre 2011 e 2013. NA= número de peixes amostrados; Prev (%) = prevalência; P = Número total de parasitos; IM = Intensidade Média (\pm desvio padrão); AM = Abundância Média (\pm desvio padrão); Nseq = número de seqüências moleculares obtidas para cada hospedeiro registrado.

Bacia Hidrográfica	Local de Coleta	Hospedeiros	NA	Prev (%)	P	IM	AM	Nseq
<i>Amazônica</i>		<i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	30	3,3	2	2 ($\pm 0,0$)	0,07 ($\pm 0,58$)	2
	Iquitos - Peru (3°43'S 73°15'O)	<i>Pimelodus blochii</i> Valenciennes, 1840	16	6,3	1	1,0 ($\pm 0,0$)	0,06 ($\pm 0,20$)	1
		<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840)	12	58,3	95	13,57 ($\pm 16,58$)	7,92 ($\pm 17,00$)	2
		<i>Satanoperca jurupari</i> (Heckel, 1840)	17	23,5	16	4,0 ($\pm 2,05$)	0,94 ($\pm 2,04$)	3
	Manaus/AM -Brasil (3°06'S 60°01'O)	<i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	28	3,7	3	3,0 ($\pm 0,0$)	0,11 ($\pm 0,31$)	1
		<i>Symphysodon aequifasciatus</i> Pellegrin, 1904	35	2,9	2	2,0 ($\pm 0,0$)	0,06 (0,36)	1
		<i>Acestrorhynchus lacustris</i> (Lütken, 1875)	37	8,1	8	2,7 ($\pm 1,69$)	0,22 ($\pm 0,88$)	1
		<i>Cichla kelberi</i> Kullander & Ferreira, 2006	37	54,1	76	3,8 ($\pm 2,8$)	2,05 ($\pm 2,85$)	4
		<i>Geophagus cf. proximus</i> (Castelnau, 1855)	14	64,3	43	4,8 ($\pm 3,26$)	3,07 ($\pm 3,60$)	2
		<i>Hemisorubim platyrhynchos</i> (Valenciennes, 1840)	3	66,7	2	1 ($\pm 0,0$)	0,67 ($\pm 0,57$)	2
<i>Paraná</i>	Planície de inundação - Porto Rico/PR - Brasil (22°45'S 53°30'O)	<i>Loricariichthys platymetopon</i> Isbrücker & Nijssen, 1979	34	5,9	8	4,0 ($\pm 3,0$)	0,24 ($\pm 1,20$)	1
		<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840)	6	66,7	563	281,5 ($\pm 105,5$)	93,83 ($\pm 149,19$)	5
		<i>Pterygoplichthys ambrossetti</i> (Holmberg, 1893)	106	8,5	14	1,6 ($\pm 1,26$)	0,13 ($\pm 0,57$)	2
		<i>Satanoperca pappaterra</i> (Heckel, 1840)	1	100	3	3,0 ($\pm 0,0$)	3 ($\pm 0,00$)	2
		<i>Schizodon borellii</i> (Boulenger, 1900)	41	12,2	9	1,8 ($\pm 0,75$)	0,22 ($\pm 0,65$)	1
		<i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider, 1801)	25	28,0	14	2 ($\pm 1,98$)	0,56 ($\pm 1,41$)	4
	Santa Fé - Argentina (31°38'S 69°42'O)	<i>Paraloricaria vetula</i> (Valenciennes, 1835)	8	62,5	8	4,0 ($\pm 2,82$)	1,33 ($\pm 2,21$)	3
	Palmas/TO - Brasil (10°12'S 48°21'O)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (Linnaeus, 1766) x <i>Leiarius marmoratus</i> (Gill, 1870) *	40	100	96	13,71 ($\pm 2,0$)	13,71 ($\pm 2,00$)	5

* Dados cedidos pela EMBRAPA Aquicultura – Unidade Tocantins.

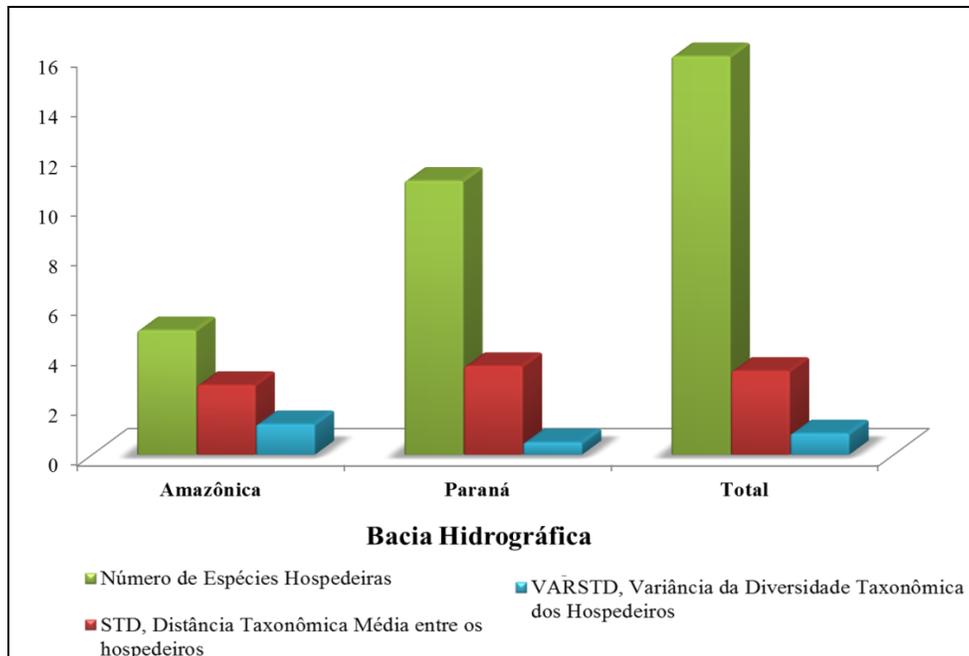


Figura 02. Especificidade ao hospedeiro de *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletadas em diferentes Bacias Hidrográficas na América do Sul, entre 2011 e 2013. Distância taxonômica média calculada de acordo com Poulin e Mouillot (2005), como sendo uma estimativa da afinidade filogenética dos hospedeiros. A legenda indica os parâmetros mensurados no eixo y.

A variabilidade intraespecífica de *A. ostrowskiae* dentro e entre as subpopulações (Tab. 03) demonstrou que a planície de inundação do alto rio Paraná apresenta as maiores taxas de divergência evolutiva, entretanto isto pode ser um reflexo do maior número de sequências e hospedeiros registrados nesta região. Por este motivo as amostras foram divididas entre os subsistemas da planície de inundação para análise da estrutura populacional destes parasitos em menor escala geográfica (regional).

A comparação genética entre as subpopulações presentes na planície de inundação do alto rio Paraná identificou 17 haplótipos (Tab. 04) com 26 substituições (Tab. 05), produzindo no total 561 *loci* compartilhados dos 587 existentes no conjunto amostral. A base nitrogenada mais frequente nestes espécimes foi a Timina e a variabilidade molecular foi devida, principalmente, ao número de transições (em média oito em cada subsistema analisado) (Tab. 05).

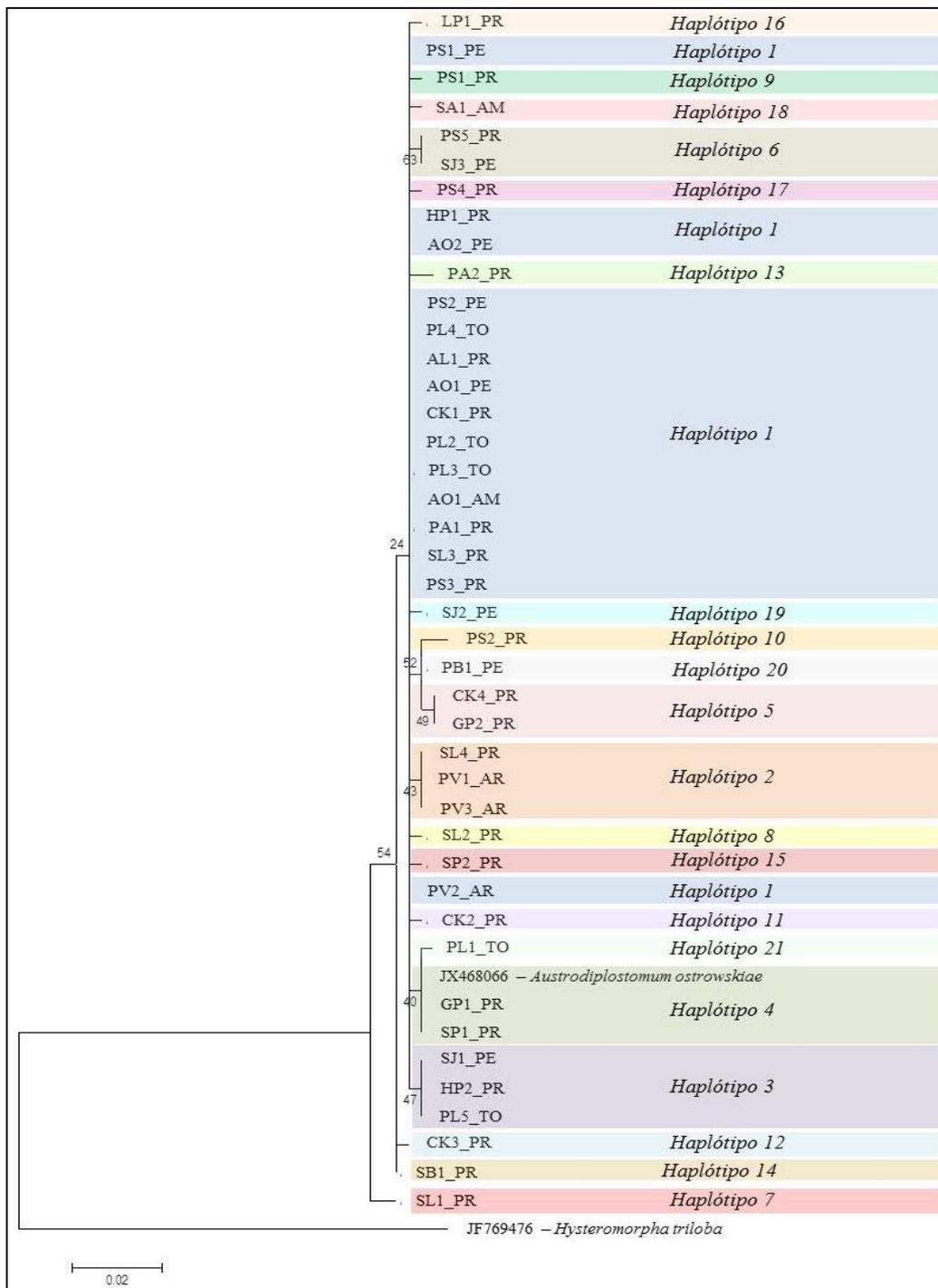


Figura 03. Análise Filogenética de Máxima Verossimilhança, calculada pela distância Kimura 2-parâmetros e deleção parcial de gaps, as sequências de *Austrodiplostomum ostrowskiae* obtidos em peixes hospedeiros coletados em diferentes ambientes na América do Sul entre 2011 e 2013, utilizando *Hysteromorpha triloba* (Locke et al., 2011) como grupo externo. Cada sequência está identificada com as iniciais específicas do peixe hospedeiro, o número de haplótipos de cada hospedeiro analisado e o local amostrado (exemplo, LP1_PR = espécime 1 coletado em *Loricariichthys platymetopon* na planície de inundação do alto rio Paraná). As cores indicam haplótipos semelhantes e sua identificação.

Tabela 03. Variabilidade intraespecífica da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletados em peixes nas diferentes bacias hidrográficas analisadas, entre 2011 e 2013. Valores em destaque (cinza) representam a variabilidade intraespecífica dentro da subpopulação; os demais representam as variabilidades intraespecíficas entre as subpopulações, ambos foram calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros. Os valores representam a média encontrada dentro e entre os locais amostrados e os valores em parênteses representam a amplitude de variação.

Bacia Hidrográfica	Região	Subpopulação					
		1	2	3	4	5	
1	Amazônica	Manaus	0,3%				
		Iquitos	0,4% (0,0 – 0,9%)	0,4% (0,0 – 0,9%)			
3	Tocantins	Palmas	0,3% (0,0 – 0,8%)	0,3% (0,0 – 1,0%)	0,3% (0,0 – 0,8%)		
4	Paraná	Planície	0,6% (0,0 – 1,7%)	0,5% (0,0 – 1,7%)	0,5% (0,0 – 1,4%)	0,6% (0,0 – 2,4%)	
		Santa Fé	0,2% (0,0 – 0,4%)	0,4% (0,0 – 0,9%)	0,3% (0,0 – 0,8%)	0,5% (0,0 – 1,7%)	0,1% (0,0 – 0,2%)

Tabela 04. Frequência absoluta de haplótipos da região COX1 do DNA mitocondrial encontrados em *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletados em peixes nas diferentes bacias hidrográficas analisadas, entre 2011 e 2013.

Haplótipo	Amazônica		Paraná		Tocantins
	Manaus	Iquitos	Planície	Santa Fé	Palmas
HAP_1	1	4	6	1	3
HAP_2	0	0	1	2	0
HAP_3	0	1	1	0	1
HAP_4	0	0	2	0	0
HAP_5	0	0	2	0	0
HAP_6	0	1	1	0	0
HAP_7	0	0	1	0	0
HAP_8	0	0	1	0	0
HAP_9	0	0	1	0	0
HAP_10	0	0	1	0	0
HAP_11	0	0	1	0	0
HAP_12	0	0	1	0	0
HAP_13	0	0	1	0	0
HAP_14	0	0	1	0	0
HAP_15	0	0	1	0	0
HAP_16	0	0	1	0	0
HAP_17	0	0	1	0	0
HAP_18	1	0	0	0	0
HAP_19	0	1	0	0	0
HAP_20	0	1	0	0	0
HAP_21	0	0	0	0	1

Entretanto, como os ambientes analisados estão conectados tanto por via hídrica (corpo d'água) quanto pela mobilidade do hospedeiro definitivo (aves), estas diferenças

provavelmente não estão relacionadas diretamente à localização geográfica dos hospedeiros, mas sim aos próprios hospedeiros analisados. Para avaliar este fato, uma nova análise de variabilidade molecular foi realizada tendo como grupo a Ordem dos peixes hospedeiros e como amostra as espécies estudadas (Tab. 06). As maiores variabilidades nucleotídicas estiveram relacionadas à Ordem Perciformes, composta principalmente por espécies introduzidas neste ambiente. Por estarem expostas às condições ambientais em menor escala temporal (interações recentes), estas espécies não estariam imunes à maioria das linhagens de parasitos, o que promove um acúmulo de haplótipos com as maiores diversidades nucleotídicas (Tab. 02), aumentando a variabilidade. Além disso, esta pode ser o resultado da seleção imposta pelo predador (hospedeiro definitivo), que seleciona como presas peixes desta Ordem, permitindo a complementação do ciclo e a transmissão dessa variação (mutação) para outros estágios. Outro fator relacionado pode ser a maior suscetibilidade destes peixes como hospedeiros intermediários (maiores intensidades) (Tab. 01), o que também auxiliaria no acúmulo de maior número de haplótipos.

Tabela 05. Índices de variabilidade molecular intra e interpopulacional da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletadas em peixes nos diferentes subsistemas da planície de inundação do alto rio Paraná, em junho de 2011. π = diversidade nucleotídica.

Diversidade Molecular		Planície			Média	Desvio Padrão (\pm)
		Baía	Ivinhema	Paraná		
Composição Nucleotídica	número amostral de sequências	14	6	3	7,66	4,64
	número de haplótipos	14	6	3	7,66	4,64
	número de loci observado	587	587	587	-	-
	número de loci úteis	349	336	422	-	-
	A (%)	18,58	18,53	19,00	18,70	0,21
	G (%)	18,00	18,03	17,89	17,97	0,06
	C (%)	12,17	12,13	12,36	12,22	0,10
	T (%)	51,25	51,31	50,75	51,31	0,25
Interpopulacional	n° de transições	12	7	5	8,0	7,162
	n° de transversões	1	1	0	0,66	0,89
	n° de substituições	13	8	5	8,67	8,04
	n° de substituições únicas	10	6	1	5,67	6,05
	π	2	2,67	3,34	2,73	0,57

Apesar da variação observada estar aparentemente relacionada aos subsistemas da planície de inundação do alto rio Paraná e às espécies de hospedeiros, a AMOVA não foi significativa para nenhuma destas fontes de variação, demonstrando não haver estrutura genética populacional em escala regional ($p > 0,05$) (Tab. 07). Em especial, este resultado é um reflexo da distribuição haplotípica entre os ambientes e os hospedeiros analisados.

Tabela 06. Índices de variabilidade molecular intrapopulacional da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletadas em diferentes espécies de peixes hospedeiros na planície de inundação do alto rio Paraná, em junho de 2011. π = diversidade nucleotídica, d.p. = desvio padrão.

Grupos (Ordem)	Hospedeiros	Número de Haplótipos	π
Characiformes	<i>Acestrothynchus lacustris</i>	1	0
	<i>Schizodon borellii</i>	1	0
	π Médio (\pm d.p.)		0 ($\pm 0,0$)
Perciformes	<i>Cichla kelberi</i> *	4	2,5
	<i>Geophagus cf. proximus</i> *	2	4
	<i>Satanoperca pappaterra</i>	2	2
	<i>Plasgioscion squamosissimus</i> *	5	2,4
	π Médio (\pm d.p.)		2,725 ($\pm 0,877$)
Siluriformes	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	2	1
	<i>Loricariichthys platymetopon</i> *	1	0
	<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i> *	2	2
	<i>Sorubim lima</i>	4	3,5
	π Médio (\pm d.p.)		1,625 ($\pm 1,493$)

* Espécies introduzidas na planície de inundação do alto rio Paraná.

Em escala continental, quando as subpopulações presentes nos diferentes locais da América do Sul foram comparadas observou-se a presença de 21 haplótipos, sendo 15 únicos (Tab. 04). As diversidades haplotípica e nucleotídica (π) foram maiores no ambiente planície da Bacia Hidrográfica Paraná (Tab. 04; Tab. 08), em especial pelo maior número de hospedeiros e de sequências analisadas nesta região.

Quando a AMOVA foi realizada em escala geográfica continental também não houve significância ($p > 0,05$), isto é, os locais amostrados agrupados nas três bacias hidrográficas indicam pouca ou nenhuma estrutura genética populacional tanto entre os locais quanto entre as regiões (Tab. 07). Portanto, as subpopulações de *A. ostrowskiae*

presentes na América do Sul constituem uma única metapopulação, com alto fluxo gênico, nas quais os eventos de colonização provavelmente sejam geridos pela migração das aves hospedeiros definitivos.

Tabela 07. Análise de Variância Molecular (AMOVA) da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de *Austrodiplostomum ostrowskiae* em diferentes escalas geográficas. A escala regional descreve como a diferenciação genética é dividida entre os hospedeiros e os locais amostrados na planície de inundação do alto rio Paraná. A escala continental descreve como a diferenciação genética é dividida entre os locais amostrados na América do Sul.

Escala Geográfica	Fonte de Variação	Porcentagem de Variação	F _{ST}	p
Regional	Entre os grupos (ordem)	0,42		
	Entre os hospedeiros dentro dos grupos	-20,23	-0,198	0,9843
	Dentro dos hospedeiros (espécie)	119,81		
	Entre os subsistemas	1,66	0,016	0,3059
	Dentro dos subsistemas	98,34		
Continental	Entre os locais	6,29		
	Entre as populações dentro dos locais	-7,59	-0,013	0,6967
	Dentro das subpopulações	101,29		

Tabela 08. Índices de variabilidade molecular intra e interpopulacional da região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial de *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletadas em peixes nos diferentes bacias hidrográficas na América do Sul, entre 2011 e 2013. π = diversidade nucleotídica.

Diversidade Molecular	Amazônica		Paraná		Tocantins	Média	Desvio Padrão (\pm)	
	Manaus	Iquitos	Planície	Santa Fé	Palmas			
Composição Nucleotídica	número amostral de sequências	2	8	24	3	5	8,4	8,06
	número de haplótipos	2	5	17	2	3	5,8	5,71
	número de loci observado	587	587	587	587	587	-	-
	número de loci úteis	372	369	349	562	366	-	-
	A (%)	17,98	18,8	18,66	18,78	18,17	18,48	0,34
	G (%)	18,40	17,64	17,96	17,66	18,35	18,00	0,33
	C (%)	12,02	12,29	12,19	12,32	12,13	12,19	0,11
	T (%)	51,60	51,27	51,19	51,23	51,35	51,33	0,15
Interpopulacional	n° de transições	1	4	18	1	3	5,4	7,16
	n° de transversões	0	0	2	0	0	0,4	0,89
	n° de substituições	1	4	20	1	3	5,8	8,04
	n° de substituições únicas	1	1	14	0	0	3,2	6,05
	π	1	1	3,34	0,67	1,2	1,44	1,07

A rede haplotípica construída demonstrou que a maioria dos espécimes que difere do haplótipo mais frequente (haplótipo 1) tem somente uma mutação entre si (Fig. 04),

sendo que o maior número de passos mutacionais foi 5 entre o HAP_1 e o HAP_7. Além disso, observou-se que, com exceção da localidade Santa Fé, todas as demais apresentaram linhagens mitocondriais exclusivas. A maioria dos haplótipos deriva do haplótipo 1, e este por sua vez, ocorre em alopatria. Por outro lado, existem haplótipos divergentes ocorrendo em simpatria em todos os ambientes amostrados.

Estes resultados ressaltam a ausência de estruturação genética populacional de *Austrodiplostomum ostrowskiae* em escala regional e continental, demonstrando o alto fluxo gênico entre estas subpopulações.

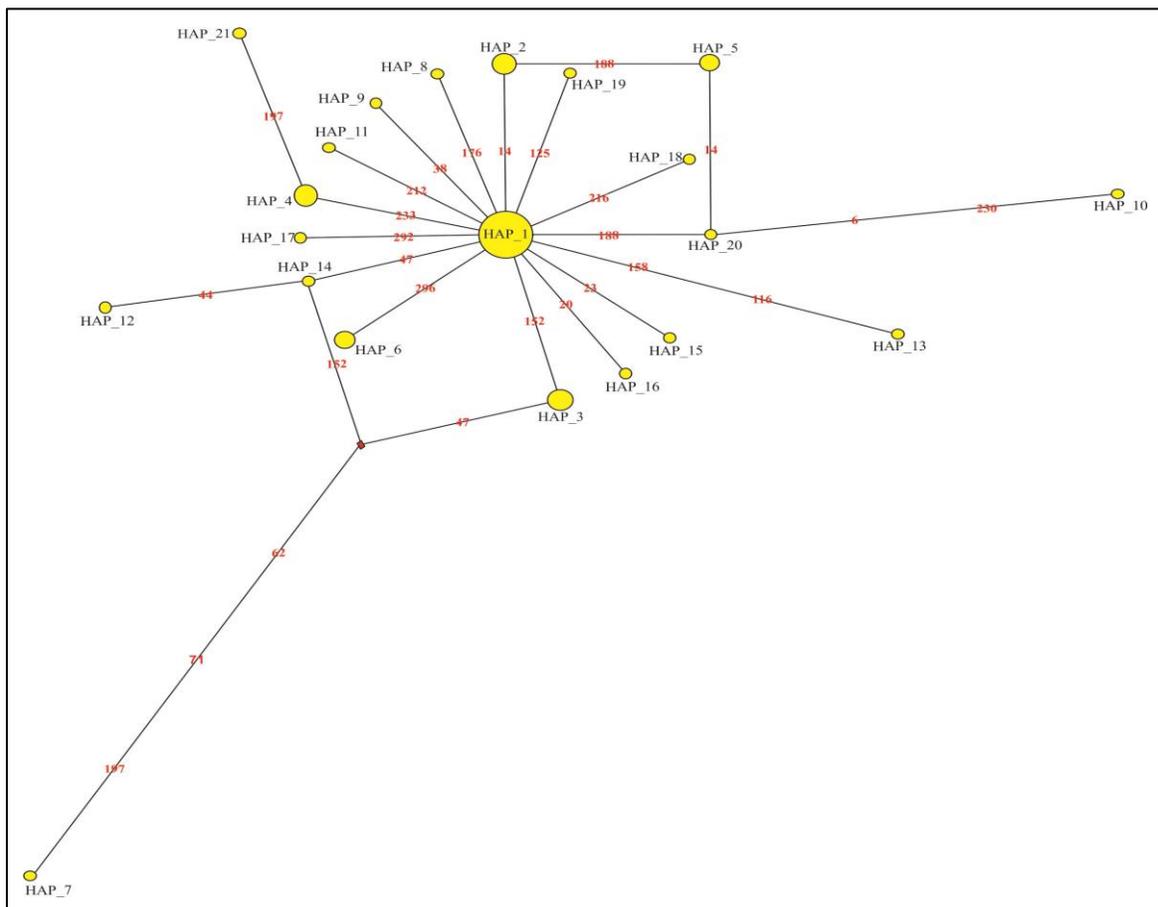


Figura 04. Rede de Haplótipos da região COX1 do DNA mitocondrial para *Austrodiplostomum ostrowskiae* coletados em diferentes locais da América do Sul, entre 2011 e 2013, baseada no algoritmo *median-joining* (Bandelt et al., 1999). Os círculos representam os haplótipos e são proporcionais às frequências absolutas dos mesmos. O losango vermelho representa um nó filogenético e os números, a localização dos pontos mutacionais na sequência.

3.4 DISCUSSÃO

Devido ao seu modo de vida, a dispersão dos parasitos é normalmente mediada pela biologia dos seus hospedeiros (Louhi et al., 2010). Os trematódeos digenéticos com ciclos de vida complexos utilizam hospedeiros intermediários (moluscos e peixes) que têm populações localmente estruturadas e apresentam pouco fluxo gênico (baixo potencial migratório). Entretanto, a maioria das espécies apresenta como hospedeiros definitivos vertebrados altamente móveis, capazes de se movimentar por uma grande área geográfica cobrindo muitas populações de hospedeiros intermediários. Estas espécies terão adaptação local ao hospedeiro restringida pelo alto fluxo gênico ocasionado pela grande mobilidade de hospedeiros definitivos (Dybdahl e Lively, 1996). Estes processos, fluxo gênico e mobilidade do hospedeiro definitivo, parecem ser os norteadores da estrutura genética populacional de *A. ostrowskiae*, ou da ausência de diferenças nesta, em ambas as escalas espaciais analisadas. Entretanto, não agem isoladamente.

Louhi et al. (2010), ao analisar a estrutura genética populacional de *Diplostomum spathaceum* em seu primeiro hospedeiro intermediário (*Lymnaea stagnalis*) na Finlândia, ao longo de um gradiente espacial (300 km), também não encontrou evidência de isolamento genético ocasionado pela distância geográfica. Em grandes escalas geográficas, a maioria dos estudos de estrutura genética populacional foi realizada em parasitos com potencial zoonótico, como *Fasciola hepatica* (Semyenova et al., 2006) e *Schistosoma japonicum* (Wang et al., 2006), e ambos os estudos não apresentaram estruturação genética populacional. O presente trabalho testou a existência de estrutura genética ocasionada pela distância, em uma espécie amplamente distribuída, em gradiente geográfico regional (planície de inundação do alto rio Paraná) e isolados geograficamente (América do Sul). A ausência de estrutura genética populacional em ambas as escalas geográficas, regional e

continental, em *Austrodiplostomum ostrowskiae* demonstrou que esta espécie constitui uma única metapopulação na América do Sul, apesar do isolamento entre as bacias hidrográficas analisadas (Amazônica, Paraná e Tocantins).

Como uma espécie alogênica, com ciclo de vida complexo e ampla gama de hospedeiros utilizados, altas taxas de fluxo gênico e, conseqüentemente, baixas taxas de adaptação local eram esperadas para *A. ostrowskiae* em escala geográfica. Entretanto, alguns aspectos relacionados ao ciclo de vida merecem maiores considerações, tais como a amplitude de distribuição e hábitos migratórios dos hospedeiros definitivos, a utilização de vários moluscos e peixes como hospedeiros intermediários e o papel do *host switch* na colonização de novos hospedeiros.

Austrodiplostomum ostrowskiae foi descrita inicialmente no intestino de biguás, *Phalacrocorax auritus* Lesson, 1831 (Aves: Phalacrocoracidae), no Texas (Dronen, 2009) e foi recentemente registrada em *P. brasilianus* (Gmelin, 1789) no Mississipi (O’Hear et al., 2014). A primeira ocorrência na América do Sul foi registrada por Drago et al. (2011) em *P. brasilianus* na Argentina. Como estas aves têm ampla distribuição no continente, dos Estados Unidos à Patagônia Argentina (Orta, 1992), pode-se inferir que estes parasitos utilizam as aves desta família como hospedeiros definitivos e que a migração destas possivelmente, foi a responsável pela disseminação destes parasitos pelo continente. Entretanto, os padrões migratórios destas aves são classificados como regionais (Nunes e Tomas, 2004), isto é, elas não realizam grandes migrações, pelo menos não em escala continental.

A hipótese mais provável que contempla a disseminação parasitária pelos movimentos migratórios destes hospedeiros é a que leva em consideração a presença de fragmentos que apresentem corpos hídricos margeados por floresta ripária entre estes

ambientes. Estes espaços, onde as aves poderiam se alimentar, serviriam de fontes disseminadoras onde os hospedeiros poderiam adquirir parasitos de outras localidades, além de disseminarem ovos de parasitos adquiridos previamente, o que funcionaria como uma rede disseminadora conectada entre inúmeras regiões onde as migrações locais alternadas seriam fonte constante de fluxo gênico. Este fato foi ressaltado pela distribuição haplotípica (HAP_1) observada entre as subpopulações de *A. ostrowskiae*. Além disso, haplótipos exclusivos podem ser encontrados em ambientes sem estruturação genética (Garcez et al., 2011). Neste contexto, as subpopulações poderiam estar em contato e transmitir as mutações genéticas obtidas em diferentes regiões, disseminando-as entre outras subpopulações.

A teoria de metapopulação é a que contém as bases científicas para explicar a conexão em rede de fragmentos colonizados. Metapopulações são grupos de populações, caracterizadas por extinção e colonização, ligadas por fluxo gênico (Kaltz e Shykoff, 1998). A forma como a metapopulação se comporta depende do nível de conectividade entre os fragmentos (Grenfell e Harwood, 1997). Neste contexto, como as aves são hospedeiros que não apresentam barreiras físicas viáveis (Locke et al., 2010), é possível que estas gerem o grau de conexão observado entre as subpopulações de *A. ostrowskiae*.

A coocorrência de múltiplos genótipos da mesma espécie de parasito dentro de um hospedeiro pode ter consequências ecológicas e evolutivas, com impactos potenciais na virulência e na competição intraespecífica (Poulin, 2007). A reprodução (multiplicação) assexuada que ocorre nos moluscos hospedeiros gera uma liberação sincronizada de cercárias geneticamente idênticas (clones), o que poderia homogeneizar a estrutura genética populacional. Porém, se a taxa na qual as cercárias infectam o segundo hospedeiro intermediário for alta e temporal, então uma alta diversidade genética poderá ser recuperada

apesar da reprodução assexuada no primeiro hospedeiro (Prugnolle et al., 2005). De acordo com Rauch et al. (2005), a função do segundo hospedeiro intermediário é ‘coletar’ diferentes genótipos cercariais ao longo do tempo, pela migração dentro do corpo hídrico e contato com diferentes moluscos hospedeiros. Isto foi observado em *A. ostrowskiae*, mesmo dentro do mesmo espécime de hospedeiro, como *S. pappaterra* (n=1, Tab. 01), as duas sequências obtidas foram diferentes entre si ($\pi=2$, Tab. 05).

Parasitas com ciclos de vida heteroxenos precisam explorar sequencialmente mais de uma espécie de hospedeiro para completar seu desenvolvimento. Entretanto, o maior impedimento para o estabelecimento de digenéticos nos ambientes seria a ausência de moluscos suscetíveis à infecção, que proporcionariam recursos viáveis para a reprodução assexuada. Vários sistemas digenético-molusco têm demonstrado que estes parasitos são localmente adaptados a estes hospedeiros (Lively et al., 2004). Na América do Sul, várias espécies do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 já foram registradas como hospedeiros para espécies de *Austrodiplostomum*, *B. peregrina* (d’Orbigny, 1835) na Argentina (Ostrowski de Núñez, 1977), *B. prona* (Martens, 1873) na Venezuela (Ostrowski de Núñez, 1982), *B. straminea* (Dunker, 1848) e *B. glabrata* (Say, 1818) no Brasil (Pinto e Melo, 2013). Este nível de sobreposição significa que muitas espécies de hospedeiros intermediários potenciais são expostas aos ovos destes digenéticos, conseguindo se estabelecer nestes organismos.

Considerando que as espécies de moluscos hospedeiro registradas no Brasil são amplamente distribuídas em países Neotropicais, é possível que estes estejam envolvidos no ciclo de vida destes parasitos (Pinto e Melo, 2013). Entretanto, no tanque escavado onde as coletas no Tocantins foram realizadas pela EMBRAPA Aquicultura (Patrícia Oliveira Maciel, *com. pessoal*) observou-se a presença de um molusco invasor *Melanooides*

tuberculata (Müller, 1774) como sendo o único hospedeiro possível para esta localidade, após o esvaziamento do reservatório de água. A ausência de uma espécie de hospedeiro usual pode ter funcionado como um “gatilho biológico” para o *host switching*, o que permitiria a colonização e a instalação do parasito em um novo hospedeiro. Este registro põe em cheque a especificidade ao primeiro hospedeiro intermediário e indica que estas espécies podem se adaptar a populações de moluscos diversas, desde que as condições ecológicas favoreçam a troca ou a adição de hospedeiros (Donald et al., 2004).

As espécies de digenéticos geralmente mostram pouca especificidade aos seus hospedeiros vertebrados, o que ocasiona um grande espectro de hospedeiros com baixa preferência (Lymbery, 1989). Isto ocorre, pois a disponibilidade de hospedeiros potenciais, com ancestrais e modo de vida similares, tende a facilitar a troca de hospedeiros (*host switching*) e a colonização de novos hospedeiros (Poulin, 2007).

O sucesso da troca de hospedeiros depende da história da associação, tanto quanto do ciclo de vida, abundância e distribuição das espécies envolvidas (Agosta et al., 2010). Entretanto, se a nova espécie de hospedeiro possuir o mesmo recurso que o ancestral, o novo hospedeiro seria simplesmente visto somente como um novo habitat (Janzen, 1985). Esta expansão na gama de hospedeiros pode indicar que o parasito é ou está se tornando um generalista, quando, na verdade, está simplesmente rastreando o recurso de sua preferência que é amplamente distribuído, isto é, um ‘falso generalista’ (Brooks e McLennan, 2002). Isto parece ser verdadeiro para *A. ostrowskiae* com relação ao segundo hospedeiro intermediário, uma vez que esta espécie ocorre livre nos humores aquoso e vítreo de peixes filogeneticamente distintos (S_{TD} Total = 3,37, Fig. 02).

Espécies com alta gama de hospedeiros, como *A. ostrowskiae*, tendem a ser menos adaptadas localmente uma vez que a exposição a muitos hospedeiros filogeneticamente

distintos pode enfraquecer a seleção espécie específica em uma população de parasitos (Lajeunesse e Forbes, 2002). Em outras palavras, o fluxo gênico entre linhagens de parasitos que passam por diferentes espécies de hospedeiros é, normalmente, alta (Louhi et al., 2010).

O DNA mitocondrial é um marcador potencialmente mais sensível à deriva genética do que o DNA nuclear. Devido ao seu padrão de herança uniparental (materna), e à natureza haploide do seu genoma, seu tamanho efetivo é, aproximadamente, um quarto do genoma nuclear (Freeland, 2005). Este fato o torna mais sensível a eventos demográficos como *bottlenecks* (efeito gargalho), uma vez que seus haplótipos têm uma grande probabilidade de serem extintos, o que levaria a subestimação dos níveis de diversidade genética (Freeland, 2005). Além disso, a diversidade nucleotídica do DNA mitocondrial tende a ser menos relacionada com a abundância de indivíduos do que o número e a diversidade de haplótipos. Isto ocorre, pois a intensidade da relação entre diversidade genética e abundância populacional reflete a taxa relativa com que diferentes estatísticas moleculares aumentam em valor após um episódio de baixa diversidade, sendo a recuperação desta região do DNA mais lenta do que de outras, segundo descrito por McCusker e Bentzen (2010) em peixes. Uma alta diversidade haplotípica acompanhada de uma baixa diversidade nucleotídica pode indicar um *bottleneck* seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações (Grant e Bowen, 1998).

A ocorrência ou não de um *bottleneck* pode ser inferida a partir da observação da rede de haplótipos (Fig. 04). A maior parte dos haplótipos foi separada do HAP_1 por somente um ponto mutacional. Além disso, este haplótipo está na posição central da rede e possui múltiplas ligações que são indicativos de que o mesmo pode ser o mais antigo (Freeland, 2005). Desta forma, o HAP_1 pode ter sido o único a permanecer após o

bottleneck que eliminou os outros haplótipos, sendo que este, por sua vez, provavelmente foi disseminado entre os ambientes pela migração dos hospedeiros definitivos.

De acordo com os resultados deste estudo, parasitos alogênicos demonstram ausência de estrutura genética populacional em uma ampla escala geográfica. As associações parasito-hospedeiro podem ser recentes (baixo tempo evolutivo), o que pode ser demonstrado pela alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica amplamente distribuída entre as subpopulações amostradas. Como a implementação de adaptação local é um processo coevolutivo temporal (Prugnolle et al., 2006), possivelmente as mutações que permanecerão nas subpopulações, e que poderão ocasionar estruturação genética, ainda não foram selecionadas. Entretanto, este resultado pode mudar em uma escala temporal e merece ser acompanhado na tentativa de se desenvolver fatores preditores de deriva genética e fluxo gênico entre as populações de parasitos em cenários alterados, seja pela ação humana direta (obras de engenharia) ou indireta (mudanças climáticas).

REFERÊNCIAS

- Agosta, S.J., Janz, N. & Brooks, D.R. 2010. How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. *Zoologia* **27**(2), 151-162.
- Archie, E.A. & Ezenwa, V.O. 2011. Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. *Inter. J. Parasitol.* **41**, 89-98.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. and Evol.* **16**, 37-48.
- Barrett, L.G., Thrall, P.H., Burdon, J.J. & Linde, C.C. 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 678–685.

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B. 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* **141**, 1007–1014.

Brooks, D.R. & McLennan, D.A. 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. Chicago: University of Chicago Press.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* **83**, 575–583.

Corrêa, L.L., Souza, G.T.R.; Takemoto, R.M., Ceccarelli, P.S. & Adriano, E.A. 2014. Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil. *Parasitol. Res.* **113**, 499–503.

Criscione, C.D., Poulin, R. & Blouin, M.S. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.* **14**, 2247–2257.

Donald, K.M., Kennedy, M., Poulin, R. & Spencer, H.G. 2004. Host specificity and molecular phylogeny of larval Digenea isolated from New Zealand and Australian topshells (Gastropoda: Trochidae). *Int. J. Parasitol.* **34**, 557–568.

Drago, F.B., Lunaschi, L.I. & Schenone, M. 2011. Digenean parasites of the Neotropical Cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) (Aves: Phalacrocoracidae) from Argentina: Distribution extension and new host records. *Check List* **7**(6), 871–875.

Dronen, N.O. 2009. *Austrodiplostomum ostrowskiae* n. sp. (Digenea: Diplostomidae: Diplostominae) from the Double-crested Cormorant, *Phalacrocorax auritus* (Phalacrocoracidae) from the Galveston, Texas Area of the Gulf of Mexico, U.S.A. *Comp. Parasitol.* **76**(1), 34–39.

Dybdahl, M.F. & Lively, C.M. 1996. The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite. *Evolution* **50**, 2264–2275.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.

- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* **10**, 564–567.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. England: John Wiley and Sons.
- Gandon, S., Capoweiz, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. & Olivieri, I. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. Lond. B* **263**, 1003–1009.
- Garcez, R., Calcagnotto, D. & Almeida_Toledo, L.F. 2011. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquat. Conserv.* **21**, 268-275.
- Gibson, D.I., Jones, A. & Bray, R.A. 2002. *Keys to the Trematoda*. Volume 1. London: CAB International and the Natural History Museum.
- Graça, W.J. & Pavanelli, C.S. 2007. *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM.
- Grant, W.S. & Bowen, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* **80**(5), 415-426.
- Grenfell, B. & Harwood, J. 1997. (Meta)population dynamics of infection diseases. *Trends Ecol. Evol.* **12**(10), 395–399.
- Janzen, D.H. 1985. On ecological fitting. *Oikos* **45**, 308-310.
- Kaltz, O. & Shykoff, J.A. 1998. Local adaptation in host–parasite systems. *Heredity* **4**, 361–370.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.
- Lajeunesse, M.J. & Forbes, M.R. 2002. Host range and local parasite adaptation. *Proc. Biol. Sci.* **269**, 703–710.
- Lively, C. M. 1999. Migration, virulence and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *Am. Nat.* **153**, S34–S47.

- Lively, C.M., Dybdahl, M.F., Jokela, J., Osnas, E.E. & Delph, L.F. 2004. Host sex and local adaptation by parasites in a snail–trematode interaction. *Am. Nat.* **164**, S6–S18.
- Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Dayanandan, S. & Marcogliese, D.J. 2010. Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome *c* oxidase I and internal transcribed spacer sequences. *Int. J. Parasitol.* **40**, 333–343.
- Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Lapierre, A.R., Johnson, P.T. & Marcogliese, D.J. 2011. Linking larvae and adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysteromorpha triloba* and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. *J. Parasitol.* **97**, 846–851.
- Louhi, K.R., Karvonen, A., Rellstab, C. & Jokela, J. 2010. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? *Infect. Genet. Evol.* **10**, 1271–1277.
- Lymbery A.J. 1989. Host specificity, host range and host preference. *Parasitol. Today* **5**, 298.
- McCusker, M.R. & Bentzen, P. 2010. Positive relationship between genetic diversity and abundance in fishes. *Mol. Ecol.* **19**, 4852–4862.
- Morais, A.M., Varella, A.M.B., Fernandes, B.M.M. & Malta, J.C.O. 2011. *Clinostomum marginatum* (Braun, 1899) and *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) metacercariae with zoonotic potencial on *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858) (Characiformes: Serrasalminidae) from Central Amazon, Brazil. *Neotrop. Helminthol.* **5** (1), 08–15.
- Moszczyńska, A., Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Marcogliese, D.J. & Crease, T.J. 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. *Mol. Ecol. Res.* **9**, 75–82.
- Nadler, S.A. 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.* **81**, 395–403.
- Nunes, A.P. & Tomas, W.M., 2004. *Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: caracterização e conservação*. Corumbá: Embrapa Pantanal.
- O’Hear, M., Pote, L., Yost, M., Doffitt, C., King, T. & Panuska, C. 2014. Morphologic and molecular identifications of Digenetic Trematodes in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Mississippi Delta, USA. *J. Wildl. Dis.* **50**(1), pp. 000–000. DOI: 10.7589/2012-10-249.

Orta, J. 1992. Family Phalacrocoracidae (Cormorants). In *Handbook of the birds of the world*. (ed. del Hoyo, J., Elliot, A. & Sargatal, J.) pp. 326-353, Barcelona: Lynx Editions.

Ostrowski de Núñez, M. 1977. El ciclo biológico de *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) Dubois 1970 (= *Austrodiplostomum mordax* Szidat y Nani 1951) (Trematoda, Diplostomatidae). *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat.* **2**, 7–63.

Ostrowski de Núñez, M. 1982. Die Entwicklungszyklen von *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) und *D. (A.) mordax* (Szidat und Nani, 1951) n. comb in Südamerika. *Zool. Anz.* **208**, 393–404.

Pinto, H.A. & Melo, A.L. 2013. *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Planorbidae) as New Intermediate Hosts of the Fish Eye fluke *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) in Brazil. *J. Parasitol.* **99**(4), 729–733.

Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton: Princeton University Press.

Poulin, R. & Keeney, D.B. 2008. Host specificity under molecular and experimental scrutiny. *Trends Parasitol.* **24**, 24–28.

Poulin, R. & Mouillot, D. 2003. Parasite specialization from a phylogenetic perspective: a new index of host specificity. *Parasitology* **126**, 473–480.

Poulin, R. & Mouillot, D. 2005. Combining phylogenetic and ecological information into a new index of Host specificity. *J. Parasitol.* **91**(3), 511–514.

Prugnolle, F., de Meeûs, T., Pointier, J.P., Durand, P., Rognon, A. & Théron, A. 2006. Geographical variations in infectivity and susceptibility in the host-parasite system *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata*: no evidence for local adaptation. *Parasitology* **133**, 313–319.

Prugnolle, F., Théron, A., Pointier, J.P., Jabbour-Zahab, R., Jarne, P., Durand, P. & de Meeûs, T. 2005. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts and its consequence for local adaptation. *Evolution* **59**, 296–303.

Ramos, I.P., Franceschini, L., Zago, A.C., Zica, É.O.P., Wunderlich, A.C., Carvalho, E.D. & Silva, R.J., 2013. New host records and a checklist of fishes infected with *Austrodiplostomum compactum* (Digenea: Diplostomidae) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **22**(4), 511-518.

Rauch, G., Kalbe, M. & Reusch, T.B. 2005 How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *Evol. Biol.* **18**(4): 1069-1075.

Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Chrisanfova, G.G., Gorokhov, V.V., Arkhipov, I.A., Moskvina, A.S., Movsessyan, S.O. & Ryskov, A.P. 2006. Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *J. Parasitol.* **92**(3), 525–530.

Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., Lizama, M.A.P., Lacerda, A.C.F., Yamada, F.H., Moreira, L.H.A., Ceschini, T.L. & Bellay, S. 2009. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Braz. J. Biol.* **69**, 691–705.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.

Thompson, J.N. 1994. *The Coevolutionary Process*. Chicago: The University of Chicago Press.

Vilas, R., Criscione, C.D. & Blouin, M.S. 2005. A comparison between mitochondrial DNA and ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* **131**, 839–846.

Wang, T.P., Shrivastava, J., Johansen, M.V., Zhang, S.Q., Wang, F.F. & Webster, J.P. 2006. Does multiple hosts mean multiple parasites? Population genetic structure of *Schistosoma japonicum* between definitive host species. *Int. J. Parasitol.* **36**, 1317–1325.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ferramenta molecular deve ser uma constante nos estudos parasitológicos em populações silvestres, tanto em estudos de levantamento de espécies e ecológicos. Em alguns casos, a não utilização destes marcadores pode levar à subestimação da biodiversidade, com o não reconhecimento de espécies crípticas, e ignorar a presença destas significaria a possibilidade de mascarar algum aspecto da comunidade.

Protocolos mais acurados de necropsia devem ser adotados, pois as metacercárias de diplostomídeos presentes nos olhos de peixes da planície de inundação demonstraram especificidade ao recurso explorado (micro-habitat). Estes dados podem servir de subsídio para uma identificação inicial das fases larvais que infectam os olhos de peixes em ambientes naturais e de cultivo, nos quais a correta identificação é a primeira etapa para ações de manejo e controle.

O papel de fragmentos com vegetação ripária na estrutura genética populacional de *Austrodiplostomum ostrowskiae* demonstra a importância da conservação destes para a migração e a manutenção do fluxo gênico entre populações de parasitos e hospedeiros. Para esta população em longo prazo o desmatamento pode ser um fator norteador da adaptação local, pela restrição da migração dos hospedeiros definitivos. Além disso, no contexto temporal, esta população merece acompanhamento contínuo, já que a adaptação local é tempo-dependente, para se desenvolverem preditores de deriva genética e fluxo gênico entre as populações de parasitos em cenários alterados, seja pela ação humana direta (obras de engenharia) ou indireta (mudanças climáticas).

GLOSSÁRIO

Abundância parasitária: número de indivíduos de uma espécie particular de parasitos em uma espécie de hospedeiro individual independentemente de o hospedeiro estar ou não infectado.

Alopatria: isolamento espacial ou ausência de sobreposição espacial entre as áreas de distribuição de duas espécies ou populações.

Coevolução: evolução simultânea de duas ou mais espécies que têm um relacionamento ecológico próximo. Por meio de pressões seletivas, a evolução de uma espécie torna-se parcialmente dependente da evolução da outra, tendo influência recíproca.

DNA *Barcodes*: DNA ‘código de barras’, para animais, a região do DNA utilizado para fins taxonômicos como um marcador genético curto é a região do citocromo oxidase 1 (COX1) do DNA mitocondrial (com aproximadamente 600 nucleotídeos).

***Ecological Fitting* ou Ajuste Ecológico:** processo pelo qual os organismos colonizam e persistem em ambientes (hospedeiros) novos, explorem novos recursos ou formem novas associações com outras espécies como resultado da utilização de traços ou características genéticas preexistentes. Explica como um parasito pode ser ecologicamente especializado, mas ainda trocar de hospedeiros, sob determinadas condições, sem ocasionar custos que envolvam a aquisição de novas habilidades. Ocorre pela manutenção da habilidade de explorar um determinado recurso amplamente distribuído pelas espécies de hospedeiros.

Endogamia: reprodução entre indivíduos aparentados, relacionados pela ascendência; como estes indivíduos têm genes relacionados, o efeito genético é a diminuição da heterozigose e da variabilidade genética.

Especiação Alopátrica: evolução de novas espécies em isolamento geográfico.

Especiação Simpátrica: evolução de novas espécies em sobreposição geográfica.

Espécies Congenéricas: que apresentam o mesmo gênero taxonômico, porém são de espécies distintas.

Espécies crípticas: duas ou mais linhagens molecularmente distintas que são classificadas como uma única espécie, devido à falta de diferenças morfológicas marcantes.

Especificidade: qualidade daquilo que é específico, caracterização particularizada de uma espécie.

Fluxo gênico: disseminação de genes dentro e entre as populações, devido a contatos sexuais. O fluxo gênico pode alterar as frequências alélicas e é, portanto, um fator de evolução.

Genótipo: é a identidade genética total de um indivíduo, incluindo os alelos, ou genes, que não são externamente demonstrados.

Hospedeiro Definitivo: hospedeiro no qual o parasito realiza reprodução sexuada.

Hospedeiro Intermediário: hospedeiro necessário para a complementação do ciclo de vida do parasito, no qual este sofre algum desenvolvimento, mas não atinge a maturidade sexual. Em alguns casos, pode sofrer reprodução assexuada.

Host switching ou Troca de Hospedeiro: processo que permite ao parasito trocar de hospedeiro, intermediários ou definitivos, pela retomada de habilidades preexistentes que permitem a utilização de recursos existentes nos hospedeiros. Estas habilidades podem ter sido adquiridas ao longo do processo evolutivo de ancestrais comuns ou filogeneticamente próximos.

Intensidade parasitária (média): número (médio) de parasitos em uma espécie de hospedeiro infectado, excluindo hospedeiros não infectados.

Metapopulação: rede de populações formada por subpopulações espacialmente estruturadas em agrupamentos, cujos indivíduos se reproduzem localmente e onde a migração entre as populações pode influenciar a dinâmica local e o fluxo gênico da região, incluindo a possibilidade de uma população se restabelecer após uma extinção.

Micro-habitat: região específica de um órgão ou tecido utilizado por um parasito, neste trabalho também pode ser sinonimizado como o recurso explorado.

Migração: fluxo de genes, gametas ou indivíduos entre populações.

Parasito Alogênico: parasito com ciclo de vida que envolve a utilização sucessiva de hospedeiros aquáticos e terrestres.

Parasito Autogênico: parasito com ciclo de vida que envolve a utilização somente de hospedeiros aquáticos.

Parasitos especialistas: apresentam alta especificidade a determinado hospedeiro (espécie) ou recurso explorado. Ocorrem em hospedeiros da mesma espécie ou filogeneticamente próximos.

Parasitos generalistas: apresentam baixa especificidade a determinado hospedeiro (espécie) ou recurso explorado. Ocorrem em grande número de espécies de hospedeiros, que podem ser filogeneticamente distantes.

Plasticidade fenotípica: habilidade de um organismo demonstrar diferentes fenótipos sob diferentes condições ambientais.

Prevalência: porcentagem de uma população de hospedeiros infectados por uma espécie de parasito.

Primer: é uma cadeia de ácido nucléico que serve como um ponto de partida para a síntese de DNA. É necessário no processo de replicação já que as polimerases (enzimas que catalisam a reação) apenas conseguem adicionar novos nucleotídeos a uma cadeia de DNA preexistente.

Simpatria: sobreposição espacial entre as áreas de distribuição de duas espécies ou populações.

Variância genética: medida das diferenças interindividuais que podem ser herdadas.