



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

MAYARA DESTRO PASSERE

**Caracterização molecular de digenéticos parasitas de gastrópodes  
(Mollusca) do baixo rio Ivaí, Paraná, Brasil**

Maringá  
2022

MAYARA DESTRO PASSERE

**Caracterização molecular de digenéticos parasitas de gastrópodes  
(Mollusca) do baixo rio Ivaí, Paraná, Brasil**

Dissertação 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 Mestre em Ecologia e Limnologia.

Área de concentração: Ecologia e Limnologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Junio da Graça

Maringá  
2022

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

P287c Passere, Mayara Destro, 1996-  
Caracterização molecular de digenéticos parasitas de gastrópodes (Mollusca) do baixo rio Ivaí, Paraná, Brasil / Mayara Destro Passere. -- Maringá, 2022.  
51 f. : il. (algumas color.).

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--  
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2022.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira.  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Junio da Graça.

1. Digenea (Trematoda: Platyhelminthes) "digenéticos" - Genética molecular - Ivaí, Rio, Bacia - Paraná (Estado). 2. Gastrópodes (Mollusca) - Genética molecular - Ivaí, Rio, Bacia - Paraná (Estado). I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -592.48135098162

MAYARA DESTRO PASSERE

**Caracterização molecular de digenéticos parasitas de gastrópodes  
(Mollusca) do baixo rio Ivaí, Paraná, Brasil**

Dissertação 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 Mestre em Ecologia e Limnologia e aprovada pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira  
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Dr. Thomaz Mansini Carrenho Fabrin  
Leibniz Institute for Neurobiology/Alemanha (LIN)

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

Aprovada em: 13 de abril de 2022.

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

Dedico este trabalho aos meus avós, Maria, Idinir e Santo (*in memoriam*), com muito amor e gratidão por ter tido pessoas tão especiais ao meu lado e que hoje são as minhas maiores saudades.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sueli e Cláudio, pelo amor, apoio e motivação de sempre. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida e agora não seria diferente. Amor e gratidão infinitas a vocês.

À Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais e ao Nupélia pela oportunidade, infraestrutura e recursos oferecidos para a realização desse trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira, pela confiança, acolhimento, suporte, paciência e todos os ensinamentos. Grata por esses anos de convivência e por tudo que aprendi ao seu lado. Um grande exemplo de pessoa e de profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rodrigo Junio da Graça, por todo o suporte e por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos.

Às minhas amigas da vida, Ana, Andresa, Kassiane, Letícia e Rafaela, por estarem ao meu lado e por me apoiarem nas minhas escolhas. Obrigada por sempre me ouvirem e pelo carinho e companheirismo incondicional. Vocês são pessoas incríveis que fazem a minha vida mais feliz. Amo muito vocês.

Aos meus amigos, companheiros de mestrado e da vida, Laura e Gustavo, por todos os momentos juntos, pelas dificuldades superadas e pelo apoio e amor de sempre. Gratidão por ter pessoas tão especiais como vocês ao meu lado e pela vida ter nos unido. Amo vocês.

Às minhas amigas da graduação, Bárbara, Flávia e Amanda, por todos os momentos vividos e pela vida ter nos juntado. Saudades.

Aos meus colegas de laboratório, Adrian, Bruno, Lara e João, pelas conversas e pelas ajudas durante esses anos. Também à técnica, Mazé, por manter a ordem e ajudar no que é preciso.

À banca do Exame Geral de Qualificação e banca da defesa, Dr. Ricardo Takemoto e Dr. Thomaz Fabrin e as suplentes, Dr.<sup>a</sup> Sybelle Belay, Dr.<sup>a</sup> Danielle Katharine Petsch e Dr.<sup>a</sup> Flávia Sicielli de Lima, por terem contribuído para a melhoria da versão final desse trabalho.

À secretária do PEA, Elizabete Custódio da Silva, por toda paciência e pela disponibilidade para ajudar sempre que preciso.

Ao laboratório de Ictioparasitologia pelo suporte e estrutura para realização da fase inicial desse trabalho, em especial a Lidiany e Wagner pela ajuda durante a coleta e em outros procedimentos do laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

**(MADRE TERESA DE CALCUTÁ)**

## **Caracterização molecular de digenéticos parasitas de gastrópodes (Mollusca) do baixo rio Ivaí, Paraná, Brasil**

### **RESUMO**

Os tiarídeos são gastrópodes pantropicais endêmicos da América do Sul e são encontrados em ambientes de água doce lênticos e lóticos. Esses gastrópodes atuam como hospedeiros intermediários de várias espécies de digenéticos. No entanto, é importante considerar que existem dificuldades para uma identificação correta desses digenéticos em determinadas fases do ciclo de vida, visto que as larvas possuem um tamanho reduzido e poucas características morfológicas para diagnóstico. Dessa maneira, técnicas baseadas em marcadores moleculares tornam-se uma ferramenta de extrema importância, combinando a utilização de regiões ribossômicas e mitocondriais. Considerando que não há registros na literatura de estudos envolvendo parasitas e gastrópodes como hospedeiros intermediários no rio Ivaí, este estudo é o primeiro a respeito dessas relações. Foram coletados 76 espécimes de gastrópodes. Desses, 21 encontravam-se parasitados. Quanto aos parasitas, foram encontrados 16 morfotipos distintos. O DNA dos gastrópodes foi amplificado utilizando o marcador *COI*. Os gastrópodes apresentaram similaridade genética com *Aylacostoma chloroticum* com diferentes percentuais de identidade. Quanto aos parasitas, para amplificação do DNA foram utilizados os marcadores *COI* e 28S. Quatro *taxa* diferentes foram caracterizados com ambos os marcadores. Com o marcador mitocondrial foi possível confirmar apenas um gênero dentre os digenéticos encontrados. Todavia, o marcador ribossômico 28S se mostrou mais eficaz para a identificação dos parasitas do rio Ivaí, apresentando maiores valores de similaridade em relação a sequências disponíveis nos bancos de dados e menores valores de distância genética. Dessa maneira, foi possível confirmar a classificação dos morfotipos em dois gêneros distintos.

**Palavras-chave:** *Aylacostoma*. Cercária. *COI*. Digenea. Neotropical. Rédia. Thiaridae. 28S.



## **Molecular characterization of digeneans parasites of gastropods (Mollusca) from the lower Ivaí River, Paraná, Brazil**

### ***ABSTRACT***

Thiarids are pantropical gastropods endemic to South America and are found in lentic and lotic freshwater environments. These gastropods act as intermediate hosts for several species of digeneans. However, it is important to consider that there are difficulties for a correct identification of these digeneans in certain stages of the life cycle since the larvae have a reduced size and few morphological characteristics for diagnosis. In this way, techniques based on molecular markers become an extremely important tool, combining the use of ribosomal and mitochondrial regions. Considering that there are no records in the literature of studies involving parasites and gastropods as intermediate hosts in the Ivaí River, this study is the first regarding these relationships. Seventy-six specimens of gastropods were collected. Of these, 21 were parasitized. As for the parasites, 16 different morphotypes were found. The gastropod DNA was amplified using the *COI* marker. The gastropods showed genetic similarity with *Aylacostoma chloroticum* with different percentages of identity. As for the parasites, *COI* and 28S markers were used for DNA amplification. Four different *taxa* were characterized with both markers. With the mitochondrial marker it was possible to confirm only one genus among the digeneans found. However, the 28S ribosomal marker proved to be more effective for the identification of Ivaí River parasites, showing higher similarity values in relation to sequences available in the databases and lower values of genetic distance. In this way, it was possible to confirm the classification of the morphotypes into two distinct genera.

**Keywords:** *Aylacostoma*. Cercariae. *COI*. Digenea. Neotropical. Rediae. Thiaridae. 28S.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Parasitology Research*. Disponível em: <<https://www.springer.com/journal/436>>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Coleta, triagem e preparação do material biológico</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Extração e quantificação do DNA</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Amplificação do DNA</b> .....	14
<b>2.4</b>	<b>Análises dos dados</b> .....	15
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	16
<b>3.1</b>	<b>Identificação e caracterização molecular dos gastrópodes provenientes do rio Ivaí</b> .	16
<b>3.2</b>	<b>Identificação e caracterização molecular dos digenéticos parasitas de gastrópodes do rio Ivaí</b> .....	18
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
	<b>APÊNDICE A</b> – Matriz de distância $p$ entre sequências de gastrópodes coletados no rio Ivaí e sequências disponíveis nos bancos de dados utilizando o marcador molecular <i>COI</i> .38	
	<b>APÊNDICE B</b> – Matriz de distância $p$ , utilizando o marcador molecular <i>COI</i> , entre parasitas de gastrópodes coletados no rio Ivaí e espécies próximas depositadas no GenBank. ....	38
	<b>APÊNDICE C</b> – Matriz de distância $p$ entre sequências de parasitas provenientes do rio Ivaí e sequências de espécies próximas disponíveis no GenBank utilizando o marcador molecular 28S. ....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Os moluscos são conhecidos como o segundo maior grupo de invertebrados em número de espécies, no qual os gastrópodes têm o maior sucesso adaptativo, visto que estão presentes em uma grande variedade de habitats (Ruppert et al. 2005). Thiaridae Gill, 1871 são gastrópodes com distribuição desde a América do Sul até Austrália e as espécies pertencentes a esse grupo são encontradas, em sua maioria, em ambientes lênticos e lóticos de água doce (Glaubrecht et al. 2009).

Os tiarídeos atuam como hospedeiros intermediários de diversas espécies de trematódeos parasitas. Os digenéticos, especialmente, utilizam os gastrópodes como um primeiro hospedeiro intermediário, no qual ocorre a reprodução assexuada (Scholz et al. 2000). Em sua grande maioria, os digenéticos são endoparasitas que se caracterizam pela presença de ventosas, uma localizada anteriormente, envolvendo a boca do animal e outra geralmente localizada na região ventral, a qual é denominada acetábulo (Pavanelli et al. 2002). Esses animais possuem um ciclo de vida complexo, sendo necessário pelo menos dois hospedeiros para se tornarem adultos, no qual o hospedeiro definitivo é geralmente um vertebrado (Pinto e Melo 2013b).

Esses parasitas geram preocupações para a saúde pública, pois muitas espécies apresentam potencial zoonótico, com importância médica e veterinária, uma vez que as larvas são estágios de transmissão de diversas doenças (Fried et al. 2004; Pinto e Melo 2013b). Assim como os demais vertebrados, os peixes também podem ser parasitados por digenéticos, geralmente como um segundo hospedeiro intermediário. Esses peixes, quando parasitados, podem apresentar lesões graves, tornando-os suscetíveis a infecções secundárias aumentando a taxa de mortalidade (Pavanelli et al. 2002). No caso das pisciculturas, esse fato pode levar a danos econômicos devido a diminuição da aptidão física dos animais e redução do valor no mercado de peixes (Scholz 1999). As larvas de digenéticos, em especial as metacercárias, são os estágios de desenvolvimento mais prejudiciais para os hospedeiros, podendo eventualmente levar a morte e causar lesões nos tecidos em que se encistam (Jerônimo et al. 2015).

Sendo a segunda maior bacia do estado do Paraná (Brasil), o rio Ivaí é uma considerável área de estudo devido ao seu tamanho, visto que apresenta uma área total de drenagem de 36.540 km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 19% da área do Paraná e é o segundo maior rio em extensão, percorrendo 680 km (Sema 2010). Segundo Frota et al. (2016), são necessários esforços para que a bacia do rio Ivaí seja preservada, por possuir uma alta

heterogeneidade ambiental, grande riqueza de espécies e endemismo. Apresenta também um elevado risco de extinção de determinadas espécies de peixes presentes no local devido a poluição, eutrofização, assoreamento, construção de barragens, pesca e introdução de espécies (Agostinho et al. 2005; Affonso et al. 2015; Frota et al. 2016). Nessa região são encontradas diferentes espécies de gastrópodes, no entanto, não há pesquisas sobre a fauna parasitária desses hospedeiros intermediários. A região do baixo Ivaí é uma das mais ricas e habitadas do estado do Paraná, apresentando extrema importância para a economia regional, seja como fonte de abastecimento, seja para o lazer (Biazin e Santos 2008; Santos et al. 2008). Levando em consideração esses aspectos, o contato direto da população humana com esse corpo d'água é frequente, tornando importante a identificação de possíveis espécies causadoras de doenças (Sema 2010).

Considerando as dificuldades para a identificação de espécies de digenéticos em determinadas fases do ciclo de vida, devido ao tamanho reduzido das larvas e poucas características morfológicas para diagnóstico, técnicas baseadas em marcadores moleculares tornam-se ferramentas de extrema utilidade, possibilitando a identificação de espécies, entre elas as consideradas espécies crípticas (Pinto et al. 2015; Onaca et al. 2019; Ciccheto et al. 2021a, 2021b; Lopes et al. 2021). Embora os ciclos de vida de alguns grupos de trematódeos sejam conhecidos, fases larvais de numerosos *taxa* ainda não foram totalmente elucidadas e a maioria desses parasitas registrados em hospedeiros vertebrados no Brasil ainda não possui o ciclo biológico conhecido (Scholz et al. 2000; Pinto e Melo 2013a, 2013b). A difícil identificação dos estágios larvais acarreta numa identificação pouco precisa ou equivocada dos trematódeos e, dessa maneira, as técnicas moleculares acabam sendo importantes (Locke et al. 2015).

Os marcadores moleculares mais utilizados na identificação desses parasitas são os relacionados as regiões ribossômicas, como o do gene 28S e os que são baseados em DNA mitocondrial, como o *COI*. O marcador molecular ribossômico relacionado ao gene 28S (maior subunidade do ribossomo) é indicado para verificar a presença de variações interespecíficas (Maciel 2016) e na determinação de posições filogenéticas (Alama-Bermejo et al. 2011). O marcador molecular *COI*, relacionado ao gene mitocondrial da subunidade I do citocromo *c* oxidase, é mais utilizado para identificação e para verificar as relações com espécies próximas (Rosa e Paiva 2009). Conhecido como *DNA barcode* ou código de barras, esse marcador mitocondrial também pode ser útil para auxiliar no delineamento inicial de espécies (Hebert et al. 2003).

Dessa maneira, o estudo teve como principal objetivo caracterizar molecularmente os digenéticos encontrados em gastrópodes provenientes do baixo rio Ivaí utilizando o marcador molecular mitocondrial *COI* e o marcador molecular ribossômico 28S. Também foi possível realizar a identificação das espécies de gastrópodes e parasitas que ocorrem na região e obter dados para compreensão do ciclo de vida desses parasitas. Este é o primeiro estudo envolvendo parasitas e gastrópodes como hospedeiros intermediários no rio Ivaí.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta, triagem e preparação do material biológico

A coleta dos espécimes de gastrópodes foi realizada em fevereiro de 2021 na porção do baixo Ivaí, em um trecho do rio próximo ao município de Doutor Camargo (23°35'12.336"S 52°17'27.708"W) (n = 75) e em uma lagoa temporária formada próxima ao leito do rio na mesma região (23°35'11.083"S 52°17'24.313"W) (n = 1). A coleta do material biológico foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio 76413).

Os gastrópodes foram coletados com o auxílio de puçás para possibilitar a coleta dos animais presentes no sedimento e foram armazenados em sacos plásticos com água para serem transportados até o laboratório de Ictioparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia/UEM), onde foram mantidos vivos em aquários até a triagem. Todos os espécimes foram fotografados e alguns foram armazenados em álcool absoluto como material testemunho para as análises morfológicas e extração de DNA.

Para a análise parasitológica, a concha dos gastrópodes foi quebrada e o corpo do animal foi colocado em uma placa de Petri. Durante a triagem, foi retirada a glândula digestiva com a finalidade de extrair os parasitas existentes. Para confirmar a existência de diferentes morfotipos foram confeccionadas lâminas temporárias, montadas com uma gota de água sobre a lâmina de vidro, o parasita e uma lamínula cobrindo o material para visualização em microscópio óptico. Os morfotipos obtidos foram medidos e fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse e200. Quando possível, quatro espécimes de cada morfotipo foram acondicionados individualmente em tubos de 1,5 mL com água Milli-Q e em seguida congelados para posterior extração de DNA.

## 2.2 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA do tecido dos gastrópodes parasitados foi feita utilizando o kit de extração de DNA A1125 Wizard Genomic DNA Purification da Promega®, seguindo as instruções do fabricante. Para a extração do DNA dos parasitas foram selecionados 35 espécimes de diferentes morfotipos e o kit utilizado foi em colunas DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN®, também seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, comparando com DNA Fago  $\lambda$  de concentrações conhecidas.

## 2.3 Amplificação do DNA

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado um termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System da Applied Biosystems®. A reação para a amplificação do DNA dos gastrópodes e parasitas foi realizada com 1 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L, Invitrogen), Tris-KCL (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,87 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 4  $\mu$ M de cada *primer*, DNA molde (10 ng) e água Milli-Q para um volume final de 25  $\mu$ L e 23  $\mu$ L, respectivamente.

Para amplificação da região de interesse do DNA dos gastrópodes, o marcador molecular utilizado foi o *COI* com os *primers* LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3' e HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3', descritos por Folmer et al. (1994). As condições de PCR foram uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; cinco ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 45°C, 1 minuto a 72°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 48°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a amplificação do DNA dos parasitas, foram utilizados *primers* específicos para a região mitocondrial do citocromo *c* oxidase I e a região 28S. Os *primers* utilizados para a região *COI* foram JB3: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' e COI-R trema: 5'-CAACAAATCATGATGCAAAAGG-3', desenvolvidos por Bowles et al. (1995) e Miura et al. (2005), respectivamente. As condições de PCR para esses *primers* foram de acordo com Moszczyńska et al. (2009). A região do gene 28S dos digenéticos foi amplificada parcialmente utilizando os *primers* U178: 5'-GCACCCGCTGAAYTTAAG-3' e L1642: 5'-CCAGCGCCATCCATTTTCA-3' (Lockyer et al. 2003). Também foi utilizado um *primer* interno para o sequenciamento do gene 28S, 1500R (R): 5'-

GCTATCCTGAGGGAACTTCG-3' (Olson et al. 2003). As condições para a amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 54°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos foi estimado com a utilização de um marcador de peso molecular conhecido (DNA *Ladder* 100 pb). Os produtos obtidos da amplificação do DNA foram purificados seguindo protocolo descrito por Rosenthal et al. (1993). O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda em sequenciador automático ABI 3500 da Applied Biosystems® e utilizando o kit BigDye® Terminator.

O acesso ao patrimônio genético das espécies de gastrópodes e parasitas foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen A38AE84).

## 2.4 Análises dos dados

Os eletroferogramas obtidos do sequenciamento foram editados manualmente utilizando o programa BioEdit v7 (Hall 1999) e o alinhamento das sequências foi realizado pelo programa MEGA7 (Kumar et al. 2016), a partir do algoritmo de alinhamentos múltiplos CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). A ferramenta BLASTn (Altschul et al. 1990) foi utilizada para a comparação das sequências obtidas com sequências depositadas no GenBank, visando a obtenção de valores de similaridade genética. O programa jModelTest 2 (Darriba et al. 2012) foi utilizado para selecionar o melhor modelo de substituição nucleotídica e a distância  $p$  foi calculada com o programa MEGA7. O programa DnaSP v6 (Rozas et al. 2017) foi utilizado para caracterização dos haplótipos.

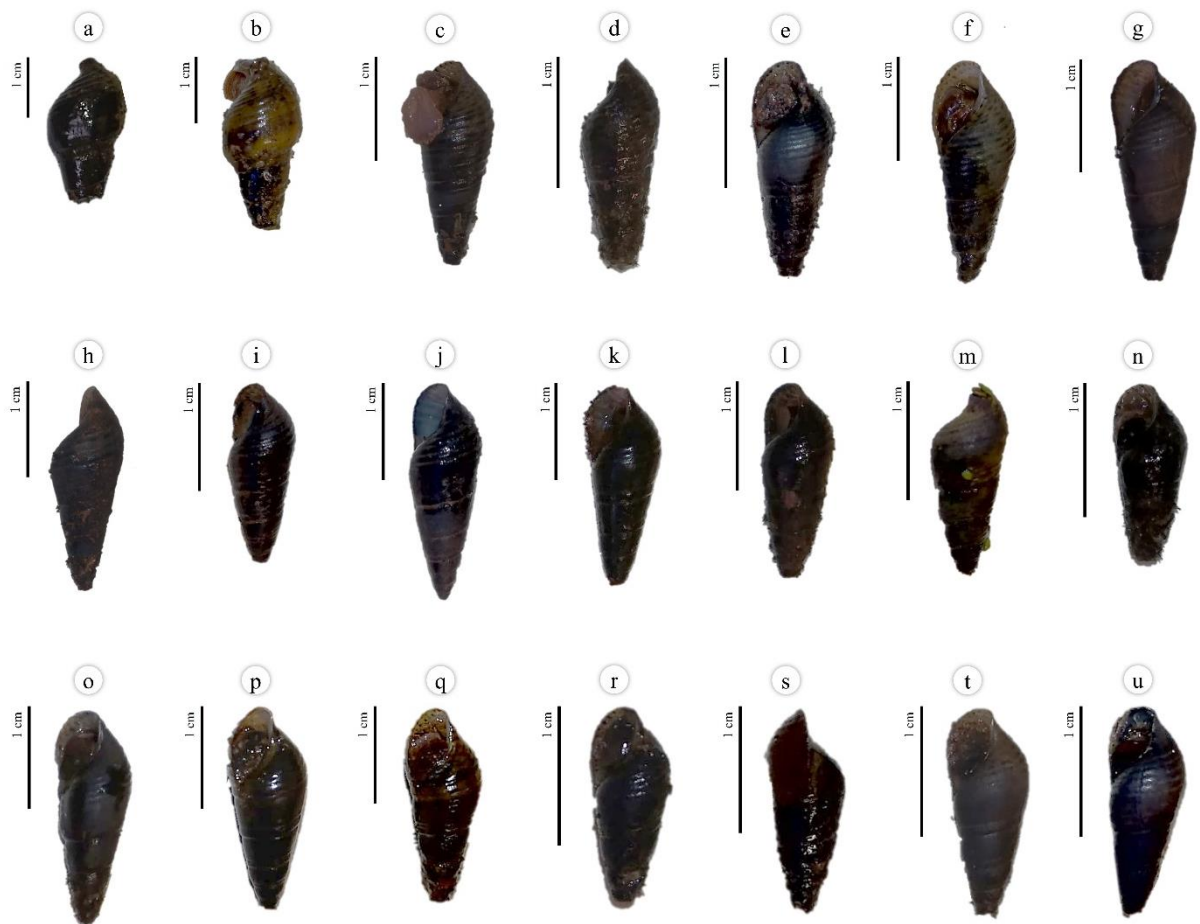
Sequências disponibilizadas no GenBank foram adicionadas às análises para comparação com as sequências obtidas de espécimes do rio Ivaí. Para os gastrópodes, foram adicionadas todas as sequências disponíveis da região *COI* de duas espécies, *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954 e *A. brunneum* Vogler & Peso, 2014 e uma sequência de *Doryssa* sp. (JQ966087) foi incluída à análise como grupo externo. Para os parasitas, sequências de quatro espécies que apresentaram maior similaridade com as espécies do rio Ivaí de acordo com a ferramenta BLASTn foram adicionadas às análises e como grupo externo foi adicionada uma sequência de *Australapatemon burti* Miller, 1923 (KY207548 e JX977785). As reconstruções filogenéticas foram feitas a partir do método de máxima verossimilhança utilizando o programa MEGA7.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificação e caracterização molecular dos gastrópodes provenientes do rio Ivaí

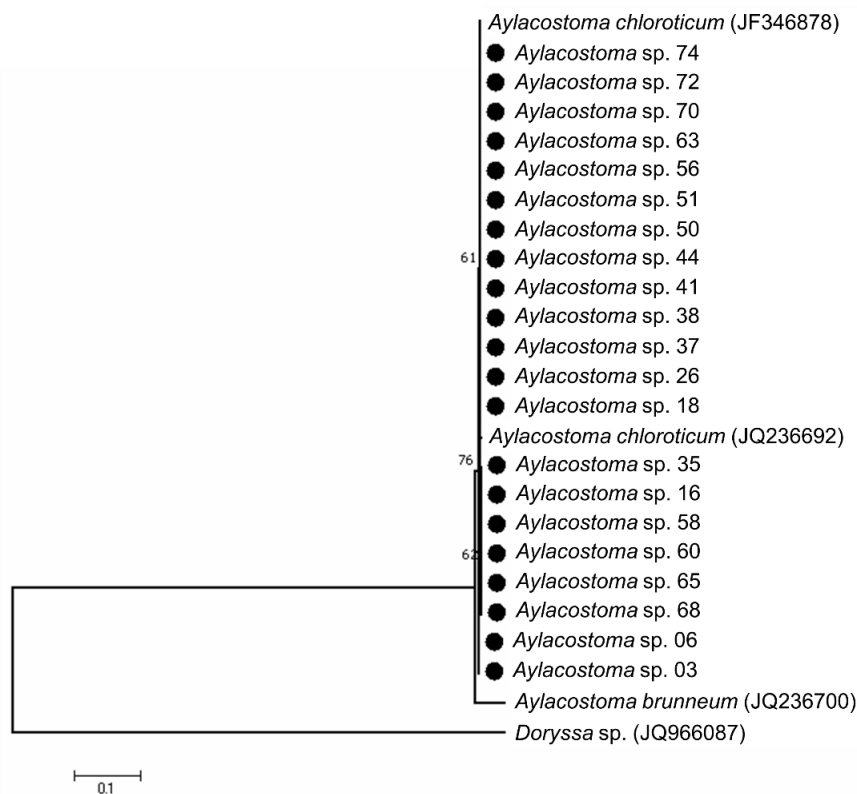
Os gastrópodes coletados foram identificados morfológicamente como *Aylacostoma* Spix, 1827 e foram obtidas sequências com 645 pb de 21 gastrópodes parasitados utilizando o marcador molecular *COI* (Fig. 1). Com base nessas sequências e utilizando a ferramenta BLASTn, todos os gastrópodes apresentaram valores de similaridade variando de 99,84 a 100% com *Aylacostoma chloroticum* disponível no GenBank.



**Fig. 1** Espécimes de *Aylacostoma chloroticum* parasitados coletados no rio Ivaí. Apenas o espécime **o** foi coletado na lagoa temporária próxima ao rio. **a** Gastrópode 3. **b** Gastrópode 6. **c** Gastrópode 16. **d** Gastrópode 18. **e** Gastrópode 26. **f** Gastrópode 35. **g** Gastrópode 37. **h** Gastrópode 38. **i** Gastrópode 41. **j** Gastrópode 44. **k** Gastrópode 50. **l** Gastrópode 51. **m** Gastrópode 56. **n** Gastrópode 58. **o** Gastrópode 60. **p** Gastrópode 63. **q** Gastrópode 65. **r** Gastrópode 68. **s** Gastrópode 70. **t** Gastrópode 72. **u** Gastrópode 74.

O alinhamento final das sequências do rio Ivaí juntamente com as sequências do banco de dados genético apresentou 627 pb. Foram obtidos três haplótipos distintos para as sequências provenientes dos gastrópodes do rio Ivaí, dentre os quais há um haplótipo compartilhado com as sequências do banco de dados. A composição nucleotídica foi, em média, T = 35,9%, C = 18,4%, A = 26,5% e G = 19,1%.

Uma matriz contendo os valores de distância  $p$  entre as sequências está demonstrada no Apêndice A. As distâncias genéticas entre sequências de *A. chloroticum* depositadas nos bancos de dados e as espécies do rio Ivaí variaram de 0 a 0,3%. A distância  $p$  entre *A. brunneum* e *A. chloroticum* disponíveis no GenBank foi de aproximadamente 4%, assim como a distância entre as sequências de *A. brunneum* e as sequências obtidas dos gastrópodes provenientes do rio Ivaí. Na árvore gênica apresentada na figura 2, todos os gastrópodes do rio Ivaí foram agrupados em um grande clado formado por *A. chloroticum*.



**Fig. 2** Árvore gênica construída pelo método de máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição nucleotídica HKY + G, com 1000 reamostragens de *bootstrap*. a partir de sequências de *COI* obtidas neste estudo e sequências de *Aylacostoma* disponíveis no GenBank. A barra de escala indica o número substituições de nucleotídeos por sítio. As sequências marcadas com um círculo preenchido foram as obtidas neste estudo. *Doryssa* sp. foi utilizado como grupo externo.

### 3.2 Identificação e caracterização molecular dos digenéticos parasitas de gastrópodes do rio Ivaí

Dos 76 gastrópodes analisados, 21 estavam parasitados por estágios larvais de rédias e/ou cercárias (27,63%). Os parasitas obtidos foram, a princípio, separados em 16 morfotipos. Os morfotipos encontrados com maior frequência foram os morfotipos 3 e 4, com prevalência de 9,21% e 11,84%, respectivamente. Em seguida, o morfotipo 5 apresentou uma prevalência de 3,94%, enquanto os demais morfotipos foram encontrados em apenas um ou dois indivíduos.

Com base nas análises moleculares, foi possível agrupar os 16 morfotipos em quatro grupos distintos (Fig. 3), visto que foram encontradas quatro espécies de maior similaridade com a ferramenta BLASTn. O primeiro grupo abrange os morfotipos 1 e 2 (Fig. 3a), o segundo grupo os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 (Fig. 3b), o terceiro grupo compreende apenas o morfotipo 5 (Fig. 3c) e no quarto grupo estão os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 (Fig. 3d-e). Para os morfotipos presentes no quarto grupo, as medidas de rédias e de uma cercária foram obtidas. Para os demais morfotipos foram obtidas apenas as medidas dos estágios de rédias, exceto para o morfotipo 5 que foram obtidas apenas as medidas de cercárias. As medidas médias de cada grupo são apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** Medidas médias (min-máx), em  $\mu\text{m}$ , de digenéticos parasitas dos gastrópodes provenientes do rio Ivaí. Para o estágio de cercária dos morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 há a medida de apenas um espécime.

		<b>Morfotipos 1 e 2 (<math>n = 5</math>)</b>	<b>Morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 (<math>n = 5</math>)</b>	<b>Morfotipo 5 (<math>n = 5</math>)</b>	<b>Morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 (<math>n = 7</math>)</b>
<b>Rédias</b>	Comprimento total	668 (620-710)	776 (620-1200)	-	546 (450-600)
	Largura do corpo	110 (80-130)	146 (110-170)	-	69 (50-120)
<b>Cercárias</b>	Comprimento total	-	-	119,04 (102,2-140)	513,6
	Comprimento do corpo	-	-	78,08 (43,2-100)	153,6
	Largura do corpo	-	-	62,16 (28,8-90)	84
	Comprimento da cauda	-	-	35,2 (28,8-40)	360



**Fig. 3** Representantes dos diferentes morfotipos de digenéticos encontrados nos gastrópodes provenientes do rio Ivaí. **a** Rédia, representante da espécie dos morfotipos 1 e 2. **b** Rédia, representante da espécie dos morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14. **c** Cercária, representante da espécie do morfotipo 5. **d** Rédia, representante da espécie dos morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16. **e** Cercária, representante da espécie dos morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16.

Com base no marcador mitocondrial, foram obtidas 35 sequências de 659 pb que apresentaram maiores valores de similaridade com as espécies: *Plagiorchis* sp., *Philophthalmus* sp., Lecithodendriidae gen. sp. e *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924) (Tabela 2).

**Tabela 2** Percentuais de identidade de acordo com a ferramenta BLASTn encontrados para as 35 sequências de parasitas coletados no rio Ivaí utilizando o marcador molecular *COI*.

Morfotipo	Gastrópode	Estágio	BLASTn	Per. Ident.	Acesso
1	3	Rédia	<i>Plagiorchis</i> sp.	81,39%	LC599796
2	3	Rédia	<i>Plagiorchis</i> sp.	81,91%	LC599796
3	6	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
3	37	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
3	44	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
3	51	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
3	68	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695

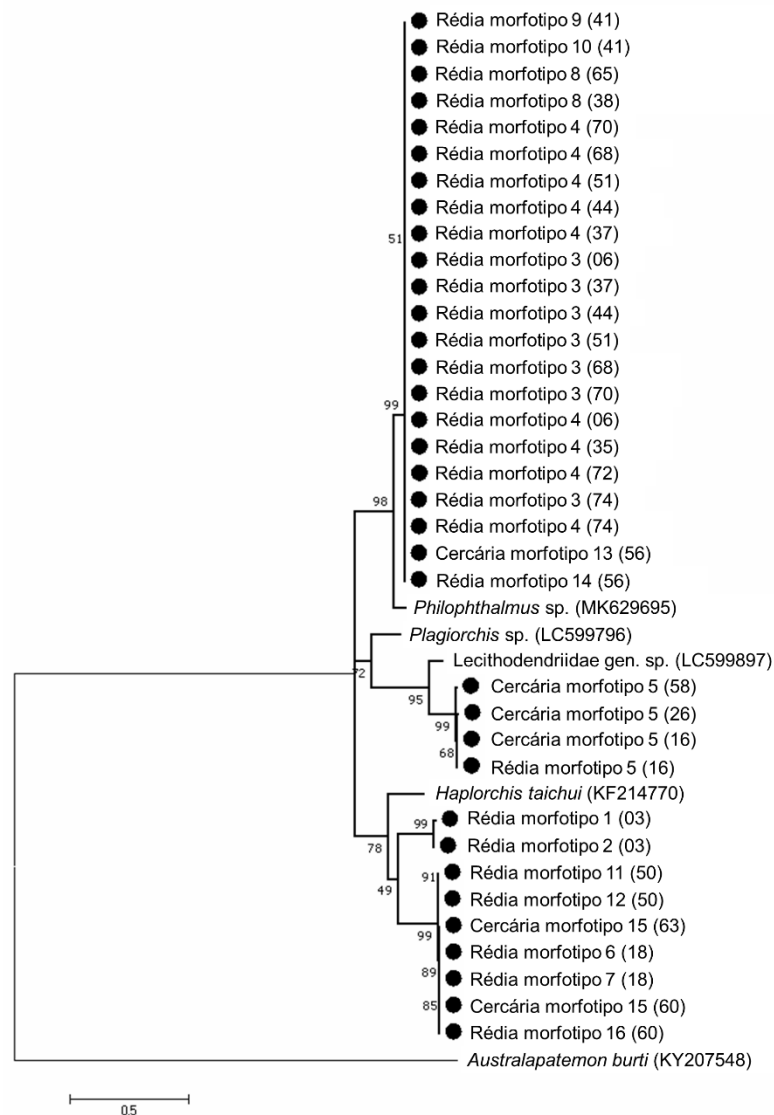
3	70	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
3	74	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,64%	MK629695
4	6	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	35	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,33%	MK629695
4	37	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	44	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	51	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	68	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	70	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
4	72	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,64%	MK629695
4	74	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,64%	MK629695
5	16	Cercária	Lecithodendriidae gen. sp.	87,12%	LC599897
5	16	Rédia	Lecithodendriidae gen. sp.	87,12%	LC599897
5	26	Cercária	Lecithodendriidae gen. sp.	87,27%	LC599897
5	58	Cercária	Lecithodendriidae gen. sp.	86,95%	LC599897
6	18	Rédia	<i>Haplorchis taichui</i>	79,41%	KF214770
7	18	Rédia	<i>Haplorchis taichui</i>	79,41%	KF214770
8	38	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
8	65	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
9	41	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
10	41	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,49%	MK629695
11	50	Rédia	<i>Haplorchis taichui</i>	79,57%	KF214770
12	50	Rédia	<i>Haplorchis taichui</i>	79,57%	KF214770
13	56	Cercária	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,64%	MK629695
14	56	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	91,64%	MK629695
15	60	Cercária	<i>Haplorchis taichui</i>	79,41%	KF214770
15	63	Cercária	<i>Haplorchis taichui</i>	79,41%	KF214770
16	60	Rédia	<i>Haplorchis taichui</i>	79,41%	KF214770

Os percentuais de identidade para os 16 morfotipos de digenéticos variaram de 79,41 a 91,64% com sequências do banco de dados, sendo que o grupo mais próximo foi *Philophthalmus* sp. Para o morfotipo 5, tanto o estágio de rédia quanto de cercária apresentaram maior identidade com uma espécie de Lecithodendriidae Lühe, 1901.

O alinhamento final das sequências de *COI* obtidas dos parasitas desse estudo e sequências do GenBank apresentou 658 pb. Foram encontrados 12 haplótipos distintos entre as sequências dos parasitas do rio Ivaí, que apresentaram a composição nucleotídica, em média, T = 44,6%, C = 11,4%, A = 17,4% e G = 26,7%. Nenhum haplótipo foi compartilhado com as espécies de maior similaridade obtidas pela ferramenta BLASTn.

A matriz de distância *p* está apresentada no Apêndice B. Os morfotipos 1 e 2 apresentaram distância *p* com os demais morfotipos superior a 21% e a distância *p* entre esses dois morfotipos foi de 0,8%. As distâncias entre os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 variaram de 0 a 0,3%. O morfotipo 5 apresentou uma distância *p* dos demais morfotipos superior a 28% e os valores de distâncias *p* entre o morfotipo 5 dos diferentes hospedeiros variaram de 0 a 1,3%. Os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 tiveram distâncias entre si variando de 0 a 0,8%. Quanto as distâncias encontradas entre as espécies obtidas do GenBank e os morfotipos de digenéticos provenientes do rio Ivaí, estas variaram de 8,4 a 30,2%.

Os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 formaram um agrupamento único que tem como grupo irmão *Philophthalmus* sp. O morfotipo 5, tanto os estágios de rédia quanto de cercária, formaram um outro grupo, irmão de *Lecithodendriidae* gen. sp. Por fim, os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 formaram um grupo irmão do agrupamento composto pelos morfotipos 1 e 2. Ambos os agrupamentos ficaram próximos à *H. taichui* (Fig. 4).



**Fig. 4** Árvore gênica construída pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de substituição nucleotídica HKY + G, a partir de sequências de digenéticos, utilizando o marcador molecular *COI*. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os *taxa* associados foram agrupados no teste de *bootstrap* com 1000 repetições estão representadas ao lado dos ramos. Todas as posições contendo *gaps* e dados ausentes foram desconsideradas. A barra de escala indica o número substituições de nucleotídeos por sítio. As sequências marcadas com um círculo preenchido são as obtidas neste estudo e os números entre parênteses correspondem aos hospedeiros. *Australapatemon burti* foi utilizado como grupo externo.

Relacionado ao marcador 28S, foram obtidas 35 sequências de 642 pb. Segundo a ferramenta BLASTn, as espécies mais próximas aos morfotipos encontrados no rio Ivaí foram: *Metagonimus suisfunensis* Shumenko, Tatonova & Besprozvannykh, 2017, *Philopthalmus* sp., Trematoda sp. e *Pseudosellacotyla lutzii* (Freitas, 1941) (Tabela 3).

**Tabela 3** Valores de similaridade obtidos com a ferramenta BLASTn para as 35 sequências de parasitas encontrados no rio Ivaí utilizando o marcador molecular 28S.

Morfotipo	Gastrópode	Estágio	BLASTn	Per. Ident.	Acesso
1	3	Rédia	<i>Metagonimus suisfunensis</i>	93,30%	KX387460
2	3	Rédia	<i>Metagonimus suisfunensis</i>	93,30%	KX387460
3	6	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
3	37	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
3	44	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
3	51	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
3	68	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,19%	LC474511
3	70	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
3	74	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	6	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	35	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	37	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	44	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	51	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	68	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,19%	LC474511
4	70	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	72	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
4	74	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
5	16	Cercária	Trematoda sp.	97,44%	MH094418
5	16	Rédia	Trematoda sp.	98,08%	MH094418
5	26	Cercária	Trematoda sp.	98,08%	MH094418
5	58	Cercária	Trematoda sp.	97,92%	MH094418
6	18	Rédia	<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	99,53%	MH368357
7	18	Rédia	<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	99,53%	MH368357
8	38	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
8	65	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
9	41	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
10	41	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,19%	LC474511
11	50	Rédia	<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	99,53%	MH368357
12	50	Rédia	<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	99,53%	MH368357



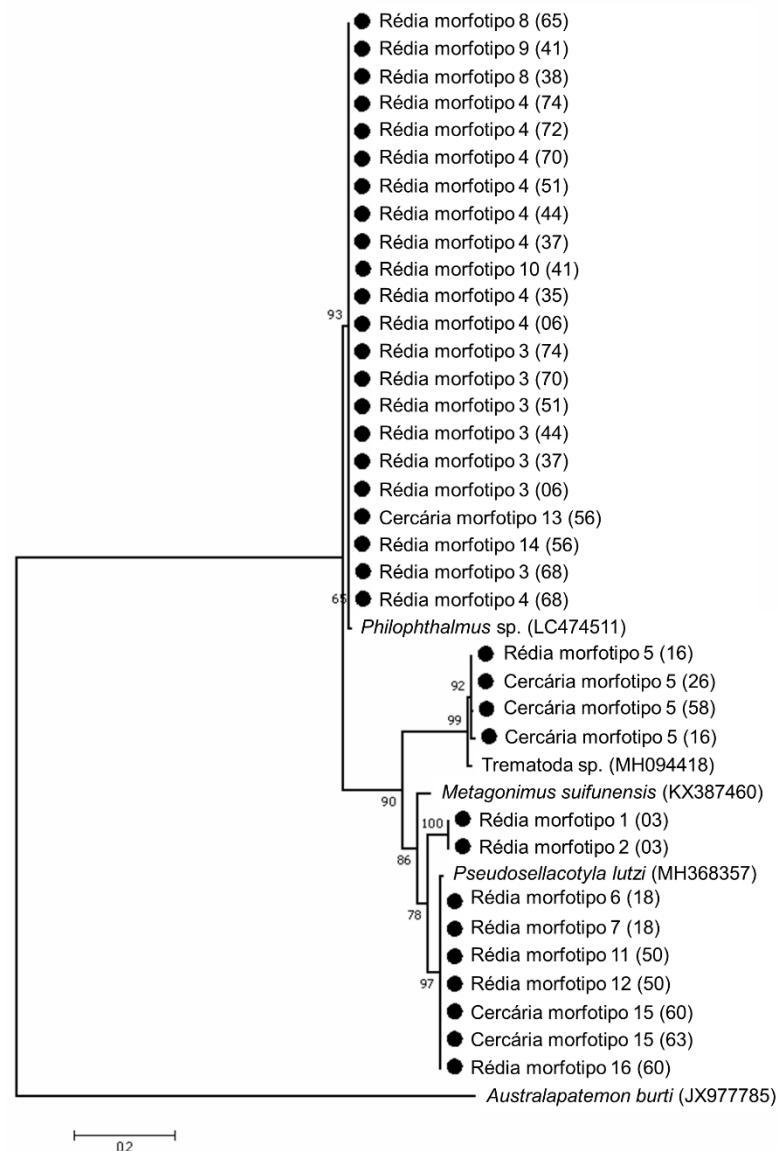
13	56	Cercária	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
14	56	Rédia	<i>Philophthalmus</i> sp.	99,35%	LC474511
15	60	Cercária	<i>Pseudosellacotyla lutzii</i>	99,53%	MH368357
15	63	Cercária	<i>Pseudosellacotyla lutzii</i>	99,53%	MH368357
16	60	Rédia	<i>Pseudosellacotyla lutzii</i>	99,53%	MH368357

As porcentagens de identidade obtidas com base na ferramenta BLASTn para os 16 morfotipos de digenéticos variaram de 93,30% a 99,53%, apresentando valores de similaridade superiores aos encontrados com o marcador *COI*. Diferente do encontrado com o marcador mitocondrial, o grupo mais próximo das espécies encontradas no rio Ivaí utilizando o marcador 28S foi *P. lutzii*.

O alinhamento final das sequências obtidas nesse estudo, com o marcador 28S e as sequências disponíveis no GenBank, apresentou 640 pb. Foram obtidos oito haplótipos distintos para as sequências dos parasitas encontrados no rio Ivaí, com a seguinte composição nucleotídica média: T = 23,9%, C = 22,8%, A = 20,2% e G = 33,2%. Assim como com o marcador *COI*, nenhum haplótipo foi compartilhado com as espécies de maior similaridade apresentadas pela ferramenta BLASTn.

Uma matriz de distância *p* está apresentada no Apêndice C. Os morfotipos 1 e 2 apresentaram uma distância *p* entre si igual a zero e com os demais morfotipos foram encontradas distâncias superiores a 16,3%. Os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14, os quais foram mais similares com base na ferramenta BLASTn com *Philophthalmus* sp., apresentaram valores de distância *p* variando de 0,5 a 0,7% com essa espécie e as distâncias entre esses morfotipos variaram de 0 a 0,3%. Os valores de distância do morfotipo 5 de diferentes hospedeiros variaram de 0 a 0,8% e esse morfotipo com Trematoda sp. apresentou uma distância *p* variando de 1,2 a 1,9%. Por fim, os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16, que tiveram maiores valores de similaridade com *P. lutzii*, apresentaram uma distância *p* de 0,3% com essa espécie, sendo o menor valor de distância *p* encontrado quando comparado esses morfotipos com a espécie do GenBank.

Na árvore gênica, é possível observar que os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 formaram um agrupamento único com *Philophthalmus* sp. O morfotipo 5 ficou como grupo irmão de Trematoda sp. Os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 formaram um clado com *P. lutzii*, espécie na qual foi observado o menor valor de distância *p* e o maior valor de identidade baseado na ferramenta BLASTn. Esse grupo ficou como grupo irmão do clado formado pelos morfotipos 1 e 2 (Fig. 5).



**Fig. 5** Árvore gênica construída pelo método de máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR + G, a partir de sequências de digenéticos, utilizando o marcador molecular 28S. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os *taxa* associados foram agrupados no teste de *bootstrap* com 1000 repetições estão representadas ao lado dos ramos. Todas as posições contendo *gaps* e dados ausentes foram desconsideradas. A barra de escala representa o número substituições de nucleotídeos por sítio. As sequências marcadas com um círculo preenchido são as obtidas neste estudo e o número entre parênteses representa os hospedeiros. *Australapatemon burti* foi utilizado como grupo externo.

Considerando as análises moleculares, os 16 morfotipos denominados inicialmente referem-se a quatro morfotipos distintos, visto que foram caracterizadas quatro espécies com base na ferramenta BLASTn. Dessa maneira, os 16 morfotipos representam diferentes

estágios dos quatro morfotipos de digenéticos provenientes do rio Ivaí. Os morfotipos 1 e 2 são dois estágios de uma mesma espécie, os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 são diferentes estágios de *Philophthalmus* Looss, 1899 e os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 são estágios distintos de *Pseudosellacotyla* Yamaguti, 1954. O morfotipo 5, como proposto, é um morfotipo diferente dos demais.

#### 4 DISCUSSÃO

Até o momento, não há registros na literatura de ocorrência de *Aylacostoma chloroticum* na bacia do rio Ivaí. Dessa maneira, esse trabalho é pioneiro ao registrar essa espécie na região. Destaca-se também o fato dos diferentes estágios larvais de espécies de digenéticos serem encontrados pela primeira vez nesse hospedeiro intermediário no baixo Ivaí, uma vez que são espécies que ainda não foram relatadas na literatura disponível.

Segundo Simone (2006), há cerca de 33 espécies pertencentes à *Aylacostoma* no Brasil, apresentando ampla distribuição. É possível mencionar algumas espécies como *A. chloroticum*, *A. francana* (Ihering, 1909), *A. tenuilabris* (Reeve, 1860), *A. brasiliensis* (Moricand, 1939), *A. ci* Simone, 2001 e *A. pulcher* (Reeve, 1860) (Simone 2001; França et al. 2007; Paschoal et al. 2013; Birckolz et al. 2016). No entanto, não são encontrados muitos estudos envolvendo essas espécies, principalmente utilizando técnicas moleculares, o que dificulta a obtenção de dados a respeito desse gênero. Embora a morfologia da concha seja um dos critérios mais tradicionais para a identificação desses gastrópodes, apenas esse carácter acaba não sendo suficiente, visto que morfologicamente espécies de *Aylacostoma* são muito semelhantes a *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), espécie invasora no Brasil e a espécies de *Doryssa* H. Adams & A. Adams, 1854 (Fernandez et al. 2012).

O gastrópode *A. chloroticum* é uma espécie dulcícola endêmica de regiões neotropicais. Há registros de ocorrência dessa espécie na região do alto rio Paraná entre o Paraguai e Argentina (Hylton Scott 1954; Vogler 2012; Vogler et al. 2014), assim como na planície de inundação do alto rio Paraná no Mato Grosso do Sul (Onaca et al. 2019). A maioria dos aspectos genéticos e moleculares de *A. chloroticum* ainda são desconhecidos, com poucos estudos publicados a respeito. No entanto, um estudo molecular realizado por Vogler et al. (2010) envolveu o sequenciamento da região *barcode* desses gastrópodes encontrados na Argentina e algumas sequências obtidas foram utilizadas como comparativo para as sequências obtidas dos espécimes do rio Ivaí. Nesse mesmo estudo, não foi encontrada variabilidade genética entre os espécimes analisados, diferente do ocorrido com os espécimes

analisados do rio Ivaí, os quais apresentaram mais de um haplótipo, indicando a presença de polimorfismos.

Dessa maneira, com base no marcador do gene *COI*, os 21 gastrópodes parasitados coletados no rio Ivaí pertencem a *A. chloroticum*, visto que os valores de distância *p* encontrados entre esses gastrópodes e as sequências disponíveis no GenBank são inferiores a 3% como sugere Hebert et al. (2003). O percentual de similaridade obtido pela ferramenta BLASTn e posicionamento filogenético contribuirão também para essa confirmação.

Referente as relações de parasitismo, *A. chloroticum* foi descrito como hospedeiro intermediário de alguns digenéticos, tais como *Stephanoprora aylacostoma* Ostrowski de Núñez & Quintana, 2008 (Núñez e Quintana 2008), *Paralecithodendrium parvouterus* (Bhalerao, 1926) (Onaca et al. 2019), *Pseudosellacotyia lutzi* (Quintana e Núñez 2014; Onaca et al. 2019) e mais recentemente *Philophthalmus aylacostoma* Pulido-Murillo, Tkach & Pinto, 2022 (Pulido-Murillo et al. 2022). Esse estudo amplia o conjunto de parasitas identificados em *A. chloroticum*, acrescentando novas espécies de *Philophthalmus* e *Pseudosellacotyia*.

A ferramenta BLASTn auxiliou na identificação de *taxa* próximos dos 16 morfotipos de parasitas encontrados no rio Ivaí, apresentando os maiores valores de similaridade genética com *Plagiorchis* sp., *Philophthalmus* sp., Lecithodendriidae gen. sp. e *Haplorchis taichui* para o marcador mitocondrial e *Metagonimus suisfunensis*, *Philophthalmus* sp., Trematoda sp. e *P. lutzi* para o marcador ribossômico 28S. Diferentes morfotipos foram identificados como mesmas espécies devido ao fato de compartilharem o mesmo haplótipo ou terem sequências muito próximas. Também é importante considerar que foram encontrados 16 morfotipos distintos, com base na morfologia, em função dos diferentes estágios de desenvolvimento encontrados para as rédias e cercárias.

Com base nas informações genéticas obtidas pelo marcador *COI*, não foi possível confirmar a identidade à nível de espécie de nenhum morfotipo, visto que todos os valores de distância *p* encontrados foram superiores a 3%, valor sugerido por Hebert et al. (2003) para espécies distintas. Ademais, os percentuais de identidade fornecidos pela ferramenta BLASTn, assim como o posicionamento dos espécimes na reconstrução filogenética confirmam que não se trata das mesmas espécies disponíveis nos bancos de dados. Há registros de *Philophthalmus* utilizando *A. chloroticum* como hospedeiro intermediário na planície de inundação do alto rio Paraná (Onaca et al. 2019), no entanto, a similaridade com as sequências *COI* obtidas nesse estudo foi relativamente baixa, inferindo ser uma espécie do mesmo gênero, mas não a mesma encontrada por Onaca et al. (2019).

Em trabalhos realizados por Literák et al. (2013) e Onaca et al. (2019) utilizando o marcador mitocondrial, foram encontrados valores de distância  $p$  de 13,8 a 15,4% para espécies diferentes dentro de um mesmo gênero, em ambos os casos referindo-se a *Philophthalmus*. Considerando que os valores de distância  $p$  encontrados no atual estudo foram inferiores aos encontrados pelos autores mencionados, variando de 8,4 a 8,6%, é possível afirmar que o marcador *COI* foi útil para identificar esse gênero, corroborando com os resultados encontrados com o marcador 28S.

O marcador 28S se mostrou mais eficaz na identificação dos parasitas quando comparado ao marcador mitocondrial, visto que possibilitou a identificação de dois gêneros diferentes. O marcador ribossômico apresentou maiores percentuais de identidade e consequentemente menores valores de distância  $p$  entre as espécies próximas disponíveis no banco de dados, o que era esperado devido ao fato da região ribossômica 28S ser mais conservada e sofrer menos variações quando comparada ao gene mitocondrial (Brown et al. 1979; Solferini e Selivon 2012; Segatto et al. 2017). No entanto, também não foi possível afirmar quais são as espécies encontradas no rio Ivaí.

Em um trabalho realizado por Pinto et al. (2015), os autores consideraram valores de distância maiores que 0,1% para o marcador 28S suficientes para representar espécies diferentes, porém tratando-se de espécies congêneres e levando em consideração no presente estudo, todas as espécies próximas obtidas pela ferramenta BLASTn apresentaram valores de distância  $p$  superiores ao sugerido. Embora não se tenha chegado em uma classificação à nível de espécie, pode-se afirmar que os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 pertencem a uma espécie de *Philophthalmus*, confirmando o encontrado para o marcador mitocondrial e os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 enquadram-se em *Pseudosellacotyla*, considerando que os valores de distância  $p$  variaram de 0,3 a 0,7% e esses morfotipos ficaram agrupados na árvore gênica juntamente com os gêneros mencionados, o que não foi observado para o marcador *COI*.

Na literatura não há valores de distância genética para comparação relacionado a Lecithodendriidae com o marcador *COI*. Entretanto, considerando que para espécies diferentes pertencentes a um mesmo gênero são encontrados os valores de 13,8 a 15,4% como descritos acima, é provável que o morfotipo 5 refere-se a uma espécie dessa família, pois os valores de distância encontrados são menores que os encontrados para espécies do mesmo gênero. Com base na morfologia externa, esse morfotipo se assemelha ao digenético encontrado por Lopes et al. (2021), onde os autores identificaram como sendo pertence a essa mesma família. Também é preciso considerar que a falta de informações nos bancos de dados

genéticos sobre a identificação correta desses parasitas limita a identificação desse morfotipo a um nível mais específico.

A respeito das espécies mais similares encontradas para os espécimes do rio Ivaí, espécies de *Philophthalmus* utiliza também gastrópodes pertencentes a *M. tuberculata* como primeiro hospedeiro intermediário assim como ocorre com *A. chloroticum* (Pinto e Melo 2010; Onaca et al. 2019). É importante considerar que a maioria dos trematódeos pertencentes à Philophthalmidae Looss, 1899 são encontrados nos olhos de aves e mamíferos no estágio adulto, inclusive com relatos de parasitismo em seres humanos (Freitas 1955; Muniz-Pereira e Amato 1993; Kanev et al. 1993; Nollen e Kanev 1995; Pinto et al. 2005; Verocai et al. 2009; Pinto e Melo 2010). Espécies pertencentes à Lecithodendriidae geralmente possuem como hospedeiros definitivos os morcegos e há apenas um relato na literatura de uma espécie de cercária encontrada no Brasil (Lopes et al. 2021). O digenético *P. lutzi* foi registrado utilizando *A. chloroticum* como hospedeiro intermediário em seu ciclo de vida, assim como o ocorrido com os gastrópodes do rio Ivaí (Quintana e Núñez 2014; Onaca et al. 2019). Incluído atualmente na família Cryptogonimidae Ward, 1917 devido a estudos realizado por Quintana e Núñez (2014) com base na morfologia e ciclo de vida e Pantoja et al. (2018) por meio de técnicas filogenéticas, *P. lutzi* é encontrado como parasita de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) no Brasil, Argentina e Colômbia (Kohn e Fernandes 1987; Kohn et al. 2011; Quintana e Núñez 2014; Pantoja et al. 2018).

É importante salientar que embora as espécies do presente estudo tenham apresentado similaridade com as espécies descritas anteriormente, a reconstrução filogenética e os valores de distância *p* confirmam novamente que não são as mesmas espécies, mas possivelmente espécies próximas filogeneticamente. Ademais, o fato de ter sequências depositadas nos bancos de dados genéticos utilizando o marcador molecular *COI* e não ter a sequência das mesmas espécies com o marcador 28S acaba limitando a identificação mais precisa desses organismos, sendo o contrário também válido, visto que foi possível observar essa situação ao analisar as espécies do atual estudo. Por esse motivo é importante a utilização de pelo menos dois marcadores moleculares e preferivelmente combinando marcadores mitocondriais, como *COI* e marcadores ribossomais, como o 28S (Blasco-Costa et al. 2016).

Também é importante considerar os impactos sociais que o estudo apresenta. Considerando que os trematódeos digenéticos são causadores de doenças em animais e em seres humanos (Neves 2004), a identificação dos estágios larvais é essencial para que sejam tomadas medidas profiláticas contra essas doenças. Os gastrópodes são hospedeiros intermediários desses parasitas e realizando estudos como este torna-se possível compreender

o ciclo de vida dos digenéticos e inferir sobre quais espécies são encontradas no rio Ivaí. A utilização de ferramentas moleculares contribui para uma identificação mais precisa das espécies encontradas em estágios larvais, apresentando importância também para a saúde pública, visto que a população possui contato direto com o rio, seja de forma recreativa ou alimentando-se dos peixes. Portanto, este trabalho contribuiu para a identificação de dois gêneros de digenéticos presentes no rio Ivaí, sendo o pioneiro a respeito da fauna parasitária encontrada em gastrópodes que atuam como hospedeiros intermediários.

Embora seja fato que há um problema relacionado a saúde pública devido as doenças causadas por parasitas, é preciso reconhecer a importância ecológica desses organismos. De um modo geral, os parasitas são responsáveis pela regulação das populações hospedeiras, estão relacionados a estabilidade da cadeia alimentar e realizam a organização dos ecossistemas (Hudson et al. 2006; Goater et al. 2014). Também desempenham papéis de extrema importância nos ecossistemas, como promover a biodiversidade, sendo que uma alta diversidade de parasitas pode ser associada a ecossistemas mais saudáveis (Hudson et al. 2006).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que o marcador mitocondrial *COI* foi eficaz na identificação de *Aylacostoma*. Todos os 21 gastrópodes parasitados pertencem à *Aylacostoma chloroticum*. Quanto aos digenéticos provenientes do rio Ivaí, o marcador 28S se mostrou mais eficaz quando comparado ao marcador *COI*, visto que possibilitou a identificação de dois *taxa* distintos. Com base no marcador ribossômico, os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 referem-se a uma espécie de *Philophthalmus*, também identificado com o marcador mitocondrial e os morfotipos 6, 7, 11, 12, 15 e 16 correspondem à uma espécie de *Pseudosellacotyla*. Para os demais morfotipos, não foi possível chegar a uma identificação específica, uma vez que as informações genéticas obtidas não foram suficientes.

## REFERÊNCIAS

Affonso IP, Azevedo RF, Santos NLC et al (2015) Pulling the plug: strategies to preclude expansion of dams in Brazilian rivers with high-priority for conservation. *Natureza & Conservação* 13:199-203. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2015.11.008>

- Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC (2005) Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade* 1:70-78.
- Alama-Bermejo G, Monteiro FE, Raga JA, Holzer AS (2011) *Skoulekia meningialis* n. gen., n. sp. (Digenea: Aporocotylidae Odhner, 1912) a parasite surrounding the brain of the Mediterranean common two-banded seabream *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817) (Teleostei: Sparidae): Description, molecular phylogeny, habitat and pathology. *Parasitology International* 60:34-44. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.001>
- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Biazin PC, Santos ML (2008) Características geomórficas do canal e das formas de leito do rio Ivaí em seu curso inferior, Icaraíma PR. *Revista Brasileira de Geomorfologia* 9:43-52. <https://doi.org/10.20502/rbg.v9i1.100>
- Birckolz CJ, Salvador RB, Cavallari DC, Simone LRL (2016) Illustrated checklist of newly described (2006-2016) land and freshwater Gastropoda from Brazil. *Arch Molluskenkunde* 145:133-150. [10.1127/arch.moll/145/133-150](https://doi.org/10.1127/arch.moll/145/133-150)
- Blasco-Costa I, Cutmore SC, Miller TL, Nolan MJ (2016) Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. *Syst Parasitol* 93:295-306. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9631-2>
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1995) A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:103-109. <https://doi.org/10.1006/mpev.1995.1011>
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS* 76:1967-1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Ciccheto JRM, Stabile BHM, Fabrin TMC et al (2021a) The first record of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in southern Brazil supported by molecular data. *An Acad Bras Ciênc* 93. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191017>
- Ciccheto JRM, Stabile BHM, Fermino F et al (2021b) Molecular evidence of new freshwater turtle blood flukes (Digenea: Spirorchiiidae) in the intermediate snail host *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 in an urban aquatic ecosystem in Brazil. *Parasitol Res* 120:133-143. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06945-4>



- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Fernandez MLA, Santos SB, Miyahira IC et al (2012) Gastrópodes límnicos invasores: morfologia comparada. In: Mansur MCD, Santos CP, Pereira D et al. *Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle*. Porto Alegre, Redes Editora.
- Folmer O, Black M, Hoeh W et al (1994) DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299.
- França RS, Suriani AL, Rocha O (2007) Composição das espécies de moluscos bentônicos nos reservatórios do baixo rio Tietê (São Paulo, Brasil) com uma avaliação do impacto causado pelas espécies exóticas invasoras. *Rev Bras Zool* 24:41-51. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000100005>
- Freitas JFT (1955) Sobre dois trematódeos parasitos de aves: *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 e *Renicola mirandaribeiroi* n. sp. *Arq Mus Nac* 42:585-610.
- Fried B, Graczyk TK, Tamang L (2004) Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitol Res* 93:159-170. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1112-x>
- Frota A, Deprá GC, Petenucci LM, Graça WJ (2016) Inventory of the fish fauna from Ivaí River basin, Paraná State, Brazil. *Biota Neotrop* 16. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2015-0151>
- Glaubrecht M, Brinkmann N, Pöppe J (2009) Diversity and disparity “down under”: Systematics, biogeography and reproduction modes of the “marsupial” freshwater Thiaridae (Caenogastropoda, Cerithioidea) in Australia. *Zoosystematics and Evolution* 85:199-275. <https://doi.org/10.1002/zoos.200900004>
- Goater TM, Goater CP, Esch GW (2014) *Parasitisms: the diversity and ecology of animal*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1:95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL et al (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

- Hudson PJ, Dobson AP, Lafferty KD (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution* 21:381-385. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.04.007>
- Hylton Scott, MI (1954) Dos nuevos melánidos del Alto Paraná (Mol. Prosobr.). *Neotropica* 1:45-48.
- Jerônimo GT, Franceschini L, Zago AC et al (2015) Parasitos de peixes Characiformes e seus híbridos cultivados no Brasil. In: Tavares-Dias M, Mariano WS (Orgs.) *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos, Pedro & João Editores.
- Kanev I, Nollen PM, Vassilev I, Dimitrov V (1993) Redescription of *Philophthalmus lucipetus* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Philophthalmidae) with a discussion of its identity and characteristics. *Ann Nat Mus Wien* 94/95B:11-34. <https://www.jstor.org/stable/41766884>
- Kohn A, Fernandes BMM (1987) Estudo comparativo dos helmintos parasitos de peixes do Rio Mogi Guassu, coletados nas excursões realizadas entre 1927 e 1985. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:483-500.
- Kohn A, Moravec F, Cohen SC et al (2011) Helminths of freshwater fishes in the reservoir of the Hydroelectric Power Station of Itaipu, Paraná, Brazil. *Check List* 7:681-690. <https://doi.org/10.15560/7.5.681>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Literák I, Heneberg P, Sitko J et al (2013) Eye trematode infection in small passerines in Peru caused by *Philophthalmus lucipetus*, an agent with a zoonotic potential spread by an invasive freshwater snail. *Parasitology International* 62:390-396. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.001>
- Locke SA, Al-Nasiri FS, Caffara M et al (2015) Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. *International Journal for Parasitology* 45:841-855. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.001>
- Lockyer AE, Olson PD, Littlewood DTJ (2003) Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications

and a review of the cercomer theory. *Biological Journal of the Linnean Society* 78:155-171. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00141.x>

Lopes AS, Pulido-Murillo EA, López-Hernández D et al (2021) First report of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring a xiphidiocercaria in Brazil: A new parasite introduced in the Americas? *Parasitology International* 82. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102284>

Maciel ECS (2016) Uso de marcadores ribossomais para caracterização de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil. Tese, Universidade de São Paulo.

Miura O, Kuris AM, Torchin ME et al (2005) Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology* 35:793-801. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.02.014>

Moszczyńska A, Locke SA, McLaughlin JD et al (2009) Development of *primers* for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Mol Ecol Resour* 9:75-82. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02634.x>

Muniz-Pereira LC, Amato SB (1993) *Philophthalmus gralli* (Digenea: Philophthalmidae) parasite of *Anas bahamensis* and *Amazonetta brasiliensis*, from lagoons of Maricá county, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:567-569. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000400012>

Neves DP (2004) *Parasitologia Humana*. São Paulo, Atheneu.

Nollen PM, Kanev I (1995) The taxonomy and biology of philophthalmid eyeflukes. *Adv Parasitol* 36:205-269. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60492-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60492-3)

Núñez MO, Quintana MG (2008) The life cycle of *Stephanoprora aylacostoma* n.sp. (Digenea: Echinostomatidae), parasite of the threatened snail *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia, Thiaridae), in Argentina. *Parasitol Res* 102:647-655. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0806-2>

Olson PD, Cribb TH, Tkach VV et al (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33:733-755. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00049-3)

- Onaca FMT, Graça RJ, Fabrin TMC et al (2019) Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. *J Helminthol* 94:1-8. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000725>
- Pantoja CS, Hernández-Mena DI, León GP et al (2018) Phylogenetic Position of *Pseudosellacotyla lutzi* (Freitas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), A Parasite of *Hoplias malabaricus* (Bloch) in South America, through 28S rDNA Sequences, and New Observations of the Ultrastructure of Their Tegument. *J Parasitol* 104:530-538. <https://doi.org/10.1645/17-201>
- Paschoal LRP, Andrade DP, Cavallari, DC (2013) First record of *Aylacostoma francana* (Ihering, 1909) (Gastropoda, Thiaridae) in Minas Gerais state, Brazil. *Biotemas* 26:277-281. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n2p277>
- Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM (2002) Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, EDUEM.
- Pinto HA, Melo AL (2010) *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 52:323-327. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000600007>
- Pinto HA, Melo AL (2013a) A checklist of larval trematodes (Platyhelminthes) in molluscs from Brazil. *Zootaxa* 3666:449-475.
- Pinto HA, Melo AL (2013b) Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical* 42:369-386.
- Pinto HA, Melo AL, Brant SV (2015) Where are the South American freshwater turtle blood flukes (Trematoda: Spirorchiiidae)? The first morphological and molecular analysis of spirorchiid cercariae from freshwater snails in Brazil. *Parasitology International* 64:553-558. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.08.001>
- Pinto RM, Santos LC, Tortelly R et al (2005) Pathology and first report of natural infections of the eye trematode *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 (Digenea, Philophthalmidae) in a non-human mammalian host. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:579-583. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600012>
- Pulido-Murillo EA, Tkach VV, Pinto HA (2022) The life cycle of *Philophthalmus aylacostoma* n. sp. (Trematoda: Philophthalmidae), a new eye fluke species transmitted by

*Aylacostoma* spp. (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. Parasitol Res. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07447-1>

Quintana MG, Núñez MO (2014) The Life Cycle of *Pseudosellacotyla lutzi* (Digenea: Cryptogonimidae), in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae), and *Hoplais malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae), in Argentina. J Parasitol 100:805-811. <https://doi.org/10.1645/13-379.1>

Rosa AJM, Paiva SR (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, Embrapa Cerrados.

Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M (1993) Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. Nucleic Acids Res 21:173-174. <https://doi.org/10.1093/nar/21.1.173>

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-Delbarrio JC et al (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular Biology and Evolution 34:3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Ruppert EE, Fox R, Barnes RD (2005) Zoologia dos Invertebrados. São Paulo, Roca.

Santos ML, Stevaux JC, Gasparetto NVL, Souza Filho EE (2008) Geologia e geomorfologia da planície aluvial do rio Ivaí em seu curso inferior. Rev Bras Geomorf 9:23-34. <http://dx.doi.org/10.20502/rbg.v9i1.98>

Scholz T (1999) Parasites in cultured and feral fish. Vet Parasitol 84:317-335. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00039-4)

Scholz T, Aguirre-Macedo ML, Flores Días de León ATS, Ditrich O (2000) Larval stages of trematodes in Mexican freshwater mollusc: a review of present state and methodology for future research. In: Salgado-Maldonado G, García-Aldrete AN, Vidal-Martínez VM (Eds.) Metazoan parasites in the neotropic: a systematic and ecological perspective. México: Instituto de Biología, UNAM 77-100.

Segatto ALA, Goetze M, Turchetto C (2017) Marcadores moleculares baseados na análise de sequências: utilização em filogenia e filogeografia. In: Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Zanella CM et al (Orgs.) Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

Sema – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (2010) Bacias Hidrográficas do Paraná – Série Histórica. Curitiba.

Simone LRL (2001) Phylogenetic analyses of Cerithioidea (Mollusca, Caenogastropoda) based on comparative morphology. *Arq Zool* 36:147-263. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7793.v36i2p147-263>

Simone LRL (2006) Land and Freshwater Molluscs of Brazil. São Paulo, EGB/FAPESP.

Solferini VN, Selivon D (2012) Polimorfismos de isozimas. In: Matioli SR, Fernandes FM (Eds.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, Holos.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Verocai GG, Lopes LN, Burlini L et al (2009) Occurrence of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in farmed ostriches in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 41:1241-1242. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9306-y>

Vogler RE (2012) *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954: antecedentes de la especie. *Amici Molluscarum* 20:43-46.

Vogler RE, Beltramino AA, Peso JG, Rumi A (2014) Threatened gastropods under the evolutionary genetic species concept: redescription and new species of the genus *Aylacostoma* (Gastropoda: Thiaridae) from High Paraná River (Argentina-Paraguay). *Zoological Journal of the Linnean Society* 172:501-520. <https://doi.org/10.1111/zoj.12179>

Vogler RE, Rumi A, Peso JG, Argüelles CF (2010) Códigos de barra genéticos en *Aylacostoma chloroticum* (Gastropoda: Thiaridae), especie amenazada de Argentina. En: *Libro de Resúmenes del XIV Congreso Latinoamericano de Genética*.

**APÊNDICE A** – Matriz de distância  $p$  entre sequências de gastrópodes coletados no rio Ivaí e sequências disponíveis nos bancos de dados utilizando o marcador molecular *COI*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>Aylacostoma</i> sp. 03																							
2. <i>Aylacostoma</i> sp. 06	0,000																						
3. <i>Aylacostoma</i> sp. 16	0,003	0,003																					
4. <i>Aylacostoma</i> sp. 18	0,002	0,002	0,002																				
5. <i>Aylacostoma</i> sp. 26	0,002	0,002	0,002	0,000																			
6. <i>Aylacostoma</i> sp. 35	0,003	0,003	0,000	0,002	0,002																		
7. <i>Aylacostoma</i> sp. 37	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002																	
8. <i>Aylacostoma</i> sp. 38	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000																
9. <i>Aylacostoma</i> sp. 41	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000															
10. <i>Aylacostoma</i> sp. 44	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000														
11. <i>Aylacostoma</i> sp. 50	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000													
12. <i>Aylacostoma</i> sp. 51	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
13. <i>Aylacostoma</i> sp. 56	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
14. <i>Aylacostoma</i> sp. 58	0,003	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002									
15. <i>Aylacostoma</i> sp. 60	0,003	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000								
16. <i>Aylacostoma</i> sp. 63	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002							
17. <i>Aylacostoma</i> sp. 65	0,003	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002						
18. <i>Aylacostoma</i> sp. 68	0,003	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000					
19. <i>Aylacostoma</i> sp. 70	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002				
20. <i>Aylacostoma</i> sp. 72	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,000			
21. <i>Aylacostoma</i> sp. 74	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000		
22. <i>Aylacostoma brunneum</i> (JQ236700)	0,038	0,038	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,041	0,040	0,041	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	
23. <i>Aylacostoma brunneum</i> (JQ236701)	0,038	0,038	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,041	0,040	0,041	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000
24. <i>Aylacostoma brunneum</i> (JQ236702)	0,038	0,038	0,041	0,040	0,040	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,041	0,040	0,041	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000









*Continuação*

29. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JF346879)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000																						
30. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JF346880)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000																					
31. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JF346881)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000																				
32. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JF346882)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000																			
33. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236681)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
34. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236682)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																
35. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236683)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000															
36. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236684)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000														
37. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236685)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000													
38. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236686)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
39. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236687)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
40. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236688)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000										
41. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236689)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000								
42. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236690)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000							
43. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236691)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
44. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236692)	0,041	0,041	0,041	0,041	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002						
45. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236693)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002				
46. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JQ236694)	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000		





*Continuação*

62. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JX244270)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002			
63. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JX244271)	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002		
64. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (JX244272)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	
65. <i>Aylacostoma chloroticum</i> (KX171227)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	
66. <i>Doryssa</i> sp. (JQ966087)	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,180	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,180	0,182	0,180	0,182	0,182

**APÊNDICE B** – Matriz de distância  $p$ , utilizando o marcador molecular *COI*, entre parasitas de gastrópodes coletados no rio Ivaí e espécies próximas depositadas no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. <i>Plagiorchis</i> sp. (LC599796)																				
2. <i>Philophthalmus</i> sp. (MK629695)	0,231																			
3. Lecithodendriidae sp. (LC599897)	0,233	0,286																		
4. <i>Haplorchis taichui</i> (KF214770)	0,277	0,272	0,283																	
5. Morfotipo 1 C3 (01)	0,239	0,286	0,284	0,230																
6. Morfotipo 2 C3 (03)	0,233	0,280	0,280	0,223	0,008															
7. Morfotipo 3 C6 (05)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294														
8. Morfotipo 3 C37 (06)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000													
9. Morfotipo 3 C44 (07)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000												
10. Morfotipo 3 C51 (08)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000											
11. Morfotipo 3 C68 (09)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000										
12. Morfotipo 3 C70 (10)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
13. Morfotipo 3 C74 (12)	0,234	0,084	0,270	0,253	0,298	0,292	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002								
14. Morfotipo 4 C6 (13)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002							
15. Morfotipo 4 C35 (14)	0,234	0,088	0,273	0,256	0,302	0,295	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002					
16. Morfotipo 4 C37 (15)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002				
17. Morfotipo 4 C44 (16)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000			
18. Morfotipo 4 C51 (17)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000		
19. Morfotipo 4 C68 (18)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	
20. Morfotipo 4 C70 (19)	0,236	0,086	0,272	0,255	0,300	0,294	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
21. Morfotipo 4 C72 (20)	0,236	0,084	0,270	0,256	0,298	0,292	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
22. Morfotipo 4 C74 (21)	0,234	0,084	0,270	0,253	0,298	0,292	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
23. Morfotipo 5 C16 (22)	0,259	0,280	0,130	0,300	0,306	0,303	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289	0,288	0,289	0,288	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289
24. Morfotipo 5 C16 (23)	0,259	0,280	0,130	0,300	0,306	0,303	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289	0,288	0,289	0,288	0,289	0,289	0,289	0,289	0,289





*Continuação*

32. Morfotipo 10 C41 (35)	0,002	0,002	0,289	0,289	0,289	0,289	0,281	0,281	0,000	0,000	0,000								
33. Morfotipo 11 C50 (37)	0,278	0,277	0,316	0,316	0,316	0,314	0,008	0,008	0,278	0,278	0,278	0,278							
34. Morfotipo 12 C50 (41)	0,278	0,277	0,316	0,316	0,316	0,314	0,008	0,008	0,278	0,278	0,278	0,278	0,000						
35. Morfotipo 13 C56 (43)	0,003	0,000	0,288	0,288	0,288	0,288	0,280	0,280	0,002	0,002	0,002	0,002	0,277	0,277					
36. Morfotipo 14 C56 (45)	0,003	0,000	0,288	0,288	0,288	0,288	0,280	0,280	0,002	0,002	0,002	0,002	0,277	0,277	0,000				
37. Morfotipo 15 C60 (47)	0,281	0,280	0,317	0,317	0,317	0,316	0,000	0,000	0,281	0,281	0,281	0,281	0,008	0,008	0,280	0,280			
38. Morfotipo 15 C63 (48)	0,280	0,278	0,316	0,316	0,316	0,314	0,003	0,003	0,280	0,280	0,280	0,280	0,008	0,008	0,278	0,278	0,003		
39. Morfotipo 16 C60 (50)	0,281	0,280	0,317	0,317	0,317	0,316	0,000	0,000	0,281	0,281	0,281	0,281	0,008	0,008	0,280	0,280	0,000	0,003	
40. <i>Australapatemon burti</i> (KY207548)	0,589	0,589	0,594	0,594	0,595	0,594	0,578	0,578	0,591	0,591	0,591	0,591	0,573	0,573	0,589	0,589	0,578	0,577	0,578





*Continuação*

31. Morfotipo 9 C41 (33)	0,000	0,000	0,207	0,202	0,202	0,204	0,151	0,151	0,000	0,000										
32. Morfotipo 10 C41 (35)	0,002	0,002	0,209	0,204	0,204	0,205	0,153	0,153	0,002	0,002	0,002									
33. Morfotipo 11 C50 (37)	0,151	0,151	0,165	0,160	0,160	0,161	0,000	0,000	0,151	0,151	0,151	0,153								
34. Morfotipo 12 C50 (41)	0,151	0,151	0,165	0,160	0,160	0,161	0,000	0,000	0,151	0,151	0,151	0,153	0,000							
35. Morfotipo 13 C56 (43)	0,000	0,000	0,207	0,202	0,202	0,204	0,151	0,151	0,000	0,000	0,000	0,002	0,151	0,151						
36. Morfotipo 14 C56 (45)	0,000	0,000	0,207	0,202	0,202	0,204	0,151	0,151	0,000	0,000	0,000	0,002	0,151	0,151	0,000					
37. Morfotipo 15 C60 (47)	0,151	0,151	0,165	0,160	0,160	0,161	0,000	0,000	0,151	0,151	0,151	0,153	0,000	0,000	0,151	0,151				
38. Morfotipo 15 C63 (48)	0,151	0,151	0,165	0,160	0,160	0,161	0,000	0,000	0,151	0,151	0,151	0,153	0,000	0,000	0,151	0,151	0,000			
39. Morfotipo 16 C60 (50)	0,151	0,151	0,165	0,160	0,160	0,161	0,000	0,000	0,151	0,151	0,151	0,153	0,000	0,000	0,151	0,151	0,000	0,000		
40. <i>Australapatemon burti</i> (JX977785)	0,533	0,533	0,565	0,564	0,564	0,565	0,538	0,538	0,533	0,533	0,533	0,535	0,538	0,538	0,533	0,533	0,538	0,538	0,538	0,538