

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

RODRIGO JUNIO DA GRAÇA

Marcadores moleculares: uma importante ferramenta em estudos
filogenéticos e coevolutivos em Platyhelminthes parasitos de peixes

Maringá
2016

RODRIGO JUNIO DA GRAÇA

Marcadores moleculares: uma importante ferramenta em estudos
filogenéticos e coevolutivos em Platyhelminthes parasitos de peixes

**Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Biologia Comparada do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Maringá,
como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutor em Biologia das
Interações Orgânicas.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto

Maringá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G729m

Graça, Rodrigo Junio da
Marcadores moleculares : uma importante
ferramenta em estudos filogenéticos e coevolutivos
em Platyhelminthes parasitos de peixes / Rodrigo
Junio da Graça. -- Maringá, 2016.
78 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2016.

1. *Anacanthorus*. 2. Cestoda - Parasitos de
peixes. 3. Digenea - Parasitos de peixes. 4.
Filogenia Platyhelminthes. 5. Monogenea. 6.
Coespeciação. 7. Marcadores moleculares. 8. DNA
barcoding. 9. DNA nuclear. 10. Ictioparasitologia.
I. Takemoto, Ricardo Massato, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Comparada. III. Título.

CDD 21.ed. 592.4

AMMA-003076

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO JUNIO DA GRAÇA

Marcadores moleculares: uma importante ferramenta em estudos filogenéticos e coevolutivos em Platyhelminthes parasitos de peixes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Luciano Seraphim Gasques
Universidade Paranaense

Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Sybelle Bellay
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2016.

Local de defesa: Auditório do Nupélia, Bloco H90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Flávia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por me fortalecer diante das dificuldades e pela oportunidade de vivenciar este momento único.

Agradeço a todos sem exceção que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os amigos e familiares pelo companheirismo, incentivo e carinho durante todos os momentos.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de pós-graduação em Biologia Comparada pela vaga e pela estrutura oferecida aos alunos.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura “Nupélia”, Projeto PELD e a todos funcionários pelo auxílio nas coletas e pela estrutura fornecida.

Ao laboratório de Ictioparasitologia e seus fundadores Professor Gilberto C. Pavanelli e Ricardo M. Takemoto por terem me acolhido, pelos ensinamentos e por terem proporcionado toda a estrutura para minhas pesquisas ao longo destes seis anos.

Ao laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPÉLIA pela estrutura e equipamentos oferecidos e pelas amizades que ali fiz. E em especial aos Professores Alberto e Sônia por terem me acolhido, pelos ensinamentos e pela amizade.

Tenho que fazer um agradecimento em especial ao Luciano e ao Thomaz pelo apoio durante todas as etapas deste trabalho. A Geza que aceitou junto comigo este desafio da Biologia Molecular. E ao Professor Juan Balbuena da Universidade de Valência na Espanha, pelos ensinamentos e ajuda nas etapas finais deste trabalho.

Ao CNPq e ao projeto Universal processos nº 480180/2011-3 e 446150/2014-2 pelo financiamento de todas as etapas deste projeto.

Ao laboratório Central de Tecnologias (LACTAD) da Universidade de Campinas (UNICAMP) pelo serviço de sequenciamento prestado.

A CAPES por ter concedido a Bolsa.

EPÍGRAFE

“A máquina, que produz abundância, tem-nos deixado em penúria. Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos. Nossa inteligência, empedernidos e cruéis. Pensamos em demasia e sentimos bem pouco. Mais do que de máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que de inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido. Soldados! Não batalheis pela escravidão! Lutai pela liberdade! Vós, o povo, tendes o poder, o poder de criar máquinas. O poder de criar felicidade! Vós, o povo, tendes o poder de tornar esta vida livre e bela, de fazê-la uma aventura maravilhosa. Portanto, em nome da democracia usemos desse poder, unamo-nos todos nós. Lutemos por um mundo novo, um mundo bom que a todos assegure o ensejo de trabalho, que dê futuro à mocidade e segurança à velhice.”

(CHARLES CHAPLIN)

Título: Marcadores moleculares: uma importante ferramenta em estudos filogenéticos e coevolutivos em Platyhelminthes parasitos de peixes.

RESUMO

O uso de marcadores moleculares é cada vez mais comum em estudos filogenéticos de todos os grupos de seres vivos, incluindo os platelmintos parasitos de peixes. Nesse grupo, as técnicas moleculares são importantes na identificação de espécies, em estudos filogenéticos, coevolutivos e populacionais. Porém na região Sulamericana, poucos são os trabalhos que utilizaram a biologia molecular para filogenias e análises coevolutivas com parasitos de peixes. Este trabalho objetivou verificar por meio de uma revisão bibliográfica quais são os marcadores moleculares mais utilizados nos estudos filogenéticos de platelmintos parasitos de peixes. E também testar se a especificidade dos monogenéticos *Anacanthorus* spp. por seus hospedeiros foi resultante de coespeciação. Para a revisão bibliográfica foi feita uma busca por artigos no Portal Periódicos da Capes. As palavras utilizadas foram: “Cestoda”, “Digenea”, “fish”, “Monogenea” e “phylogeny”. Para o estudo de coespeciação foram coletadas oito espécies de Characiformes no rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. As espécies de parasitos *Anacanthorus* obtidas nas brânquias dos peixes tiveram o gene mitocondrial COI e nuclear ITS1 e ITS2 sequenciados. Já as sequências dos genes RAG1 (nuclear) e COI dos peixes foram obtidas do *Genbank*. As sequências obtidas foram utilizadas para as reconstruções filogenéticas dos parasitos e dos hospedeiros. As filogenias obtidas foram utilizadas para as análises de coespeciação no PACo e ParaFit. A revisão bibliográfica evidenciou que a maioria dos estudos filogenéticos que utilizaram marcadores moleculares foi com Monogenea. Os marcadores mais usados nestes estudos foram o da grande subunidade ribossomal (18S rDNA). O que pode ser explicado possivelmente por serem genes conservados trazendo informações das relações filogenéticas entre estes organismos durante a história evolutiva dos eucariontes. As análises de coespeciação global forneceram evidências significativas de que a relação entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros se deu por coespeciação, rejeitando a hipótese H_0 . No entanto, não houve consenso entre os resultados de PACo e ParaFit para os links individuais entre parasitos e hospedeiros. Apenas as associações entre três espécies de parasitos com seus respectivos hospedeiros foram estatisticamente suportadas como eventos de coespeciação em ambas as análises. Os resultados obtidos também apontaram que são duas as vias de especiação em *Anacanthorus*, a duplicação e a coespeciação.

Palavras-chave: *Anacanthorus*. Coespeciação. Digenea. Filogenia. Monogenea.

Title: Molecular markers: an important tool in phylogenetic and co-evolutionary studies of Platyhelminthes fish parasites.

ABSTRACT

Molecular markers have been increasingly used in phylogenetic studies of all groups of organisms, including fish parasitic flatworms. In this group, molecular techniques are important in identifying species, phylogenetic and coevolutionary population studies. In co-evolutionary studies with fish parasites, monogeneans are the most widely used group. But for the South American region, there are few studies that use molecular biology to phylogenies, co-evolutionary analysis with fish parasites. Thus, the aim of this study was to verify through a literature review which are the main molecular markers used in phylogenetic studies of fish parasites flatworms. And also, test the if specificity of the species of *Anacanthorus* by their hosts was given by a co-speciation. For the literature review was made a search for papers in *Portal Periódicos da Capes*. The words used in the search were: “Cestoda”, “Digenea”, “fish”, “Monogenea” and “phylogeny”. For the study co-speciation were collected eight species of Characiformes in the Paraná River and its tributaries between the years 2012 to 2015. Were sequenced the COI and ITS1/ITS2 genes of *Anacanthorus* parasites obtained from fish gills. The sequences of genes RAG1 (nuclear) and COI of fish were obtained from Genbank. The sequences obtained were edited and aligned. Later, phylogenetic reconstructions of parasites and hosts were made. Then phylogenetic trees obtained were used for the cspeciation analysis in Paco and ParaFit. Most phylogenetic studies using molecular markers was with Monogenea. The most commonly used molecular markers were lsrDNA. The speciation analysis provided significant evidence that the relationship between the species studied *Anacanthorus* and their hosts, took co-speciation by rejecting the hypothesis H_0 . Overall, there was no consensus between the results of Paco and ParaFit for individual co-speciation events hosts/parasites, only the links between three species with your hosts were statistically supported in both analyzes. The results also show that *Anacanthorus* spp. speciation occurred in two ways, duplication and co-speciation.

Palavras-chave: *Anacanthorus*. Coespeciation. Digenea. Monogenea. Phylogeny.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1.....	14
MOLECULAR MARKERS APPLIED TO PHYLOGENY OF PLATYHELMINTHES OF FISH PARASITES: REVIEW	14
2.1 INTRODUCTION	17
2.2 MATERIALS AND METHODS	18
2.3 RESULTS	19
2.4 DISCUSSION	22
2.5 CONCLUSION.....	25
REFERENCES	26
ANEXO I	31
CAPÍTULO 2.....	34
Coespeciação, duplicação e transferência horizontal entre <i>Anacanthorus</i> spp. (Monogenea: Dactylogyridae) e seus hospedeiros Characiformes no rio Paraná e afluentes.	34
3.1 INTRODUÇÃO	37
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2.1 Caracterização da área de estudo	39
3.2.2 Coleta dos hospedeiros	40
3.2.3 Coleta dos parasitos	41
3.2.4 Extração de DNA.....	42
3.2.5 Reação de Amplificação do DNA (Polimerase Chain Reaction - PCR)	43
3.2.6 Sequenciamento e análise das sequências	44
3.2.7 Análise filogenética	45
3.2.8 Análises de Coespeciação	47
3.3 RESULTADOS	48
3.3.1 Análise genética	48
3.3.2 Análise filogenética	50
3.3.3 Análises de Coespeciação	52
3.4 DISCUSSÃO	56
3.4.1 Análise genética e filogenética	56
3.4.2 Análises de Coespeciação	58
3.5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
4. CONCLUSÕES GERAIS	73
Anexo II	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização das informações genéticas em estudos filogenéticos progrediu muito nas últimas décadas. Principalmente, devido ao surgimento de novas tecnologias, como a criação e desenvolvimento de bancos de dados genéticos, programas de informática e métodos estatísticos destinados às inferências filogenéticas (BUENO- SILVA, 2012).

As informações contidas no DNA têm sido fundamentais nos estudos filogenéticos entre espécies de parasitos de peixes, pois se trata de organismos morfologicamente simples e pequenos, o que dificulta a identificação morfológica das espécies e na inferência de filogenias (GASQUES; SOUZA; GRAÇA, 2013). As informações obtidas em estudos filogenéticos ainda podem ser utilizadas também em estudos de Coevolução/Coespeciação (DESDEVISES; MORAND; LEGENDRE, 2002; VIENNE et al., 2013), populacionais, epidemiológicos e genealógicos (YANG e RANALLA, 2012).

Estudos coevolutivos têm despertado o interesse de pesquisadores desde o século 19 (DESDEVISES, 2007). Nestes trabalhos as associações entre parasitos e hospedeiros é uma das relações simbióticas mais investigadas (BROOKS, 1979; HAFNER e NADLER, 1988; DESDEVISES; MORAND; LEGENDRE, 2002; SANTIAGO-ALÁRCON et al., 2014; LEI e OLIVAL, 2015). Sendo os monogenéticos um dos grupos de parasitos mais utilizados nestes estudos, principalmente a partir do ano de 2000 (DESDEVISES; MORAND e LEGENDRE, 2002; HUYSE e VOLCKAERT, 2005; ŠIMKOVÁ et al., 2006; VANHOVE et al., 2015; HAHN et al., 2015).

De acordo com Desdevises (2007) estes parasitos são modelos ideais para este tipo de estudo, devido à especificidade destes por seus hospedeiros (RODHE, 1979; CONE e BURT, 1982). Determinadas espécies de monogenéticos são tão específicas, que podem ser utilizadas como uma ferramenta a mais na identificação de seus hospedeiros (LAMBERT e

GHARBI, 1995). Sendo esta especificidade ao hospedeiro um indício de coevolução via coespeciação (KEARN, 1994; POULIN, 1992).

Entre os parasitos, são três as possíveis vias de especiação (Figura 1). O parasito sofre especiação junto com seu hospedeiro (A) (coespeciação). O hospedeiro sofre especiação e o parasito não (B) (extinção ou perda de linhagem) e por último os parasitos sofrem especiação dentro da espécie de hospedeiro (C) (duplicação) (BROOKS, 1979; DESDEVISES, 2007). Outra possível via de especiação é pela mudança de hospedeiros (D) (transferência horizontal) (BROOKS e MACLENNAM, 1993; BOEGER e KRITSKY, 1997).

Na coespeciação, espera-se que a topologia das árvores filogenéticas dos parasitos e seus hospedeiros sejam congruentes, sendo uma o espelho da outra (BROOKS, 1985; PATERSON e GRAY, 1997; PAGE e CHARLESTON, 1998). Já na duplicação o parasito sofre especiação sem que o hospedeiro passe pelo mesmo processo evolutivo (PAGE e CHARLESTON, 1998; RONQUIST, 2002). A transferência horizontal pode ou não levar a especiação dos parasitos, o que vai depender se o novo hospedeiro tem características biológicas e fisiológicas distintas dos hospedeiros de origem (AGOSTA e KLEMENS, 2008).

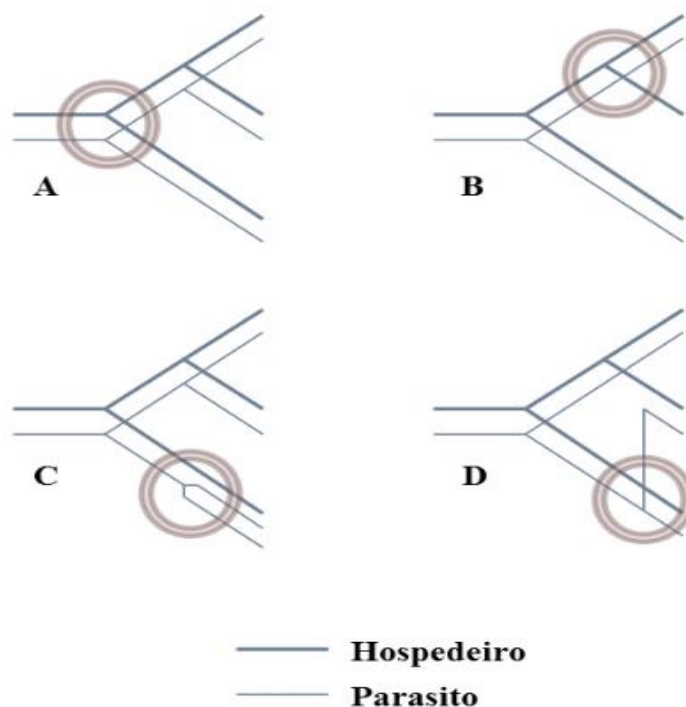


Figura 1: Eventos coevolutivos esperados entre parasitos e hospedeiros: A) coespeciação, B) extinção ou perda de linhagem, C) duplicação e D) transferência horizontal. Adaptado de (MERILO, 2014).

Mesmo sendo considerado um bom modelo para estudos cofilogenéticos (DESDEVISES, 2007) os monogenéticos ainda são poucos utilizados neste tipo de estudo, em especial na região Sulamericana, onde são conhecidas cerca de 300 espécies destes parasitos (COHEN; JUSTO; KOHN, 2013) e mais de 3000 espécies de peixes somente para o ambiente dulcícola (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). Sendo este um campo ainda pouco explorado e até a presente data o único estudo realizado nesta região foi o de Van Every e Kritsky (1992) com espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros serrasalmídeos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar quais são os principais marcadores moleculares utilizados nos estudos filogenéticos de Monogenea, Digenea e Cestoda parasitos de peixes. E também testar se a especificidade das espécies de monogenéticos *Anacanthorus* por seus hospedeiros no rio Paraná e afluentes se deu por um processo de coespeciação, visto que estes parasitos só foram registrados em algumas Famílias de Characiformes.

REFERÊNCIAS

- BOEGER, W. A. e KRITSKY, D. C. Coevolution of the Monogenea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 1495–1511, 1997.
- BROOKS, D.R. Testing the context and extent of host-parasite coevolution. **Systematic Biology**, v. 28, n. 3, p. 299-307, 1979.
- BROOKS, D. R. e MCLENNAN, D. A. **Parascript: parasites and the language of evolution**. Smithsonian Inst. Press, Washington, DC, 1993, 429 p.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 195 p., 2007.
- BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.
- COHEN, S. C.; JUSTO, M. C. N.; KOHN, A. **South American Monogenea parasites of fishes, amphibians and reptiles**. Rio de Janeiro: Ed. Oficina de Livros, 663p., 2013.
- CONE, D. K. e BURT, M. D. B. The host specificity of *Urocleidus adspetus* (Mueller, 1938) (Monogenea: Ancyrocephalinae). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 702-706, 1982.
- DESDEVISES Y.; MORAND S.; LEGENDRE, P. Evolution and determinants of host specificity in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 77, p. 431–443, 2002.
- DESDEVISES, Y. Cophylogeny: insights from fish-parasite systems. **Parassitologia**, v. 49, p. 125-128, 2007.
- GASQUES, L. S.; SOUZA, G. T. R.; GRAÇA, R. J. Das moléculas aos parasitos: a aplicação da biologia molecular nos estudos de Ictioparasitologia. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Org.) **Parassitologia, Peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, 2013. p. 149-167.
- HAFNER, M. S. e NADLER, A. S. Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. **Nature**, v. 332, p. 258-259, 1988.
- HUYSE, T. e VOLCKAERT F. Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from goby to goby. **Systematic Biology**, v. 54, p. 710–718, 2005.
- HAHN, C.; WEISS, S. J.; STOJANOVSKI, S.; BACHMANN, L. Co-Speciation of the ectoparasite *Gyrodactylus teuchis* (Monogenea, Platyhelminthes) and Its salmonid hosts. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0127340, 2015.

- KEARN, G. C. Evolutionary expansion of the Monogenea. **International Journal Parasitology**, v. 24, p. 1227–1271, 1994.
- LAMBERT, A.; GHARBI, S. E. L. Monogenean host specificity as a biological and taxonomic indicator for fish. **Biological Conservation**, v. 72, p. 227–235, 1995.
- LEI, B. R. e OLIVAL, K. J. Contrasting Patterns in Mammal–Bacteria Coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in Bats and Rodents. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n. 3: p. e2738, 2015.
- MERILO, M. T. **DEEPR: A Dirichlet-multinomial randomization test for estimating relative coevolutionary event differences between groups of symbiotic species**. Guelph: The University of Guelph, 2014. 78 p. Tese (Doutorado) – Bioinformatics, Department of Integrative Biology, The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2014.
- POULIN, R. Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. **International Journal for Parasitology**, v. 22, p. 753 – 758, 1992.
- RODHE, K. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. **The American Naturalist**, v. 114, p. 648–671, 1979.
- SANTIAGO-ALARCON, D.; RODRÍGUEZ-FERRARO, A.; PARKER P. G.; RICKLEFS, R. Different meal, same flavor: cospeciation and host switching of haemosporidian parasites in some non-passerine birds. **Parasites & Vectors**, v.7, n. 286, p. 1–9, 2014.
- ŠIMKOVÁ, A.; VERNEAU, O.; GELNAR, M.; MORAND, S. Specificity and specialization of congeneric monogeneans parasitizing cyprinid fish. **Evolution**, v. 60, n. 5, p. 1023–1037, 2006.
- VAN EVERY, L. R. e KRITSKY, D. C. Neotropical Monogenoidea. *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) of piranha (Characoidea, Serrasalminidae) from the Central Amazon, their phylogeny, and aspects of host-parasite coevolution. **Journal Helminthology Society of Washington**, v. 59, n. 1, p. 52–75, 1992.
- VANHOVE, M. P. M.; PARISELLE, A.; VAN STEENBERGE, M.; RAEYMAEKERS, J. A. M.; HABLÜTZEL, P. I.; GILLARDIN, C.; HELLEMANS, B.; BREMAN, F. C.; KOBLMÜLLER, S.; STURMBAUER, C.; SNOEKS, J.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSE, T. Hidden biodiversity in an ancient lake: phylogenetic congruence between Lake Tanganyika trophaine cichlids and their monogenean flatworm parasites. **Scientific reports**, v. 5, p. 13669, 2015.
- VIENNE, D. M.; REFREGER, G.; LOPEZ-VILLAVICENCIO, M.; TELLIER, A.; HOOD, M. E. e GIRAUD, T. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence

from natural associations and relation to coevolution. **New Phytologist**, v.198, p. 347–385, 2013.

YANG, Z. e RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v.13, p. 303-314, 2012.

CAPÍTULO 1

MOLECULAR MARKERS APPLIED TO PHYLOGENY OF PLATYHELMINTHES OF FISH PARASITES: REVIEW

Rodrigo Junio da Graça; Thomaz Mancini
Carrenho Fabrin e Ricardo Massato Takemoto

O capítulo 1 foi elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica na revista *Acta Scientiarum Biological Science*. O artigo já foi submetido e esta em avaliação por revisores desta revista. Normas da revista anexo I.

Título: Marcadores moleculares aplicados a filogenia de Platyhelminthes parasitos de peixes: revisão

Título resumido: Filogenia molecular de platelmintos parasitos

RESUMO

Estudos filogenéticos com marcadores moleculares são cada vez mais comuns em todos os grupos de seres vivos. Para os platelmintos parasitos de peixes, as técnicas moleculares possibilitam desvendar ciclos de vida complexos, sendo importantes também na identificação de espécies e na elucidação de hipóteses filogenéticas. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo verificar quais são os principais marcadores moleculares utilizados nos estudos filogenéticos de platelmintos parasitos de peixes, visando fornecer subsídios para futuros estudos filogenéticos na Ictioparasitologia. Para a análise bibliométrica foi utilizado o banco de dados dos Periódicos da Capes, tendo como palavras-chave “fish” e “phylogeny” associadas a “Cestoda”, “Digenea” e “Monogenea”. As informações obtidas nos trabalhos foram tabuladas e quantificadas. Dos 129 trabalhos obtidos 46% foram com monogenéticos, 33% com digenéticos e 19% com cestóides. Os marcadores moleculares ribossomais foram os mais utilizados nos estudos filogenéticos com estes parasitos de peixes. Com o avanço das técnicas de biologia molecular e da bioinformática, com análises filogenéticas mais robustas, é crescente a utilização destas técnicas na Ictioparasitologia. A filogenética molecular, juntamente com a análise de estruturas morfológicas tem contribuído de maneira mais eficiente para o entendimento das relações de parentesco, entre estes grupos de parasitos de peixes.

Palavras-chave: Digenea, Cestoda, Monogenea, DNA ribossomal, COI

Title: Molecular markers applied to phylogeny of Platyhelminthes of fish parasites: review

Short title: Molecular phylogeny of parasites Platyhelminthes

ABSTRACT

Phylogenetic studies with molecular markers are now much more common for every group of living organisms. Molecular techniques used in Platyhelminthes parasites of fishes enable the discover complex life cycles, being also important to species identification and to elucidation of phylogenetic hypothesis. Therefore, we verified which are the main molecular markers utilized to phylogenetic studies with Platyhelminthes parasites of fishes, aiming to provide subsidies to future phylogenetic studies in Ichthyoparasitology. We used the “Periódicos da Capes” data base to the bibliometric analysis, with the keywords “fish” and “phylogeny”, associated with “Cestoda”, “Digenea” or “Monogenea”. The Information obtained in the papers were quantified and tabulated. Most of studies were with Monogenea, followed by Digenea and Cestoda, consecutively. The ribosomal molecular markers were the most used in the phylogenetic studies for these parasites of fishes. Due to the advance of molecular biology techniques and of bioinformatics, with more robust phylogenetic analysis, it is crescent the use of these techniques in another areas as Ichtyioparasitology. The use of molecular phylogenetic with morphological structures analysis has contributed efficiently to the understanding of phylogenetic relationships among these groups.

Keywords: Digenea, Cestoda, Monogenea, Ribosomal DNA, COI

2.1 INTRODUCTION

In the 1960s, Willi Hennig introduced the phylogenetic system or the reconstruction of a common evolution offspring of a group of living organisms (Bueno-Silva, 2012). The variations of the characteristics that have a genetic origin are investigated within a certain groups of species. Hypotheses of homology are thus formulated, compared and contrasted with congruency tests to verify Kinship (Nelson & Platnick, 1981).

Homologous structures comparing different species should be known to formulate the phylogenetic hypotheses. According to Amorim (2002), structure is any section of a living organism or any genotypic expression. Phylogenetic studies also comprise genetic sequences, chromosomes and proteins. Molecular phylogenetics is the use of information from DNA or protein sequences for the study of kin relationship between organisms (Patwardhan, Say & Roy, 2014). Phylogenetic reconstructions based on molecular data may be inferred from the comparative analysis of DNA or from protein homologous sequences (Lemey, Salemi & Vandamme, 2009).

Great progress occurred during the last decades on the employment of genetic information in phylogenetic studies due to new technologies, development of genetic data bases, computer programs for phylogenetic inferences, computer infrastructure and statistical methods for phylogenetic inferences (Bueno-Silva, 2012).

Prior to the introduction of DNA sequencing, phylogenetic trees were based on morphological and physiological characteristics. Current advances in bio-informatics and molecular biology have triggered studies on derivation relations of species in evolution, population, epidemiological and genealogical investigations (Yang & Rannala, 2012).

Although current phylogenetic studies that use molecular markers are highly common in all groups of living organisms, the phylogenetic relationship of the species has been mainly based on the species's morphological features (Bueno-Silva, 2012). The sequencing of specific regions is one of the most efficacious manners to obtain data that may elucidate systematic and phylogenetic hypotheses (Gasques, Souza & Graça, 2013). As a rule, the most employed regions for such ends have been the ribosome DNA region for the organism's genome, especially ITS regions, and the Cytochrome C oxidase I (COI) region, also known as Barcode DNA, in the mitochondrial DNA (Bueno-Silva, 2012; Gasques et al., 2013).

Although molecular information-based phylogenetic studies have been undertaken in several groups of living organisms, the investigations are still more relevant in the case of morphologically simple and small organisms, such as many parasite groups. Molecular

techniques have been employed for fish parasites in the early 1990s and are efficient to discover complex life cycles of several parasites. They have an important role in taxonomic relationships with species characterized by difficult morphological separation (Clark, 2006).

According to Gasques et al. (2013), information on DNA sequences is basic for the study of phylogenetic relationships between species of fish parasites, especially due to the difficulties in identifying and inferring phylogenies merely by data on morphological structures.

Analyses of DNA sequences in the codifying regions of protein or not, have been largely used in phylogenetic studies on helminthic parasites of fish (Clark, 2006), with special reference to investigations on the three main Platyhelminthes groups: Cestoda, Digenea and Monogenea. Baverstock, Fielke, Johnson, Bray and Beveridge (1991) performed pioneer studies on platyhelminthes with molecular phylogeny, in which the efficiency of the 18s marker was verified to test phylogenetic hypotheses of big groups. Phylogenetic studies employing molecular biology techniques for fish parasites have been recently very common. Studies on Monogenea, by King, Marcogliese, Forest, McLaughlin & Bentzen (2013); Yoon et al. (2013), Sarabeev & Desdevises (2014), Sepúlveda & González (2014); on Digenea by Locke, Daniel McLaughlin & Marcogliese (2010); Cai et al. (2012); Miller & Cribb (2013) and Georgieva et al. (2013); on Cestoda by Bazsalovicsová, Králová-Hromadová, Štefka & Scholz (2012); Waeschenbach, Webster & Littlewood (2012); Caira, Marques, Jensen & Ivanov (2013); Scholz et al. (2014) should be underscored.

Current study investigates the main molecular markers in phylogenetic studies on Monogenea, Digenea and Cestoda fish parasites to foreground future phylogenetic studies with molecular markers in Ichthyoparasitology and related areas.

2.2 MATERIALS AND METHODS

A bibliometric survey (Machado, 2007; Macias-Chapula, 1998) of the main markers used in phylogenetic analyses of monogeneans, digeneans and cestodes parasites was undertaken to establish research methodologies with fish parasites. Articles related to these publications and available at the data base of the CAPES Journals platform were searched through the keywords “fish” and “phylogeny” associated to one of the three classes of the fish parasites under analysis: “Monogenea”, “Digenea” and “Cestoda”. CAPES Journals data base was selected mainly because of its more than 21,500 international and Brazilian journals

available, coupled to 126 data bases currently available. In fact, it is actually the main source of research in Brazilian post-graduate courses (Capes, 2015).

The specific articles were read and those that were merely bibliographical reviews or which did not have any direct relationship with original researches on phylogenetic relationships among parasites or which did not employ molecular markers as parameter for phylogeny analysis were discarded. Titles, name of authors, year of publication, groups of parasites studied, aims and molecular markers for the preparation of phylogeny were retrieved from the articles in the sample. Survey occurred in 2014 and the characterized articles available till December 20, 2014 were retrieved.

2.3 RESULTS

One hundred and twenty-nine articles were selected, monogeneans was the most studied parasites group, followed by digeneans and cestodes. Only one study was found with three groups of parasites (Figure 1). In phylogenetic studies with these parasites, the most used molecular markers were the nuclear; mitochondrial markers have been little used in phylogenetic studies with fish flatworms parasites (Figure 2). Twenty-three different molecular markers were used, or rather, 14 (16%) were nuclear markers and 9 (39%) were mitochondrial markers.

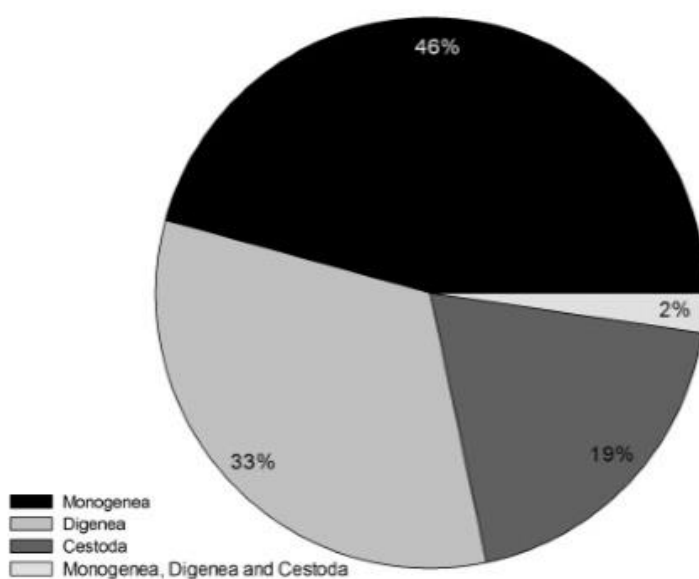


Figure 1. Proportion of papers between the years of 1991-2014 using molecular markers to phylogenetic studies of Monogenea, Digenea and Cestoda, fish parasites.

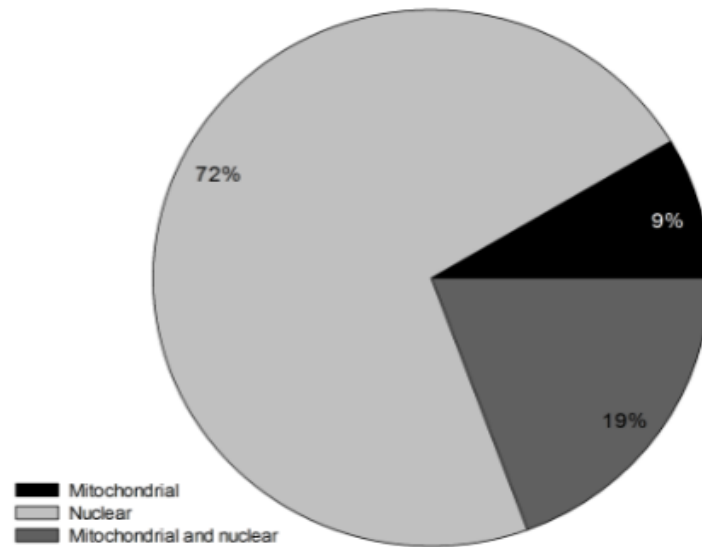


Figure 2. Proportion of papers according to genome region of the molecular markers to phylogenetic studies of Monogenea, Digenea and Cestoda, fish parasites between the years of 1991-2014.

The first article to use molecular markers in phylogenetic studies on fish platyhelminthes parasites dated from 1991. A constant increase in published research works involving fish parasites and molecular markers occurred henceforth (Figure 3).

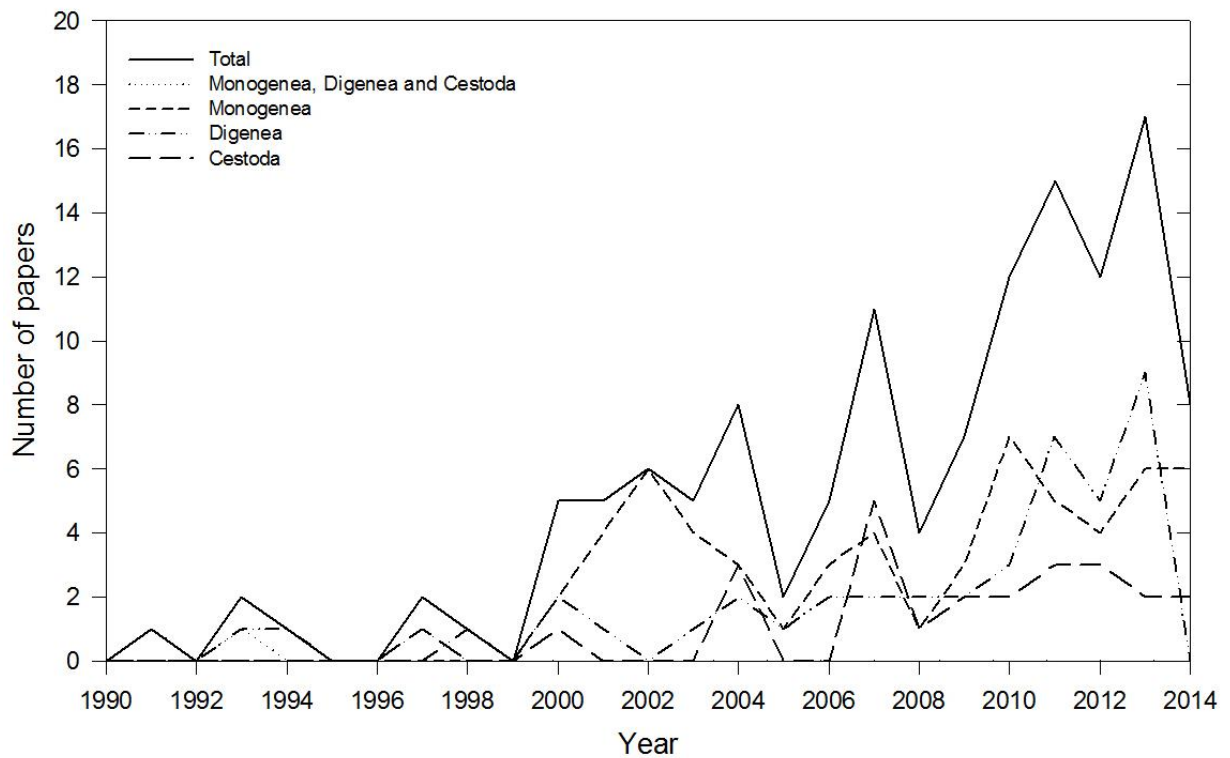


Figure 3. Amount of papers by year using molecular markers to phylogenetic studies of the Monogenea, Digenea and Cestoda, fish parasites, between the years of 1991-2014.

The most employed molecular markers for phylogenetic purposes were related to ribosomal genes (Figure 4), with approximately 82% of molecular markers used in all papers surveyed. They were grouped under two headings: Large-Subunit Ribosomal DNA (lsrDNA), which comprised molecular markers 28S, 5.8S and complete fragment, and Small Subunit Ribosomal DNA (ssrDNA), which comprised molecular markers 16S, 18S and complete fragment. Non-transcribed internal spacers were grouped separately (ITS 1 and ITS 2) when used alone.

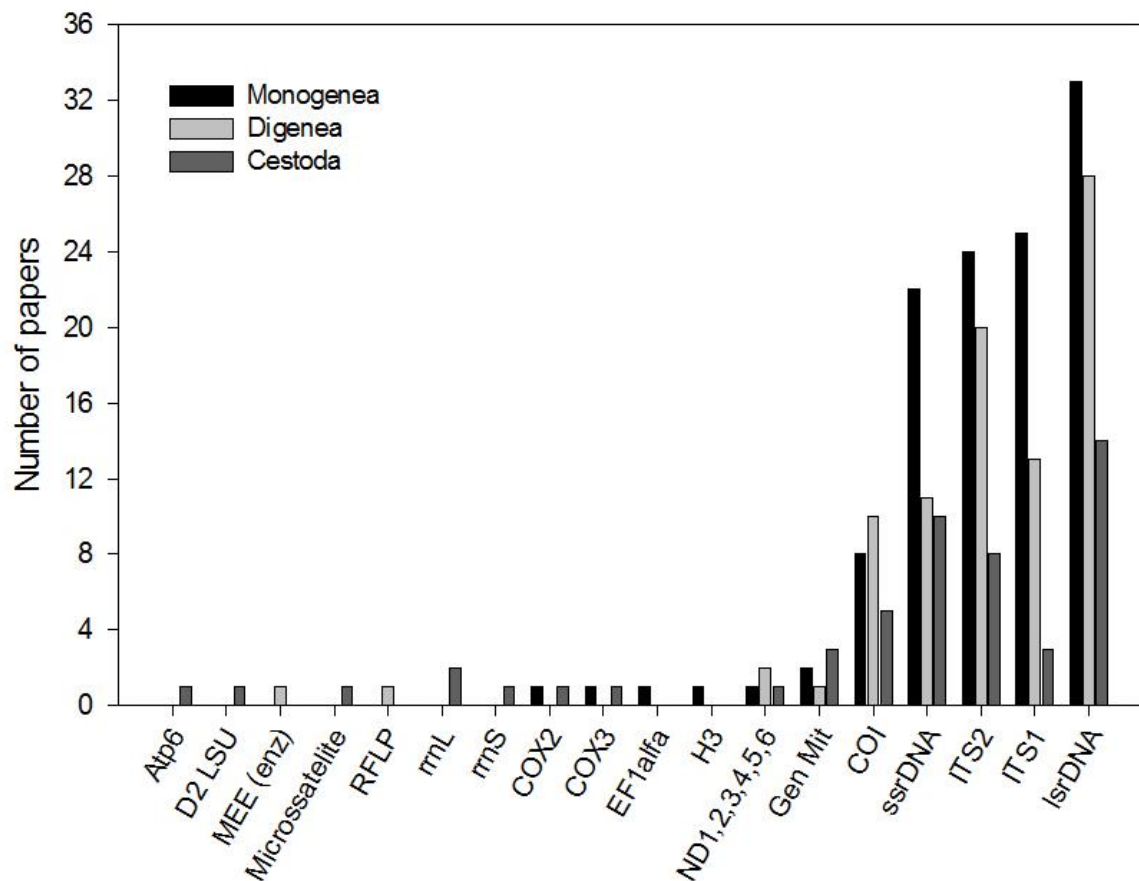


Figure 4. Amount of papers between the years of 1991-2014 according to molecular markers used to phylogenetic studies of the Monogenea, Digenea and Cestoda, fish parasites.

The most employed mitochondrial molecular markers was gene Cytochrome C Oxidase I (COI) which occurred in approximately 61% of the articles that used some type of mitochondrial molecular marker. It was followed by mitochondrial genome with 16%.

2.4 DISCUSSION

The number of research works employing molecular markers in phylogenetic studies with fish parasite platyhelminthes from 1991 henceforth was highly significant. Monogeneans parasites were the group with most phylogenetic studies in molecular biology, perhaps due to the number of species in the group. In fact, it is one of the groups of fish parasites with the highest diversity worldwide (Bakke, Harris & Cable, 2002; Pavanelli, Eiras & Takemoto, 2008; Takemoto, Luque, Bellay, Longhini & Graça, 2013; Whittington, 1998). Further, pathology caused by monogeneans parasites in fish is very relevant when one deals with pisciculture and its enormous economic liabilities (Eiras, 1994; Pavanelli et al., 2008).

Consequently, great interest exists in the study of these parasites, with an increase in the number of studies employing molecular phylogeny.

One of the methods to test hypotheses on Co-evolution/Co-speciation among parasites and hosts is by analyzing congruencies in their tree topologies (De Vienne et al., 2013; Desdevises, Morand & Legendre, 2002). The high specificity of monogeneans parasites to hosts (Cone & Burt, 1982; Rodhe, 1979) may be an indication of co-evolution through co-speciation (Kearn, 1994; Noble, Noble, Schad & Macinnes, 1989; Poulin, 1992). In fact, monogeneans parasites may be good models for co-evolution studies. The above may justify the great representation of molecular phylogenetic studies with monogeneans parasites compared to digeneans and cestodes parasites.

It should be underscored that, when dealing with molecular markers-based phylogenetic studies, the preferred genes are nuclear. The various evolution rates among the different ribosomal DNA regions, the presence of many copies in most rDNA sequences per genome and the concerted evolution among the repeated copies are among the characteristics of these genes justifying their choice in studies on different groups of living organisms (Álvarez & Wendel, 2003; Hillis & Dixon, 1991).

Results show that the *lsrDNA* region within nuclear genes was the most employed in phylogenetic studies, followed by *ssrDNA*, ITS 1 and ITS 2 regions. The *lsrDNA* and *ssrDNA* genes were preserved throughout the evolution process. Since they have information on the phylogenetic relations during the evolution history of eukaryotes, these characteristics make them relevant in phylogenetic studies on great groups (Perkins, Martinsen & Falk, 2011).

Gene 18S is part of the *ssrDNA* region and since 1991 has been employed by Baverstock and colleagues to test phylogenetic hypotheses within the platyhelminthes group. It is also employed to identify species and evidence cryptic species (Curran, Tkach & Overstreet, 2013; Marigo, Thompson, Santos & Iñiguez, 2011; Snyder, 2004). On the other hand, gene 28S involves the *lsrDNA* region and has been used to determine phylogenetic positions (Alama-Bermejo, Montero, Raga & Holzer, 2011) and to identify species. This is due to difficulties to identify some parasite species during certain stages in their life cycle (Born-Torrijos, Kostadinova, Raga & Holzer, 2012). Another important characteristic of these genes consists in containing a nucleotide replacement pattern that provides statistically reliable information for phylogenetic analyses and thus sufficient information for the study of phylogenetic relations during the early evolution of eukaryotes (Hasegawa, Kishino, & Yano, 1985; D. M. Hillis & Dixon, 1996).

Ribosomal gene 5.8S is generally employed with markers ITS1 and ITS2, which together form the complete region of the transcribed internal spacer (Jousson, Bartoli, Zaninetti & Pawlowski, 1998). The fragments are separated externally by the fragment of gene 5.8s; gene 18S lies before ITS1 and gene 28S after ITS2. The regions ITS1 and ITS2 are also molecular markers highly employed in phylogenetic studies and share some characteristics with genes 18S and 28S. However, they have more accelerated evolution rates, with high variations in the spacers among specimens, following the group of organisms under analysis (Perkins et al., 2011). Accessibility is an asset in the choice of ITS markers since the fragments are close to conserved genes and this fact makes easy the primers design for the amplification of the region (Luton, Walker & Blair, 1992).

When dealing with phylogenetic studies between parasite genera and species, the more adequate nuclear markers would be those with variability, although they conserve the phylogenetic signal, such as markers ITS1 and ITS2. However, great groups may not be adequate due to their high variability which may limit the alignment process of the sequences obtained and directly affect the analysis. In studies on great groups such as Order and Family, the most indicated genes would be those conserved, such as 18S and 28S, since they maintain a conservation rate throughout the evolution of the eukaryotes, as previously demonstrated (Hillis & Dixon, 1991).

A similar situation to that of ITSa regions may be perceived with mitochondrial markers. Highly dissimilar evolution rates, sometimes very fast and sometimes very slow, may occur in these regions (Vawter & Brown, 1986). Several problems may arise, however, to elucidate deeper relationships between the groups or even between the species which have been formed in very fast speciation processes (Springer et al., 2001).

Some mitochondrial markers, such as COI and D-Loop, are indicated for phylogeographic, separation or not of con-genus species, population studies and adaptive diversification studies (Bueno-Silva, 2012). Mitochondrial genes are haploids since they are inherited from the mother. They do not have genic recombination and may contain important information on phylogenetic studies between strictly related species (Perkins et al., 2011).

Results reveal that Cytochrome C Oxidase I was the most employed mitochondrial gene in the reconstruction of the phylogeny of the three fish parasite groups. The gene is characterized by high variability and genetic divergence between the species, besides occurring in the most different taxa (Bueno-Silva, 2012; Kress & Erickson, 2008).

Although it is the most employed mitochondrial marker, gene COI in parasites may have great variability and may not favor a reliable phylogenetic reconstruction (Huyse,

Audenaert & Volckaert, 2003). Due to the previously mentioned characteristics, the marker is not the most adequate to investigate kin relations at the Order and Family levels. However, mitochondrial markers, especially COI, have been extensively used in phylogenetic studies of small groups in fish parasites, perhaps due to the fact that studies of molecular, population and biogeographic systems employ phylogeny but fail to solve kin relationships at higher taxonomic levels. It may be also due to the ease in the amplification of the region by polymerase chain reaction and to incentives by Hebert, Cywinska, Ball & DeWaard (2003) in the use of the region as a universal code bar in species identification. Consequently, the gene is one of the most employed to characterize animal species and in phylogenetic studies among close species.

Taking into consideration possible contributions in the use of molecular techniques, the number of studies in this area and thus phylogenetic studies have increased. Results demonstrate that the number of phylogenetic studies using phylogenetic markers has increased since 2000. Increase has been triggered by the universalization and advance in the molecular biological techniques and their availability (Gasques et al., 2013; Patwardhan et al., 2014), coupled to the difficulty in the morphological identification of fish parasites which are frequently microscopically sized and characterized by a simple morphology, hindering the obtaining of synapomorphy for phylogenetic reconstructions (Luton et al., 1992; Perkins et al., 2011).

2.5 CONCLUSION

Progress in molecular biology and bio-computer techniques, coupled to more robust phylogenetic programs and analyses, has triggered an increase in the use and acknowledgement of such techniques in phylogenetic and taxonomic investigations of fish parasites. Molecular phylogenetics has provided new information on kinship between parasite groups, in species identification and in population and biogeographic studies. Nevertheless, molecular phylogeny has not solved all taxonomic and phylogenetic issues in Ichthyoparasitology. The use of such tools is recommended when possible and when required in the hypothesis test, coupled to morphological information. The employment of more than one gene is also recommended for more reliability in phylogenetic reconstructions, developing evolution rates of the organism and not merely that of an isolated gene.

REFERENCES

- Alama-Bermejo, G., Montero, F. E., Raga, J. A., & Holzer, A. S. (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 ph. *Parasitology International*, 60(1), 34-44.
- Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417-434.
- Amorim, D. S. (2002). *Fundamentos de Sistemática Filogenética*. Ribeirão Preto, BR: Hols.
- Bakke, T. A., Harris, P. D., & Cable, J. (2002). Host specificity dynamics: Observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 281-308.
- Baverstock, P. R., Fielke, R., Johnson, A. M., Bray, R. A., & Beveridge, I. (1991). Conflicting phylogenetic hypotheses for the parasitic platyhelminths tested by partial sequencing of 18S ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, 21(3), 329-339.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Štefka, J., & Scholz, T. (2012). Molecular characterization of *Atractolytocestus sagittatus* (Cestoda: Caryophyllidea), monozoic parasite of common carp, and its differentiation from the invasive species *Atractolytocestus huronensis*. *Parasitology Research*, 110, 1621–1629.
- Born-Torrijos, A., Kostadinova, A., Raga, J. A., & Holzer, A. S. (2012). Molecular and morphological identification of larval opecoelids (Digenea: Opecoelidae) parasitising prosobranch snails in a Western Mediterranean lagoon. *Parasitology International*, 61(3), 450-460.
- Bueno-Silva, M. (2012). Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estudos de Biologia*, 34(421), 157-163.
- Cai, X. Q., Liu, G. H., Song, H. Q., Wu, C. Y., Zou, F. C., Yan, H. K., ... Zhu, X. Q. (2012). Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitology Research*, 110, 235-243.
- Caira, J. N., Marques, F., Jensen, K., & Ivanov, V. A. (2013). Phylogenetic analysis and reconfiguration of genera in the cestode order Diphyllidea. *International Journal for Parasitology*, 43, 621-639.

Portal de periódicos CAPES/MEC (2015). Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acessado em: 11/08/2015.

Clark, T. G. (2006). Molecular Approaches and Techniques. In P. T. K. Woo (Ed.), *Fish diseases and disorders, v. 1: Protozoan and Metazoan Infections* (2nd ed., pp. 297–344). Oxfordshire, UK: Cab International.

Cone, D. K., & Burt, M. D. B. (1982). The host specificity of *Urocleidus adspectus* (Mueller, 1938) (Monogenea: Ancyrocephalinae). *Journal of Parasitology*, 75, 702-706.

Curran, S. S., Tkach, V. V., & Overstreet, R. M. (2013). Molecular evidence for two cryptic species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae) in Freshwater Fishes of the Southeastern United States. *Comparative Parasitology*, 80(2), 186-195.

De Vienne, D. M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E., & Giraud, T. (2013). Cospeciation vs host-shift speciation: Methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist*, 198(2), 347-385.

Desdevises, Y., Morand, S., & Legendre, P. (2002). Evolution and determinants of host specificity in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77(4), 431-443.

Eiras, J. C. (1994). *Elementos de Ictioparasitologia*. Porto: Fundação Engenheiro Antônio de Almeida.

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 G. C. Pavanelli, R. M. Takemoto, J. C. Eiras (Eds.), *Parasitologia, Peixes de água doce do Brasil* (pp. 149-167). Maringá, BR: Eduem.

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. *International Journal for Parasitology*, 43(1), 57-72.

Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160-174.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313-321.

Hillis, D., & Dixon, M. (1991). Ribosomal Dna: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411-453.

Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1996). Molecular Systematics. In D. M. Hillis & C. Moritz (Eds.), *Nucleic acids IV: sequencing and cloning* (2nd ed.). Massachusetts, US: Sinauer Associates.

Huyse, T., Audenaert, V., & Volckaert, F. M. (2003). Speciation and host-parasite relationships in the parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). *International Journal for Parasitology*, 33(14), 1679-1689.

Jousson, O., Bartoli, P., Zaninetti, L., & Pawlowski, J. (1998). Use of the ITS rDNA for elucidation of some life-cycles of *Mesometridae* (Trematoda, Digenea). *International Journal for Parasitology*, 28, 1403-1411.

Kearn, G. C. (1994). Evolutionary expansion of the Monogenea. *International Journal for Parasitology*, 24(8), 1227-1271.

King, S. D., Marcogliese, D. J., Forest, J. J. H., McLaughlin, D., & Bentzen, P. (2013). Description of *Gyrodactylus mediotorus* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) infecting spottail shiner (*Notropis hudsonius*) from the St. Lawrence River, Canada. *Journal of Parasitology*, 99(6), 1062-1066.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2761-2762.

Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* (2nd ed.). New York, US: Cambridge University Press.

Locke, S. a., Daniel McLaughlin, J., & Marcogliese, D. J. (2010). 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*, 19(13), 2813-2827.

Luton, K., Walker, D., & Blair, D. (1992). Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56(2), 323-327.

Machado, R. das N. (2007). Análise cientométrica dos estudos bibliométricos publicados em periódicos da área de biblioteconomia e ciência da informação (1990-2005). *Perspectivas em Ciência da Informação*, 12(3), 2-20.

Macias-Chapula, C. A. (1998). O papel da informetria e da cienciométrica e sua perspectiva nacional e internacional. *Ciência da Informação*, 27(2), 134-140.

- Marigo, J., Thompson, C. C., Santos, C. P., & Iñiguez, A. M. (2011). The *Synthesium brachycladiidae* Odhner, 1905 (Digenea) association with hosts based on nuclear and mitochondrial genes. *Parasitology International*, 60(4), 530-533.
- Miller, T. L., & Cribb, T. H. (2013). Dramatic phenotypic plasticity within species of *Siphomutabilus* n. g. (Digenea: Cryptogonimidae) from Indo-Pacific *Caesionines* (Perciformes: Lutjanidae). *Systematic Parasitology*, 86, 101-112.
- Nelson, G., & Platnick, N. (1981). *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. New York, US: Columbia University Press.
- Noble, E. R., Noble, G. A., Schad, G. A., & Macinnes, A. J. (1989). *Parasitology. The biology of animal parasites* (6th ed.). Philadelphia, US: Lea and Febiger.
- Patwardhan, A., Say, S., & Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-A review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2(2), 1000131.
- Pavanelli, G. C., Eiras, J. C., & Takemoto, R. M. (2008). *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá, BR: EDUEM.
- Perkins, S. L., Martinsen, E. S., & Falk, B. G. (2011). Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology*, 138(13), 1664-1674.
- Poulin, R. (1992). Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *International Journal for Parasitology*, 22(6), 753-758.
- Rodhe, K. A. (1979). A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. *The American Naturalist*, 114, 648-671.
- Sarabeev, V., & Desdevises, Y. (2014). Phylogeny of the Atlantic and Pacific species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae): Morphology vs. molecules. *Parasitology International*, 63, 9-20.
- Scholz, T., Oros, M., Bazsalovicsová, E., Brabec, J., Waeschenbach, A., Xi, B.-W., ... Littlewood, D. T. J. (2014). Molecular evidence of cryptic diversity in *Paracaryophyllaeus* (Cestoda: Caryophyllidae), parasites of loaches (Cobitidae) in Eurasia, including description of *P. vladkae* n. sp. *Parasitology International*, 63(6), 841-850.
- Sepúlveda, F. A., & González, M. T. (2014). Molecular and morphological analyses reveal that the pathogen *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae) is a complex species: Implications for yellowtail *Seriola* spp. aquaculture. *Aquaculture*, 418-419, 94-100.
- Snyder, S. D. (2004). Phylogeny and paraphyly among tetrapod blood flukes (Digenea: Schistosomatidae and Spirorchiidae). *International Journal for Parasitology*, 34, 1385-1392.

Springer, M. S., DeBry, R. W., Douady, C., Amrine, H. M., Madsen, O., de Jong, W. W., & Stanhope, M. J. (2001). Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (2), 132-143.

Takemoto, R. M., Luque, J. L., Bellay, S., Longhini, C. E., & Graça, R. J. (2013). Monogenea. In G. C. Pavanelli, R. M. Takemoto, J. C. Eiras (Eds.), *Parasitologia, Peixes de água doce do Brasil* (pp. 149-167). Maringá, BR: Eduem.

Vawter, L., & Brown, W. M. (1986). Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 234(4773), 194-196.

Waeschenbach, A., Webster, B. L., & Littlewood, D. T. J. (2012). Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 834-847.

Whittington, I. D. (1998). Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. *International Journal for Parasitology*, 28(10), 1481-1493.

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews*, 13(5), 303-314.

Yoon, G. H., Al-Jufaili, S., Freeman, M. A., Bron, J. E., Paladini, G., & Shinn, A. P. (2013). *Omanicotyle heterospina* n. gen. et n. comb. (Monogenea: Microcotylidae) from the gills of *Argyrops spinifer* (Forsskal) (Teleostei: Sparidae) from the Sea of Oman. *Parasites & Vectors*, 6(1), 170.

ANEXO I

Submissões

- » [Submissões Online](#)
- » [Diretrizes para Autores](#)
- » [Declaração de Direito Autoral](#)
- » [Política de Privacidade](#)

Submissões Online

Já possui um login/senha de acesso à revista Acta Scientiarum. Biological Sciences?
[ACESSO](#)

Não tem login/senha?
[ACESSE A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

Diretrizes para Autores

POLÍTICA CONTRA PLÁGIO E MÁ-CONDUTAS EM PESQUISA

Continuando nossa tradição de excelência, informamos as melhorias editoriais que visam fortalecer a integridade dos artigos publicados por esta revista. Em conformidade com as diretrizes do [COPE](#) (*Committee on Publication Ethics*), que visam incentivar a identificação de plágio, más práticas, fraudes, possíveis violações de ética e abertura de processos, indicamos:

1. Os autores devem visitar o website do COPE <http://publicationethics.org>, que contém informações para autores e editores sobre a ética em pesquisa;

2. Antes da submissão, os autores devem seguir os seguintes critérios:

- artigos que contenham aquisição de dados ou análise e interpretação de dados de outras publicações devem referenciá-las de maneira explícita;
- na redação de artigos que contenham uma revisão crítica do conteúdo intelectual de outros autores, estes deverão ser devidamente citados;
- todos os autores devem atender os critérios de autoria inédita do artigo e nenhum dos pesquisadores envolvidos na pesquisa poderá ser omitido da lista de autores;
- a aprovação final do artigo será feita pelos editores e conselho editorial.

3. Para responder aos critérios, serão realizados os seguintes procedimentos:

- a) Os editores avaliarão os manuscritos com o sistema [CrossCheck](#) logo após a submissão. Primeiramente será avaliado o conteúdo textual dos artigos científicos, procurando identificar plágio, submissões duplicadas, manuscritos já publicados e possíveis fraudes em pesquisa;

b) Com os resultados, cabe aos editores e conselho editorial decidir se o manuscrito será enviado para revisão por pares que também realizarão avaliações;

c) Após o aceite e antes da publicação, os artigos poderão ser avaliados novamente.

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:

1. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, ISSN 1807-863X (on-line), é publicada trimestralmente pela Universidade Estadual de Maringá.

2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes de Ciências Biológicas, incluindo anatomia, bacteriologia, biologia molecular, bioquímica, botânica, citologia e biologia celular, comportamento animal, ecologia e limnologia, embriologia e histologia, morfofisiologia, genética, microbiologia, parasitologia e zoologia.

3. Os autores se obrigam a declarar a cessão de direitos autorais e que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-se disponível no endereço: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/about/submissions>.

4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do Conselho Editorial da revista.

5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.

6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês.

7. Os artigos serão avaliados por, no mínimo, três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.

8. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

9. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o **Portal ACTA**, no endereço <http://www.uem.br/acta>.

10. A revisão de português (Resumo) e a revisão de língua estrangeira serão de responsabilidade e custeados pelos autores dos artigos já aceitos para publicação, mediante comprovação emitida pelos revisores credenciados.

11. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão, deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo seis), seus endereços institucionais e o e-mail do autor indicado para correspondência. Mais de seis autores serão aceitos desde que devidamente justificado. Neste caso a contribuição de cada um dos autores deverá ser apresentada em uma declaração específica para esta finalidade. Nesta justificativa deve-se considerar os seguintes aspectos: participação na elaboração do projeto ou análise e interpretação dos dados; redação ou revisão crítica do artigo e aprovação da versão final a ser publicado.

b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, *Keywords*, Introdução, Material e métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.

c) O título, com no máximo vinte palavras, em português e inglês, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras.

d) O resumo (bem como o *abstract*), não excedendo 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis palavras-chave que não estejam citadas no título deverão ser acrescentadas ao final tanto do resumo como do *abstract*.

e) Os artigos não deverão exceder 15 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no *MS-Word*, ou compatível, utilizando *Times New Roman* fonte 12.

f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.

g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 5 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do *Word*.

h) Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo após a sua citação. As tabelas deverão ter preferencialmente 7,65 ou 16 cm de largura. Os gráficos não deverão ter molduras externas, linhas internas ou mesmo cor de fundo. Para os gráficos de barra, usar padrões de preenchimento diferentes (horizontal, vertical, listras diagonais e múltiplos pontos).

i) As figuras (fotos, pranchas, mapas, desenhos ou esquemas) deverão ter o tamanho máximo de 16 x 23 cm, incluindo-se o espaço necessário para a legenda. Gráficos e figuras que possam ser publicados em uma única coluna (7,65 cm) serão reduzidos. Dessa forma, será necessário atentar para o tamanho de números ou letras, para que continuem visíveis após a redução. O tipo de fonte utilizado deverá ser *Times New Roman* tamanho 8 pt. Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original. Deve-se utilizar escala de barras para indicar tamanho, a qual deverá, sempre que possível, estar situada à esquerda da figura; o canto inferior direito deva ser reservado para o número da(s) figura(s).

j) As figuras digitalizadas deverão ter no mínimo 300 dpi de resolução, gravadas em formato jpg ou png. Não serão aceitas figuras que ultrapassem o tamanho estabelecido ou que apresentem qualidade gráfica ruim. Ilustrações em cores serão aceitas.

k) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

l) As equações deverão ser editadas, utilizando o *software Math Type* ou inseridas como figura jpg ou png.

m) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

n) Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.

o) A revista recomenda que oitenta por cento (80%) das referências sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge* e/ou *Scopus* com menos de 10 anos. Não serão aceitas nas referências citações de dissertações, teses, monografias, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.

p) As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Para citação no texto, usar o sobrenome e ano: Oleksiak (2008) ou (Oleksiak, 2008); para dois autores: Silva e Diniz Filho (2008) ou (Silva & Diniz, 2008); para três a cinco autores (1.ª citação): Andrade, Santos, Oliveira, Cerqueira e Meireles (2008) ou (Andrade, Santos, Oliveira, Cerqueira & Meireles, 2008) e, nas citações subsequentes, Andrade et al. (2008) ou (Andrade et al., 2008); para seis ou mais autores, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Cardozo et al. (2007) ou (Cardozo et al., 2007).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Listar todos os autores do trabalho. Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados e em itálico, sem o local de publicação.

ARTIGOS

Um autor

Oleksiak, M. F. (2008). Changes in genexpression due to chronic exposure to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*, 90(3), 161-171.

Dois autores

Silva, M. M. F. P., & Diniz, J. A. F., Fo. (2008). Extinction of mammalian populations in conservation units of the Brazilian Cerrado by inbreeding depression in stochastic environments. *Genetics and Molecular Biology*, 31(3), 800-803.

Até sete autores (devem-se indicar todos os autores separados por vírgula, exceto o último que deve ser separado por vírgula seguido de &)

Santana, N.F., Thomaz, T.A., & Roberto, M.C. (2015). Relationship between bacterial density and abiotic factors at different sediment depths of lakes in the Upper Paraná River floodplain. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37(1), 1-8. doi:10.4025/actasciobiolsci.v37i1.22240

Oito ou mais autores (devem-se indicar os seis primeiros, inserir reticências e acrescentar o último autor)

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., ... Pinto, E. (2007). Metabolites from algae With economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C – Toxicology and Pharmacology*, 146(102), 60-78.

LIVROS

Haynie, D. T. (2001). *Biological thermodynamics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Foster, R. G. & Kreitzman, L. (2005). *Rhythms of life: the biological clocks that control the daily live of every living thing*. Yale, US: Yale University Press.

Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Pelicice, F. M. (2007). Impactos dos represamentos. In A. A. Agostinho, L. C. Gomes, F. M. Pelicice (Ed.). *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil* (p. 107-152). Maringá, PR: Eduem.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita e não está sendo avaliada por outra revista.
2. Os manuscritos deverão ser submetidos em **inglês**.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapasse 5MB).
4. Todos os endereços de páginas da Internet, incluídas no texto (Ex: <http://www.eduem.uem.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em **espaço 1,5**; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. No máximo 15 páginas.
6. O texto segue os padrões de estilo e quisitos bibliográficos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção propriedades do Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Asescurando a Avaliação por Pares Cega](#).
8. **TODOS OS CONTATOS MANTIDOS ENTRE O AUTOR E EDITORA DEVE MENCIONAR INICIALMENTE O NÚMERO DO MANUSCRITO INSERIDO NO SISTEMA**

Declaração de Direito Autoral

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE E CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS Declaro que o presente artigo é original, não tendo sido submetido à publicação em qualquer outro periódico nacional ou internacional, quer seja em parte ou em sua totalidade. Declaro, ainda, que uma vez publicado na revista **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, editada pela Universidade Estadual de Maringá, o mesmo jamais será submetido por mim ou por qualquer um dos demais co-autores a qualquer outro meio de divulgação científica. Através deste instrumento, em meu nome e em nome dos demais co-autores, porventura existentes, cedo os direitos autorais do referido artigo à Universidade Estadual de Maringá e declaro estar ciente de que a não observância deste compromisso submeterá o infrator a sanções e penas previstas na Lei de Proteção de Direitos Autorais (Nº9609, de 19/02/98).

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

ISSN 1679-9283 (impresso) e ISSN 1807-863X (on-line) e-mail: actabiol@uem.br

CAPÍTULO 2

Coespeciação, duplicação e transferência horizontal entre *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) e seus hospedeiros Characiformes no rio Paraná e afluentes.

Rodrigo Junio da Graça; Thomaz Mancini
Carrenho Fabrin; Juan Antônio Balbuena e
Ricardo Massato Takemoto

O capítulo 2 foi elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica na revista *Plos One*. Normas da revista no anexo II.

Título: Coespeciação, duplicação e transferência horizontal entre *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) e seus hospedeiros Characiformes no alto rio Paraná e afluentes.

RESUMO

Monogenéticos são muito utilizados em estudos coevolutivos, sendo a especificidade aos seus hospedeiros um indício de uma história coevolutiva entre estes parasitos e seus hospedeiros. Este estudo teve como objetivo testar se a especificidade dos monogenéticos *Anacanthorus* spp. por seus hospedeiros se deu por coespeciação. Foram coletadas oito espécies de peixes no rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. As 12 espécies de parasitos obtidas nas brânquias dos peixes tiveram o gene mitocondrial COI e nuclear ITS1 e ITS2 sequenciados. Já as sequências dos genes RAG1 (nuclear) e COI dos peixes foram obtidas do *Genbank*. As reconstruções filogenéticas dos parasitos e dos hospedeiros foram feitas com base nos genes mencionados acima. As filogenias obtidas por inferência bayesiana foram utilizadas para as análises de coespeciação no PACo e ParaFit. As análises de coespeciação global forneceram evidências significativas de que a relação entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros se deu por coespeciação. De modo geral, não houve consenso entre os resultados de PACo e ParaFit para *links* individuais entre parasitos hospedeiros. Apenas as associações entre *Anacanthorus douradensis* a *Salminus brasiliensis*, e *Anacanthorus* sp. 4 e sp. 5 a *Hoplerythrinus unitaeniatus* foram estatisticamente suportadas como eventos de coespeciação em ambas as análises. Os resultados obtidos também apontaram que são duas as vias de especiação em *Anacanthorus*, a duplicação e a coespeciação. Porém, eventos de transferência horizontal em *Anacanthorus* spp. também aconteceram entre os hospedeiros congêneres.

Palavras-chave: Coevolução. Especiação. Especificidade. Filogenia. DNA. Parasitos branquiais. Brasil.

Title: Co-especiation, duplication and host switching between *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) and its hosts Characiforms in the upper Paraná river and tributaries.

ABSTRACT

The monogeneans are widely used in evolutionary studies, because the specificity to their hosts may be an indication of a co-evolutionary history between parasites and hosts. The aim of this study was to test the specificity of monogeneans *Anacanthorus* spp. by their hosts was given by a co-speciation. For this study were collected eight species of Characiformes in the Paraná river and tributaries from Brazil between the years 2012 to 2015. The 12 species of *Anacanthorus* obtained from the gills of fish had the genes Cytochrome Oxidase Subunit I and nuclear Internal Transcribed Spacers I and II sequenced. Already the sequences of genes Recombination activating gene 1 and Cytochrome Oxidase Subunit I of fish were obtained from Genbank. The sequences obtained were edited and aligned. Phylogenies of parasites and hosts were reconstructed based on the genes mentioned above. Phylogenies derived from the statistical method of bayesian inference were used for the co-speciation analysis in Paco and ParaFit. The speciation analysis provided significant evidence that the relationship between *Anacanthorus* spp. and their hosts occurred co-speciation. Overall, there was no consensus between the results of Paco and ParaFit for individual links between hosts parasites. Only the links between *Anacanthorus douradensis* the *Salminus brasiliensis*, and *Anacanthorus* sp. 4 sp. 5 to *Hoplerythrinus unitaeniatus* were statistically supported as co-speciation events in both analysis. The results also indicate that there are two pathways in *Anacanthorus* speciation, the duplication and co-speciation. But, host switching in *Anacanthorus* spp. also happened among congeners hosts.

Keywords: Co-evolution. Speciation. Specificity. Phylogeny. DNA. Gills parasites. Brazil.

3.1 INTRODUÇÃO

Anacanthorus Mizelle e Price, 1965 é um dos principais gêneros de monogenéticos parasitos branquiais registrados em Characiformes na região Neotropical (THATCHER, 2006; COHEN et al., 2013). Tendo, como características morfológicas a presença de um órgão copulatório masculino com peça acessória articulada ou não, 14 pares de ganchos com distribuição *Anacanthorinae*, ausência de barras e vagina. Os pares de âncoras dorsal e ventral, aparentemente são modificados em ganchos que parecem uma agulha, chamados de 4A (MIZELLE e PRICE, 1965; THATCHER, 2006). Esta última característica, juntamente com a ausência de barras faz com que este gênero seja facilmente distinguido dos demais dactilogirídeos branquiais.

Cohen et al. (2013) listaram 70 espécies de *Anacanthorus* para a América do Sul. No entanto, estudos de ocorrência, listas de espécies (BRANDÃO et al., 2013; GRAÇA et al., 2013) e descrições recentes de espécies (LEÃO et al., 2015; MONTEIRO et al., 2015) apontam para que o número de espécies pertencentes a este gênero seja ainda maior. No Brasil espécies de *Anacanthorus* têm ampla distribuição, sendo registradas em Characiformes provenientes das bacias hidrográficas do rio Amazonas (KRITSKY et al., 1979; VAN EVERY e KRITSKY, 1992), do rio São Francisco (MONTEIRO et al. 2010; MONTEIRO et al. 2015) e do rio Paraná (COHEN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013). Estudos mostraram que espécies de *Anacanthorus* também são muito comuns em peixes como *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) “pacu”, criados em pisciculturas de tanques escavados, ou tanques em redes (BOEGER et al., 1995; LIZAMA et al., 2007; LEÃO et al., 2015).

Para a planície de inundação do alto rio Paraná localizada na divisa dos estados do Mato Grosso do Sul e Paraná, foram registrados apenas três hospedeiros para espécies de *Anacanthorus*. Os primeiros registros foram feitos em *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1837 e *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) (TAKEMOTO et al., 2009; COHEN et al., 2012)

e mais recentemente em *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) (GRAÇA et al., 2013). Sendo este último, a primeira ocorrência destes parasitos em peixes Erythrinidae na América do Sul.

A distribuição e colonização de muitas espécies de monogenéticos entre elas as pertencentes a *Anacanthorus* em seus hospedeiros pode ter sido influenciada pela história evolutiva dos Characiformes na região Neotropical (BRAGA et al., 2014). Esse fato torna as espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros um bom modelo para estudos de biogeografia e coevolução (Van EVERY e KRITSKY, 1992).

Estudos cofilogenéticos tem sido alvo de pesquisadores desde o século XIX (DESDEVISES, 2007). Trabalhos clássicos buscaram testar hipóteses e explicar as possíveis associações de especificidade e coevolutivas entre parasitos e seus hospedeiros, por exemplo, Brooks (1979), Hafner e Nadler (1988), Desdevises et al. (2002), Santiago-Alárcon et al. (2014) e Lei e Olival (2015). Para o ambiente aquático, os monogenéticos e seus hospedeiros são um dos grupos de organismos mais utilizados, principalmente após o ano de 2000, como pode ser observado nos trabalhos de Desdevises et al. (2002), Huyse e Volckaert (2005), Šimková et al. (2006), Vanhove et al. (2015) e Hahn et al. (2015).

A escolha dos monogenéticos para estudos coevolutivos se dá principalmente, devido à especificidade destes parasitos por seus hospedeiros (RODHE, 1979; CONE e BURT, 1982). Sendo que determinadas espécies de monogenéticos são tão específicas, que podem ser utilizadas como uma ferramenta a mais na identificação de seus hospedeiros (LAMBERT e GHARBI, 1995). O que para alguns autores pode ser um indício de coevolução via coespeciação (NOBLE et al., 1989; POULIN, 1992; KEARN, 1994).

No entanto, ao contrário do que se pensa, a especificidade destes parasitos não está relacionada apenas a relações evolutivas parasito/hospedeiro, mas também pode ser determinada por fatores ecológicos (DESDEVISES et al., 2002), ou mesmo devido a altas

taxas de especiação destes parasitos e a oportunidades de transferências horizontais para outros hospedeiros (BOEGER e KRITSKY, 1997; DESDEVISES, 2007).

Mesmo sendo considerado um bom modelo para estudos cofilogenéticos (DESDEVISES, 2007) os monogenéticos ainda são poucos utilizados neste tipo de estudo em especial na região Sulamericana, onde são conhecidas cerca de 300 espécies destes parasitos (COHEN et al., 2013) e mais de 3000 espécies de peixes somente para o ambiente dulcícola (BUCKUP et al., 2007). Até a presente data o único estudo realizado nesta região com este enfoque foi o de Van Every e Kritsky (1992), com as espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros serrasalmideos.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo testar se a especificidade das espécies de *Anacanthorus* por seus hospedeiros no alto rio Paraná e afluentes esta relacionada a um processo de coespeciação, visto que estes parasitos só foram registrados em algumas Famílias de Characiformes. Este foi o primeiro estudo a utilizar marcadores moleculares para testar associações de coespeciação entre este importante grupo de parasitos e seus hospedeiros na América do Sul.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da área de estudo

A região estudada faz parte da planície de inundação do alto rio Paraná, área de preservação ambiental pertencente aos estados do Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. No município de Porto Rico - PR (22°43'S e 53°10'O) está localizada a base avançada de pesquisa do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá – NUPÉLIA. Os pontos de amostragem correspondem aos utilizados pelo projeto PELD – CNPq (Projetos Ecológicos de Longa Duração) – Sítio 6 e

estão separados em três subsistemas: rio Paraná, rio Baía e rio Ivinheima (www.peld.uem.br) (Figura 2).

3.2.2 Coleta dos hospedeiros

Os peixes foram coletados a cada três meses entre os anos de 2012 e 2015, totalizando pelo menos quatro coletas ao longo de cada ano. Para algumas espécies como *Erythrinus erythrinus* (Bloch e Schneider, 1801) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Spix e Agassiz, 1829) foram feitas coletas exclusivas, pois os locais de ocorrência são de difícil acesso e não faziam parte dos amostrados durante o PELD.

Os peixes foram capturados com redes de diferentes malhagens (2,4 a xx cm entre-nós opostos), e também com varas de pesca. Os peixes coletados foram encaminhados ao laboratório da base avançada de pesquisa do NUPÉLIA. Em seguida foram anestesiados com benzocaína 10%, posteriormente eutanasiados e identificados por especialistas segundo Graça e Pavanelli (2007). Na sequência foram congelados e encaminhados para o laboratório de Ictioparasitologia do NUPÉLIA - Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), onde foram mantidos em freezer até a triagem e coleta dos parasitos. As espécies de peixes estudadas foram escolhidas de acordo com registros na literatura de parasitos monogenéticos do gênero *Anacanthorus*, ou mesmo por registros feitos pela observação em laboratório.

Foram coletadas oito espécies de peixes pertencentes a Characiformes: *Metynnis lippincottianus* (Cope, 1870) “pacu cd”, *Piaractus mesopotanicus* “pacu”, *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 “piranha”, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) “traíra”, *Erythrinus erythrinus* “jeju mole”, *Hoplerythrinus unitaeniatus* “jeju”, *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 “tabarana” e *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) “dourado” (GRAÇA e PAVANELLI, 2007; ESCHMEYER e FONG, 2015).

Alguns espécimes *S. hilarii* foram obtidos no rio Taquari, pois os espécimes deste peixe coletados no rio Paraná não estavam parasitados. As coletas destes peixes foram feitas

por pesquisadores do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS), Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP. O rio Taquari está localizado no estado de São Paulo e é um afluente a margem esquerda do rio Paranapanema e faz parte da bacia do rio Paraná (Figura 2).

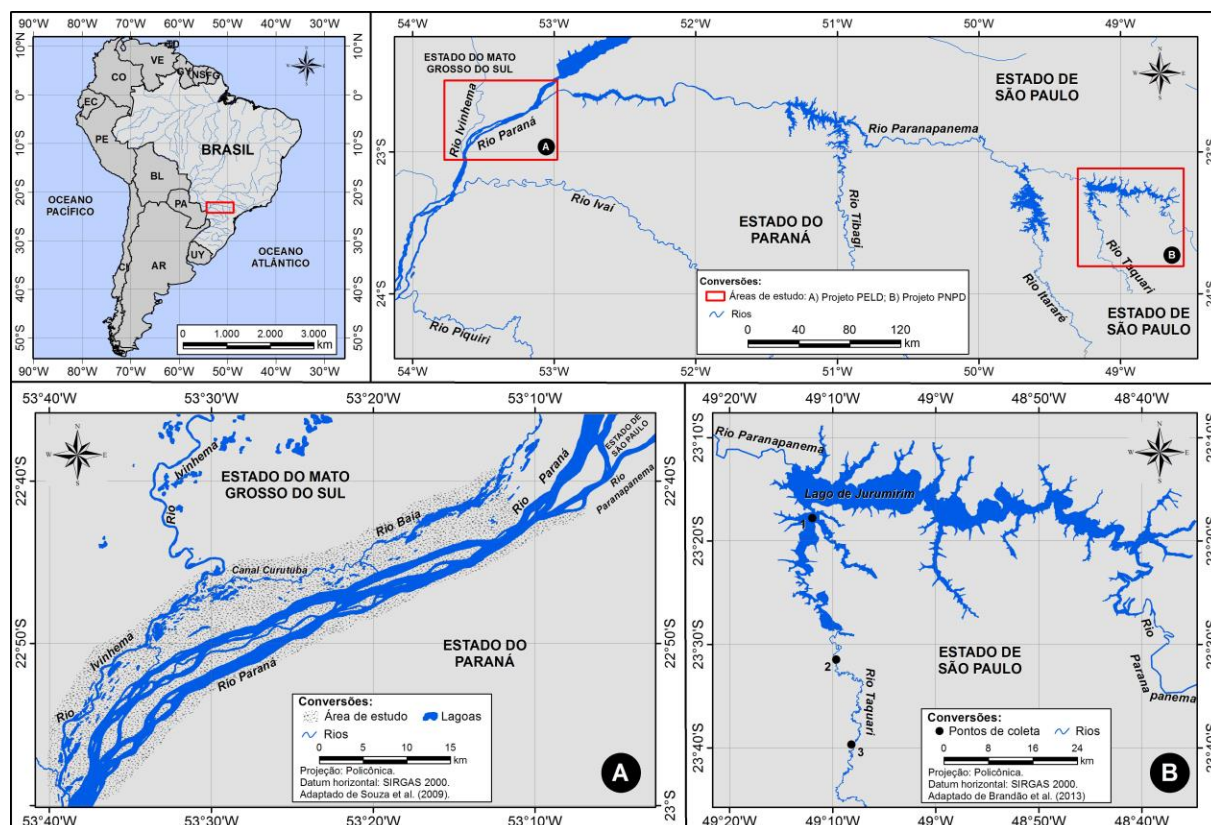


Figura 1: A) Pontos de coletas dos peixes no rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. Em destaque esta a área de estudo do projeto PELD, onde estão localizados os subsistemas do rio Ivinhema ($22^{\circ}47'S - 53^{\circ}32'W$), rio Baía ($22^{\circ}43'S - 53^{\circ}17'W$) e rio Paraná ($22^{\circ}45'S - 53^{\circ}15'W$) na planície de inundação do alto rio Paraná, PR/MS. B) pontos de coletas do *Salminus hilarii* no rio Taquari no estado de São Paulo. Ponto 1 ($23^{\circ}17'48.23'' S$; $49^{\circ}11'56.74'' O$), ponto 2 ($23^{\circ}39'42.12'' S$; $49^{\circ}08'08.42'' O$) e ponto 3 ($23^{\circ}31'28.82'' S$; $49^{\circ}09'37.04'' O$).

3.2.3 Coleta dos parasitos

Os peixes coletados foram descongelados para a remoção de suas brânquias, que tiveram seus arcos individualizados e examinados em placa de Petri com água gelada sob estereomicroscópio para a coleta dos parasitos. Os arcos branquiais foram mantidos

refrigerados durante toda a triagem, para a preservação dos parasitos. Os monogenéticos *Anacanthorus* obtidos foram transferidos para uma gota de água ultrapura em uma lâmina, posteriormente o espécime foi coberto por uma lamínula e visualizado em microscópio *Olympus CX31* para a identificação morfológica das espécies.

Em seguida os parasitos foram retirados inteiros da lâmina e transferidos para um microtubo de 2 mL com 20 µL de água ultrapura e na sequência levados ao laboratório de genética do NUPÉLIA-UEM na cidade de Maringá, onde foi feita a extração do DNA. Foi extraído o DNA de pelo menos cinco indivíduos de cada espécie de parasito estudada, exceto de *Anacanthorus* sp. 8 que só foi obtido um indivíduo.

Todos os espécimes obtidos foram fotografados com uma câmera *Sony Cyber-Shot DSC W5* acoplada ao microscópio. Foram fotografados o haptor e o aparelho masculino dos monogenéticos, estruturas utilizadas para a identificação específica destes parasitos (THATCHER, 2006). As fotos obtidas foram nomeadas e arquivadas para confirmação das espécies.

As espécies de *Anacanthorus* obtidas, foram identificadas de acordo com Boeger et al. (1995), Cohen et al. (2012 e 2013). Posteriormente, os parasitos serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) na cidade do Rio de Janeiro-RJ.

3.2.4 Extração de DNA

Os espécimes de parasitos foram individualizados em microtubos de 2 mL. Para a extração do DNA foi utilizado o kit de extração *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* da Promega, seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, o DNA obtido foi armazenado em tubos identificados de acordo com a espécie de parasito e mantidos em freezer.

3.2.5 Reação de Amplificação do DNA (Polimerase Chain Reaction - PCR)

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System* em volume total de 20 µL, contendo tampão Tris-KCl [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], MgCl₂ (0,75 µL), primers (2,5 µL cada), dNTPs (1 µL), 0,2 µL de Taq Polimerase Platinum – Invitrogen®, de 4 a 6 µL de DNA recém extraído e 10,75 µL de água.

O gene mitocondrial de interesse, Citocromo C oxidase I (COI), foi amplificado com os *primers* Trem Co1F (5'-TTTCGTTGGATCATAAGCG-3') e Trem Co1R (5'-GCAGCACTAAATTTACGATCAAA-3') desenvolvidos por Bonett et al. (2011). A reação de amplificação ocorreu em 35 ciclos, com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 44°C por 30 segundos, extensão por 2 minutos a 72°C e extensão final de 7 minutos a 72°C.

Já para os genes nucleares Espaçadores Internos Transcritos (ITS1, ITS2) e 5.8S foram utilizados para a amplificação os *primers* Bd1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') e Bd2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3') desenhados por Luton et al. (1992). A amplificação ocorreu em 30 ciclos, com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos, extensão por 1 minuto a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os amplicons do PCR foram purificados em Polietilenoglicol 8000 - NaCl (PEG-NaCl), sendo utilizado 40 µL de PEG e cerca de 17 µL de amostras do DNA proveniente da reação de amplificação, seguindo a metodologia proposta por Rosenthal et al. (1993). Na sequência a amostra foi misturada com o PEG, incubada em banho Maria a 37 ° C por 15 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 RPM. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante e adicionado 62,5 µL de etanol 80% gelado e centrifugado novamente por dois minutos a 12.000 RPM. O etanol foi descartado e os tubos com DNA aderidos a sua parede ficaram secando por algumas horas. Por fim o DNA foi ressuspendido em 10 µL de água

ultrapura e na sequencia foi utilizado 3 μ L da amostra para visualização em gel de agarose a 1% e quantificação do DNA.

3.2.6 Sequenciamento e análise das sequências

Para o sequenciamento foram utilizados os mesmos pares de *primers* da PCR para ambas as regiões de interesse, assim foram obtidas as duas fitas de DNA para cada marcador. As amostras foram preparadas em um volume final de 6 μ L, seguindo instruções do fabricante do kit *BigDye Terminator*. Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho – LACTAD da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, na cidade de Campinas no estado de São Paulo. As sequências foram obtidas no sequenciador automático ABI3730.

Posteriormente, as sequências de DNA dos parasitos foram editadas utilizando o programa BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999), e alinhadas no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) a partir do algoritmo Muscle (EDGAR, 2004). A determinação da distância *p* (percentagem de diferenças nucleotídicas) entre as espécies de parasitos e hospedeiros também foi realizada com o programa MEGA.

As regiões de interesse gene Ativador de Recombinação 1 (RAG 1) e COI, utilizadas para as filogenias dos hospedeiros foram obtidas no *GenBank* (Tabela 1). Embora tenha sido constatada a presença de cinco espécies de parasitos no dourado, somente foram obtidas boas sequências de três. Para as espécies de hospedeiros *Metynnis lippincottianus* e *Erythrinus erythrinus* foi feito o sequenciamento do gene COI, pois o mesmo não estava disponível no *GenBank*.

Tabela 1. Número de acesso das sequências de DNA dos hospedeiros obtidas no *GenBank* e relação das espécies de *Anacanthorus* parasitos branquiais registradas por espécie de peixes coletados na bacia do alto rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015.

Hospedeiros	GenBank	Espécies de parasitos
Bryconidae		
		<i>Anacanthorus douradensis</i>
<i>Salminus brasiliensis</i>	HQ289336 e JN989211	<i>Anacanthorus bicuspidatus</i> <i>Anacanthorus contortus</i>
<i>Salminus hilarii</i>	KF780113 e JN989211	<i>Anacanthorus bicuspidatus</i> <i>Anacanthorus contortus</i>
Serrasalminidae		
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	HQ289217 e HQ420833	<i>Anacanthorus penilabiatus</i>
<i>Metynnis lippincottianus</i>	HQ289265	<i>Anacanthorus</i> sp. 6 <i>Anacanthorus</i> sp. 7
<i>Serrasalmus maculatus</i>	HQ289189 e HQ289242	<i>Anacanthorus</i> sp. 1 <i>Anacanthorus</i> sp. 2
Erythrinidae		
<i>Hoplias malabaricus</i>	HQ289248 e JN988909	<i>Anacanthorus</i> sp. 3
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	HQ289309 e HQ289242	<i>Anacanthorus</i> sp. 4 <i>Anacanthorus</i> sp. 5
<i>Erythrinus erythrinus</i>	HQ289242	<i>Anacanthorus</i> sp. 8

3.2.7 Análise filogenética

Para cada espécie de parasito e hospedeiro foi escolhida uma sequência *consensus* proveniente do sequenciamento. Após, a edição manual foi possível um alinhamento contínuo de COI de 454pb dos hospedeiros e 500pb dos parasitos. Já para os marcadores nucleares RAG 1 foi alinhando um fragmento de 1016pb e ITS de 891pb (ITS1 parcial = 431 pb, 5.8S

=156pb e ITS2 parcial = 304pb). A seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica foi realizada no programa jModelTest (DARRIBA et al., 2012).

Foram realizadas reconstruções filogenéticas *multi-locus* com a concatenação do gene RAG 1 e do gene COI para os hospedeiros e o gene ITS com o gene COI para os parasitos. O modelo de substituição utilizado nas reconstruções filogenéticas foi *General Time Reversible + proportion of Invariable sites + Gamma distribution* (GTR+I+G), a partir do método estatístico de inferência bayesiana. Foram consideradas partições independentes para cada marcador quando concatenados.

As análises de relações filogenéticas foram feitas com os programas BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) e BEAST 1.7 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (DRUMOND et al., 2012). No BEAUti foi utilizado as sequências de DNA já alinhadas em formato *fasta*, gerando um arquivo que foi utilizado para realizar as análises filogenéticas no BEAST. O BEAST utiliza o método estatístico de inferência bayesiana, gerando a árvore ultramétrica utilizada para a análise de coespeciação. Para verificar a convergência da cadeia durante a análise, foi utilizado o programa Tracer (RAMBAUT et al., 2014), considerando um valor mínimo de tamanho efetivo da amostra (*effective sample size*, ESS) de 200.

O programa TreeAnnotator (RAMBAUT e DRUMMOND, 2010) foi utilizado para encontrar a árvore de maior credibilidade, considerando os primeiros 10% da cadeia como *burn-in*. A árvore resultante foi editada e visualizada no programa FigTree 1.4.2 (RAMBAUT, 2014).

O ciclídeo *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (GU702138 e EU706360) foi utilizado como grupo externo dos hospedeiros e o cestóide *Schizocotyle acheilognathi* (Yamaguti, 1934) (KP099579 e KM538083) foi utilizado como grupo externo nas análises filogenéticas dos parasitos.

3.2.8 Análises de Coespeciação

Para testar a hipótese de que a relação parasito/hospedeiro ocorreu por um processo de coespeciação, foram utilizados os pacotes estatísticos ParaFit, ParaFitLink1 (LEGENDRE et al., 2002) e *Procrustean Approach to Cophylogeny* (PACo) (BALBUENA et al., 2013). Ambas as análises foram realizadas na plataforma R (R CORE TEAM, 2015).

O PACo testa a relação de dependência entre a filogenia dos parasitos e hospedeiros, considerando que, a especiação destes organismos é impulsionada pela a especiação de seus hospedeiros (BALBUENA et al., 2013). Já o ParaFit foi utilizado para testar a hipótese nula (H_0) que tem como pressuposto, que a relação das espécies de peixes Characiformes estudadas com seus parasitos *Anacanthorus* se dá aleatoriamente sem coespeciação, ou seja, não há congruência entre as árvores. Já a hipótese alternativa (H_1), é de que há relação de coespeciação entre parasito/hospedeiro, e que este não é um processo aleatório.

Para a análise em PACo e ParaFitLink 1 foi necessário transformar as árvores geradas dos parasitos e dos hospedeiros pelo BEAST, em dois arquivos em extensão *Newick*, e também foi elaborada uma matriz binária de presença e ausência do parasito em seu hospedeiro, seguindo as instruções de Legendre et al. (2002) e Balbuena et al. (2013). Estes programas testam a congruência entre as topologias das árvores dos parasitos e seus hospedeiros, por meio da distância patristica (BALBUENA et al., 2013).

No PACo foi feita uma sobreposição girando a árvore filogenética do parasito para ajustar a topologia da árvore do hospedeiro, resultando em uma estatística de teste global que testa se há dependência da árvore do parasito pela árvore do hospedeiro (BALBUENA et al., 2013). Este teste de ajuste global de coespeciação foi feito por meio de 10.000 permutações, sendo feitas atribuições aleatórias de hospedeiros aos parasitos.

A escolha na utilização da estatística ParaFitLink 1 foi devido ao fato deste ter maior poder para detectar corretamente associações coevolutivas, principalmente em modelos em

que possivelmente estas associações sejam as mais comuns, neste caso *links* aleatórios podem ocorrer entre parasitos e hospedeiro, mais são raros, como proposto por Legendre et al. (2002). As análises em ParaFit Link1 foram conduzidas em 10.000 permutações. O nível de significância considerado tanto para o PACo quanto para ParaFit foi de $p \leq 0,01$.

Os quatro tipos de eventos evolutivos esperados entre parasitos e seus hospedeiros são a coespeciação, duplicação, extinção (perda de linhagem) e transferência horizontal. Estes eventos foram identificados nas topologias das árvores filogenéticas espelhadas dos parasitos e dos hospedeiros (Figura 3). Estas árvores foram visualizadas na função *Cophyloplot* do pacote *Analyses of Phylogenetics and Evolution* (APE) (PARADIS et al., 2004) na plataforma R.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise genética

Os marcadores moleculares nucleares ITS concatenados com o 5.8S se mostraram altamente variáveis apresentando 74% de sítios polimórficos, dificultando o alinhamento de suas sequências. Já o marcador RAG 1 se mostrou menos variável que o ITS com 23% de sítios polimórficos. Para os parasitos o COI teve 47% de sítios polimórficos entre as espécies, sendo mais variável que o COI dos hospedeiros que apresentou um polimorfismo de 35% (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização dos marcadores moleculares utilizados para as análises genéticas e reconstruções filogenéticas das espécies de hospedeiros e seus parasitos *Anacanthorus* spp. coletados no alto rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. O modelo de substituição nucleotídica, frequência nucleotídica, *gamma shape* e percentual de sítios invariáveis e polimórficos foram obtidos no programa Mega 6.

	HOSPEDEIROS		PARASITOS	
Marcador	COI	RAG 1	COI	ITS
Tamanho do Fragmento	454	1016	500	951
Modelo de Substituição	K2+G	K2+G	HKY+G	HKY+G+I
Frequência A	25%	25%	24%	22%
Frequência T	25%	25%	43%	33%
Frequência C	25%	25%	14%	20%
Frequência G	25%	25%	19%	26%
Sítios invariáveis	65%	77%	53%	26%
Sítios polimórficos	35%	23%	47%	74%
Gamma Shape	0,18	0,34	0,15	2,76

As menores distâncias *p* encontradas para o marcador COI foram de 0,14 (14%) entre *Anacanthorus* sp. 4 e *Anacanthorus* sp. 5, e de 0,15 (15%) entre *Anacanthorus* sp. 6 e *Anacanthorus* sp. 7. A maior distância *p* registrada para o COI foi de 0,27 (27%) entre *Anacanthorus* sp. 8 e as espécies *Anacanthorus douradensis*, *A. bicuspidatus* e *A. contortus*. Já as menores distâncias *p* encontradas para o ITS foram de 0,06 (6%) entre *A. douradensis* e *A. contortus*, e de 0,07 (7%) entre *Anacanthorus* sp. 4 e *Anacanthorus* sp. 5. E a maior distância *p* 0,32 (32%) foi registrada entre as espécies *Anacanthorus* sp. 5, *Anacanthorus* sp. 7 e entre *A. bicuspidatus* e *Anacanthorus* sp. 1 (Tabela 3).

Tabela 3: Matriz de divergência considerando as Distâncias p para o marcador mitocondrial Citocromo C Oxidase (branco) e marcador nuclear ITS (cinza) entre espécies de monogenéticos *Anacanthorus*, coletados em peixes Characiformes provenientes do alto rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015.

Espécie	A.do	A.bi	A.co	A.pe	A.sp.1	A.sp.2	A.sp.6	A.sp.7	A.sp.3	A.sp.4	A.sp.5	A.sp.8
A.do		0,12	0,06	0,27	0,29	0,29	0,27	0,30	0,28	0,27	0,29	0,28
A.bi	0,19		0,12	0,30	0,32	0,31	0,29	0,31	0,31	0,28	0,31	0,30
A.co	0,19	0,17		0,27	0,29	0,28	0,27	0,28	0,28	0,26	0,28	0,27
A.pe	0,26	0,24	0,25		0,26	0,27	0,24	0,28	0,28	0,24	0,27	0,25
A.sp.1	0,26	0,24	0,25	0,21		0,10	0,19	0,22	0,29	0,26	0,29	0,27
A.sp.2	0,26	0,23	0,25	0,19	0,17		0,18	0,22	0,28	0,25	0,28	0,25
A.sp.6	0,24	0,22	0,25	0,22	0,19	0,19		0,18	0,27	0,26	0,29	0,27
A.sp.7	0,25	0,24	0,24	0,23	0,18	0,19	0,15		0,29	0,28	0,32	0,28
A.sp.3	0,24	0,25	0,27	0,20	0,20	0,23	0,22	0,21		0,16	0,19	0,15
A.sp.4	0,25	0,25	0,27	0,22	0,23	0,24	0,21	0,20	0,18		0,07	0,11
A.sp.5	0,25	0,23	0,27	0,23	0,24	0,25	0,20	0,21	0,20	0,14		0,16
A.sp.8	0,27	0,27	0,27	0,23	0,24	0,24	0,22	0,23	0,18	0,19	0,19	

Espécies de parasitos: A.do = *Anacanthorus douradensis*; A.bi = *A. bicuspidatus*; A.co = *A. contortus*; A.pe = *Anacanthorus penilabiatu*s; A.sp.1 = *Anacanthorus* sp. 1; A.sp. 2 = *Anacanthorus* sp. 2; A.sp. 3 = *Anacanthorus* sp. 3; A.sp. 4 = *Anacanthorus* sp. 4; A.sp. 5 = *Anacanthorus* sp. 5; A.sp. 6 = *Anacanthorus* sp. 6; A.sp. 7 = *Anacanthorus* sp. 7; A.sp. 8 = *Anacanthorus* sp. 8.

3.3.2 Análise filogenética

A análise da topologia da árvore filogenética (Figura 2) das espécies de *Anacanthorus* e seus respectivos hospedeiros mostram três clados de parasitos, o primeiro foi formado por *Anacanthorus douradensis*, *A. bicuspidatus* e *A. contortus* Cohen, Kohn, Boeger, 2012 parasitos de briconídeos. O segundo, formado por *Anacanthorus penilabiatu*s, *Anacanthorus* sp. 1, *Anacanthorus* sp. 2, *Anacanthorus* sp. 6 e *Anacanthorus* sp. 7 parasitos de serrasalmídeos. E por último o clado representado por *Anacanthorus* sp. 3, *Anacanthorus* sp.

4, *Anacanthorus* sp. 5 e *Anacanthorus* sp. 8 parasitos de eritrínídeos. Não houve troca de parasitos entre hospedeiros de diferentes gêneros.

Pôde-se observar também que os clados foram formados dentro de cada família de hospedeiros. E conforme os hospedeiros têm uma relação de parentesco mais próxima os seus parasitos estão estritamente relacionados também.

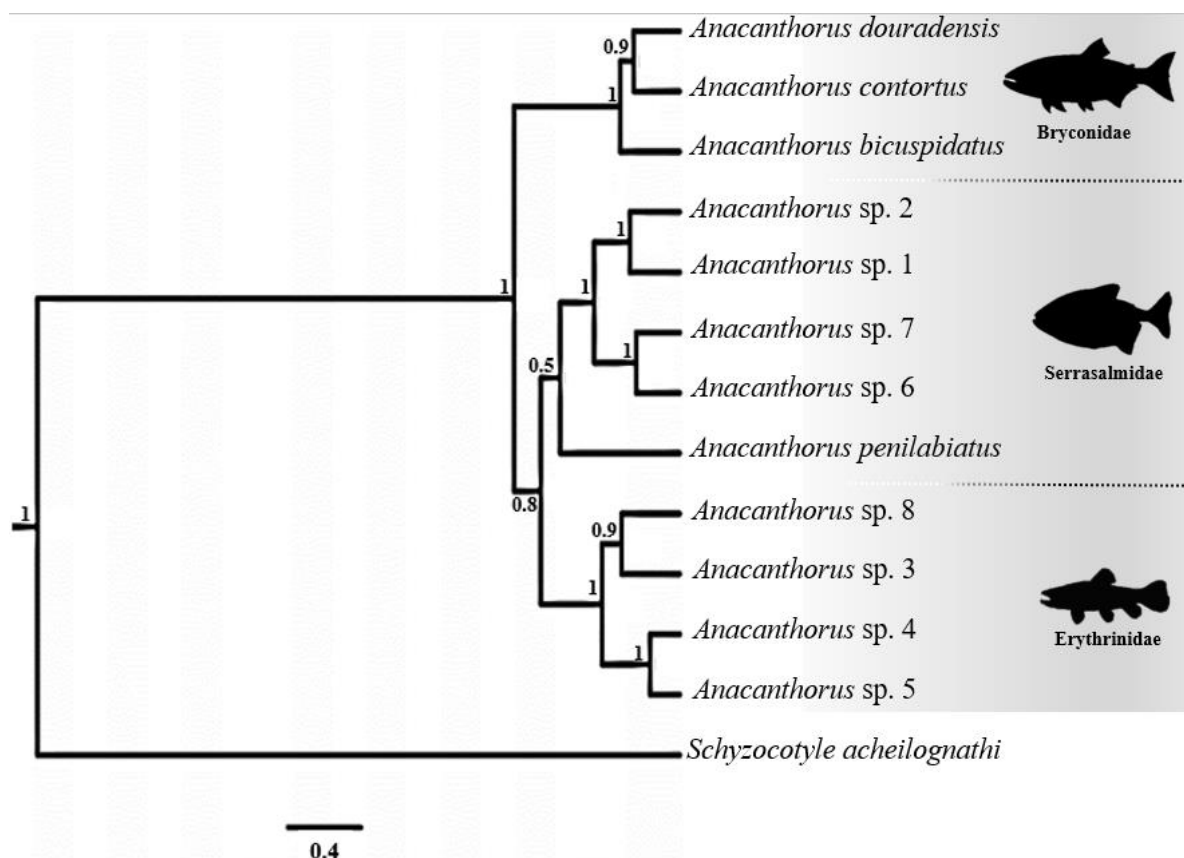


Figura 2: Relações filogenéticas entre as espécies de *Anacanthorus* parasitos branquiais de Characiformes coletados no alto rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. A árvore foi construída baseada nos marcadores COI e ITS1, ITS2 e 5.8S concatenados. Foi utilizado o modelo evolutivo GTR+I+G pelo método estatístico de Inferência Bayesiana. As linhas pontilhadas delimitam as espécies de parasitos que ocorrem em cada família de hospedeiro. Os valores dos nós indicam os suportes (probabilidade posterior) dos clados formados. Os suportes variaram de 50% (0.5) a 100% (1). A escala (0.4) paralela ao ramo indica o número de substituições por sítio. O cestóide *Schyzocotyle acheilognathi* (KP099579 e KM538083) foi utilizado como grupo externo.

3.3.3 Análises de Coespeciação

Os eventos coevolutivos observados na topologia das árvores espelhadas dos parasitos e seus hospedeiros foram, possível coespeciação de *Anacanthorus* sp. 8 associada a *Erythrinus erythrinus*, o mesmo pode ter acontecido entre *Anacanthorus* sp. 3 e *Hoplias malabaricus*, *A. penilabiatus* e *P. mesopotamicus*, e *A. douradensis* com *Salminus brasiliensis*. Já *Anacanthorus* sp. 4 e *Anacanthorus* sp. 5 podem representar uma duplicação associada a *Hoplerythrinus unitaeniatus*, o mesmo pode ter ocorrido com *Anacanthorus* sp. 1, *Anacanthorus* sp. 2 com *Serrasalmus maculatus* e *Anacanthorus* sp. 6, *Anacanthorus* sp. 7 com *Metynnis lippincottianus*.

Apenas um evento coevolutivo pode ser interpretado como possível duplicação seguida de transferência horizontal, que seria as associações entre *A. bicuspidatus* e *A. contortus* com *Salminus hilarii* e *S. brasiliensis*.

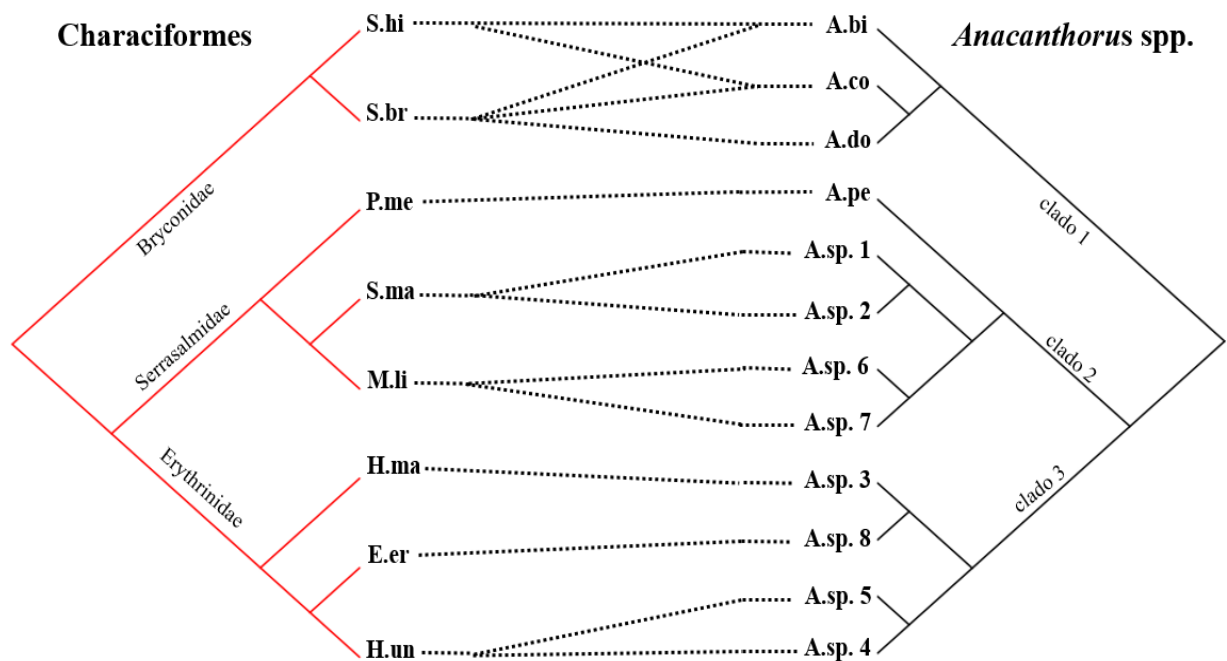


Figura 3: Árvores filogenéticas espelhadas das 8 espécies de peixes Characiformes (esquerda) e das doze espécies de *Anacanthorus* (direita). Cada clado formado pelas espécies de parasitos ocorreu em uma Família de hospedeiro. As linhas pontilhadas representam as espécies de parasitos que ocorre em cada espécie de hospedeiro. Abreviações das espécies de Characiformes: S.hi = *Salminus hilarii*; S.br = *Salminus brasiliensis*; P.me = *Piaractus*

mesopotamicus; S.ma = *Serrasalmus maculatus*; M.li = *Metynnis lippincottianus*; H.ma = *Hoplias malabaricus*; E.er = *Erythrinus erythrinus*; H.un = *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Abreviações das espécies de *Anacanthorus*: A.bi = *A. bicuspidatus*; A.co = *A. contortus*; A.do = *Anacanthorus douradensis*; A.pe = *Anacanthorus penilabiatus*; A.sp. 1 = *Anacanthorus* sp. 1; A.sp. 2 = *Anacanthorus* sp. 2; A.sp. 6 = *Anacanthorus* sp. 6; A.sp. 7 = *Anacanthorus* sp. 7; A.sp. 3 = *Anacanthorus* sp. 3; A.sp. 8 = *Anacanthorus* sp. 8; A.sp. 5 = *Anacanthorus* sp. 5; A.sp. 4 = *Anacanthorus* sp. 4.

As análises em PACo e ParaFitglobal forneceram evidências significativas de que a relação entre as espécies de *Anacanthorus* estudadas e seus hospedeiros, se deu por coespeciação (PACo $m^2_{XY} = 0,82$, $p = 0,0000$; ParaFitGlobal = 5,54, $p = 0,0001$) rejeitando a hipótese H_0 .

Já a análise dos resíduos quadrados no PACo entre os *links* individuais das espécies de parasitos e seus respectivos hospedeiros, não apresentou resultados significativos estatisticamente para todas as espécies. Os valores residuais de 0,005 ou abaixo deste valor apontaram para possíveis eventos de coespeciação entre *Anacanthorus douradensis* com *Salminus brasiliensis*, *Anacanthorus* sp. 4 e *Anacanthorus* sp. 5 com *Hoplerythrinus unitaeniatus* e *Anacanthorus* sp. 3 com *Hoplias malabaricus* (Figura 4).

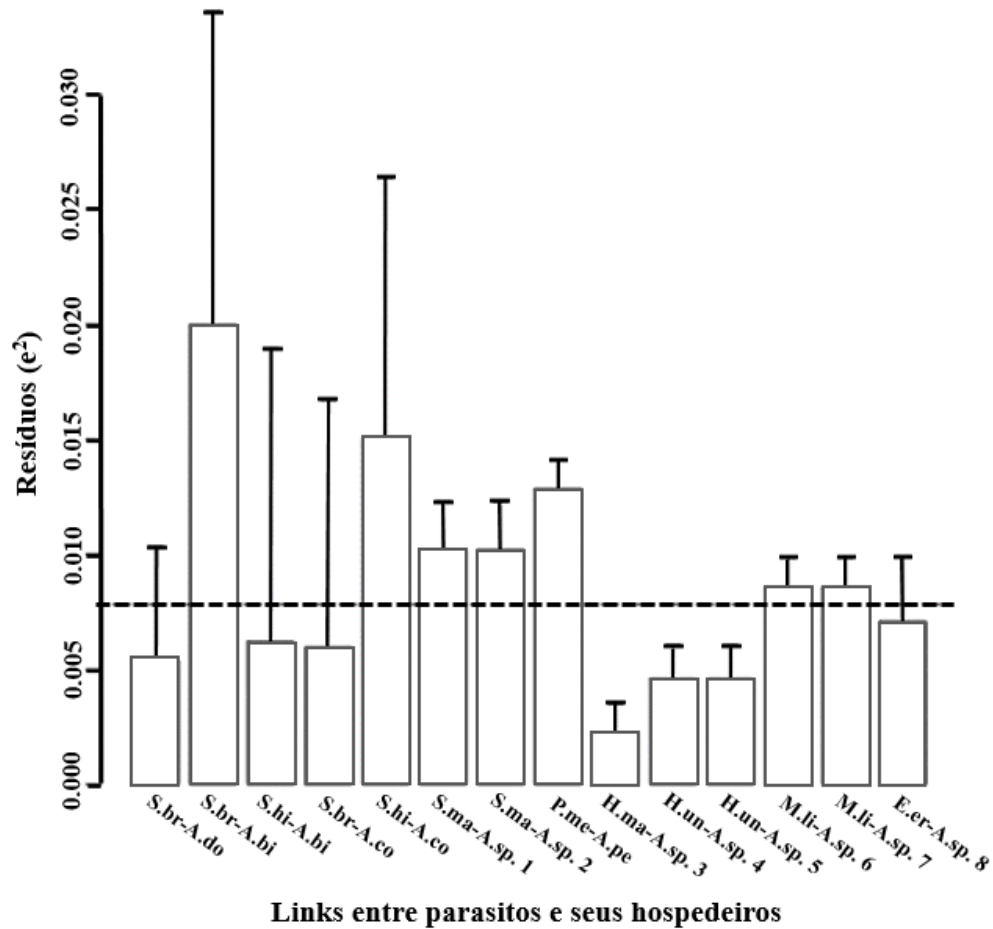


Figura 4: Contribuições individuais das relações parasita/hospedeiro para o ajuste global da Coespeciação entre *Anacanthorus* e seus hospedeiros. As colunas representam os resíduos quadrados e as barras superiores são o intervalo de confiança (95%) resultantes da aplicação do PACo para distâncias patrísticas derivadas das árvores filogenéticas apresentados na Figura 4. O valor da mediana dos resíduos ao quadrado é apresentado (linha pontilhada) para facilitar comparações entre *links* dos parasitos e seus hospedeiros. Associações parasito/hospedeiro com baixos valores residuais da mediana (e^2_i) provavelmente representam ligações coevolutivas. Nível de significância $p \leq 0,01$. Abreviações das espécies de Characiformes: S.hi = *Salminus hilarii*; S.br = *Salminus brasiliensis*; P.me = *Piaractus mesopotamicus*; S.ma = *Serrasalmus maculatus*; M.li = *Metynnis lippincottianus*; H.ma = *Hoplias malabaricus*; E.er = *Erythrinus erythrinus*; H.un = *Hoplerethrinus unitaeniatus*. Abreviações das espécies de parasitos: A.bi = *A. bicuspidatus*; A.co = *A. contortus*; A.do = *Anacanthorus douradensis*; A.sp. 1 = *Anacanthorus* sp. 1; A.sp. 2 = *Anacanthorus* sp. 2; A.pe = *Anacanthorus penilabiatus*; A.sp. 3 = *Anacanthorus* sp. 3; A.sp. 4 = *Anacanthorus* sp. 4; A.sp. 5 = *Anacanthorus* sp. 5; A.sp. 6 = *Anacanthorus* sp. 6; A.sp. 7 = *Anacanthorus* sp. 7; A.sp. 8 = *Anacanthorus* sp. 8.

No ParaFitLink 1 os *links* individuais entre as espécies de parasitos e seus hospedeiros (Tabela 4) indicaram que apenas três associações entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros não se tratam de eventos de coespeciação, *A. penilabiatus* com *Piaractus mesopotamicus* ($p = 0,0237$), *Anacanthorus* sp. 8 com *Erythrinus erythrinus* ($p = 0,0128$) e *Anacanthorus* sp. 3 com *H. malabaricus* ($p = 0,0185$). De maneira geral, não houve consenso entre os resultados de PACo e ParaFit para eventos de coespeciação individuais entre parasito hospedeiro, sendo que apenas as associações entre *A. douradensis* a *S. brasiliensis*, e *Anacanthorus* sp. 4 e sp. 5 a *H. unitaeniatus* foram estatisticamente suportadas em ambas as análises.

Tabela 4. Resultados do ParaFitLink 1 para associações coevolutivas individuais entre as espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros coletados no rio Paraná e afluentes entre os anos de 2012 a 2015. As probabilidades foram calculadas após 9999 permutações aleatórias. Valores de p significativos $\leq 0,01$.

Espécies de hospedeiros	Espécies de parasitos	p
<i>Salminus brasiliensis</i>	<i>Anacanthorus douradensis</i>	0,0001
<i>Salminus brasiliensis</i>	<i>Anacanthorus bicuspidatus</i>	0,0001
<i>Salminus brasiliensis</i>	<i>Anacanthorus contortus</i>	0,0001
<i>Salminus hilarii</i>	<i>Anacanthorus bicuspidatus</i>	0,0001
<i>Salminus hilarii</i>	<i>Anacanthorus contortus</i>	0,0001
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	0,0237 ^{ns}
<i>Metynnis lippincottianus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 6	0,0067
<i>Metynnis lippincottianus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 7	0,0079
<i>Serrasalmus maculatus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 1	0,0083
<i>Serrasalmus maculatus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 2	0,0079
<i>Hoplias malabaricus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 3	0,0185 ^{ns}
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 4	0,0102
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 5	0,0101
<i>Erythrinus erythrinus</i>	<i>Anacanthorus</i> sp. 8	0,0128 ^{ns}

ns= valores não significativos

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Análise genética e filogenética

Tanto COI quanto ITS, têm sido amplamente utilizados em estudos moleculares e filogenéticos com monogenéticos (SICARD et al., 2001; ZIETARA et al., 2008; SCHELKLE et al., 2011; SHI et al., 2014; MENDLOVÁ e ŠIMKOVÁ, 2014 e VANHOVE et al., 2015). Tendo como principais vantagens a fácil amplificação e a alta variabilidade interespecífica, com taxas evolutivas rápidas (LUTON et al., 1992; BUENO-SILVA, 2012; KRESS e ERICKSON, 2008). No entanto, taxas evolutivas muito variáveis pode ser também uma desvantagem (VAWTER e BROWN, 1986; PERKINS et al., 2011), dificultando o alinhamento das sequências bem como na análise filogenética em grandes grupos, como Famílias e Ordens (SPRINGER et al., 2001).

À distância p mínima interespecífica para o COI entre as espécies de *Anacanthorus* foi de 14%. Resultados similares foram encontrados em estudos com o COI de três populações do monogenético *Benedenia seriola* Yamaguti, 1934, sendo que a distância genética entre indivíduos de diferentes populações foi de 14% (SEPÚLVEDA e GONZALEZ, 2014). Já em outro estudo populacional de *Gotocotyla sawara* Ishii, 1936 foi observado que a divergência entre o COI de diferentes populações ficou entre 0,13% e 3,65% (SHI et al., 2014). Para os monogenéticos *Urocleidoides malabaricus* e *U. cuiabai* Rosim, Mendoza-Franco e Luque, 2011 parasitos de peixes dulcícolas no Brasil (GASQUES et al., 2015) foram encontradas Distâncias p acima de 20%. Os resultados do presente estudo juntamente com os dos estudos citados acima mostram que o COI tem sido eficiente na separação de espécies de monogenéticos bem como para encontrar espécies crípticas.

Trabalhos com marcadores nucleares em monogenéticos têm evidenciado que o ITS1 é mais variável que o ITS2 (DESDEVISES et al., 2000; ZIETARA e LUMME, 2002; COLEMAN, 2003; POISOT et al., 2011; SCHELKLE et al., 2011) e a região 5.8S que fica

entre estes dois genes é altamente conservada, sendo utilizada inclusive para desenvolvimento de *primers* (COLEMAN, 2003). A alta variabilidade encontrada no ITS1 e mesmo no ITS2 em monogenéticos pode ter relação direta com um processo de especiação antigo, e também a taxas de mutações muito rápidas nestes genes (DESDEVISES et al., 2000).

No presente estudo, foi observado que o ITS1 foi mais variável que o ITS2 entre as espécies de *Anacanthorus*, dificultando assim, o alinhamento das sequências. Já a região 5.8S, se mostrou bem conservada, e praticamente idêntica entre as diferentes espécies de parasitos, impossibilitando a separação específica. Estas distintas características entre estes genes possibilitaram que os mesmos juntos se tornassem mais informativos que separadamente, e por isso foram concatenados.

Estudos moleculares com espécies de monogenéticos *Ligophorus* encontraram divergências genéticas de até 39% para o ITS1 e 13% para o 28S (BLASCO-COSTA et al., 2012). Por outro lado, análises dos genes 18S e ITS1 de espécies de monogenéticos *Dactylogyrus* verificaram que houve variações nucleotídicas somente para a região ITS1, sendo a região 18S altamente conservada (ŠIMKOVÁ et al., 2007).

Em espécies de *Gyrodactylus* foram encontradas variações de 18,5% a 35,8% nas distâncias *p* para o ITS 2 (GILMORE et al., 2012). Resultados similares foram encontrados no presente estudo, sendo que as distâncias *p* entre as espécies de *Anacanthorus* variaram de 6% a 32% para o ITS. Desta forma, a alta variabilidade encontrada para os marcadores moleculares ITS1 e mesmo ITS2 parece ser comum entre espécies de alguns gêneros de monogenéticos.

Embora os marcadores nucleares ITS sejam bastante utilizados em estudos filogenéticos, e mesmo para distinção de espécies (MATEJUSOVA et al., 2001; PALADINI et al., 2011; MENDLOVA et al., 2012; KING et al., 2013; KING et al., 2014) ainda não há consenso entre os pesquisadores se estes marcadores são os mais adequados para este

propósito. Por exemplo, Vanhove et al. (2013) propôs que a região 28S ribossomal fosse utilizada como DNA *barcodes* para monogenéticos, ao invés da região ITS, sendo este de fácil alinhamento, com variações intra e interespecíficas, e principalmente, devido as dificuldades no alinhamento na região do ITS1. Já Coleman (2003) considerou o ITS2 é pouco explorado em estudos genéticos, sendo que, este marcador molecular pode fornecer informações filogenéticas para níveis taxonômicos ainda mais profundos.

Estudos filogenéticos com espécies *Ligophorus* obtiveram melhor suporte para os ramos das árvores com o ITS 1 do que com o 28S (BLASCO-COSTA et al., 2012). Porém outros trabalhos têm mostrado que as reconstruções filogenéticas com ITS2 têm resultados similares, as reconstruções feitas com marcadores nucleares mais conservados como o 18S (GILMORE et al., 2001). Os resultados obtidos no presente estudo reforçam que os genes utilizados aparentemente foram eficientes na separação das 12 espécies de *Anacanthorus* bem como nas reconstruções filogenéticas do grupo.

3.4.2 Análises de Coespeciação

Tanto PACo quanto ParaFit suportaram a hipótese de associação global de coespeciação entre as espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros. Os *links* individuais entre as espécies de *Anacanthorus* e suas espécies hospedeiras também tiveram associações evolutivas suportadas estatisticamente, sendo que a análise dos resíduos quadrados no PACo apontou quatro associações coevolutivas das 14 existentes, e o ParaFitLink1 indicou apenas 11.

Quando analisada a topologia das árvores filogenéticas espelhadas pode-se sugerir três possíveis vias de especiação das espécies de *Anacanthorus*: a coespeciação, duplicação e a duplicação seguida de transferência horizontal. Embora, os indícios de coespeciação sejam fortes, as topologias das árvores filogenéticas dos parasitos e hospedeiros não foram totalmente congruentes. O que pode ter ocorrido devido a outros eventos de especiação como a duplicação, extinção ou perda da linhagem do parasito e em algumas vezes por

transferências horizontais (DESDEVISES et. al., 2002). A coespeciação entre parasitos e seus hospedeiros ocorre principalmente, quando estes estão em alopatria (DESDEVISES et al., 2002) e casos desta associação evolutiva são esperados dentro de famílias, gêneros e espécies de hospedeiros (BOEGER e KRITSKY, 1997).

Estudos coevolutivos com espécies de monogenéticos pertencentes a *Lamellodiscus* e a *Ligophorus* parasitos de peixes no Mar Mediterrâneo e Negro, observaram que a diversificação destas espécies de parasitos ocorreu por eventos de duplicação, perda de linhagem ou extinção e por transferências horizontais, não encontrando associações gerais de coespeciação entre as filogenias dos parasitos e seus hospedeiros (DESDEVISES et al., 2002; BLASCO-COSTA et al., 2012). Já para espécies de monogenéticos pertencentes a *Thaparocleidus* a duplicação foi considerada o evento de especiação mais frequente em espécies de peixes *Pangasius* na Ásia (ŠIMKOVÁ et al., 2013).

A duplicação aparentemente é o evento coevolutivo mais comum em monogenéticos congêneres em peixes dulcícolas. Isto pode acontecer, frente à dificuldade na dispersão destes parasitos para outras espécies, devido à alta especificidade ao hospedeiro (ŠIMKOVÁ et al., 2013). Ou mesmo, devido à complexidade do microhabitat branquial como proposto por Blasco-Costa et al. (2012) para as possíveis duplicações em *Ligophorus*. Neste caso, os monogenéticos teriam que se adaptar frente às diferentes condições (fluxo d'água e oxigênio) encontradas nas brânquias, para colonizar os microhabitats (KADLEC et al., 2003), o que possivelmente levaria as duplicações.

Em *Anacanthorus* foram observados três eventos de especiação via duplicação sendo este aparentemente o evento mais comum entre estes parasitos. Este tipo de especiação, possivelmente resultou nas espécies *Anacanthorus* sp. 1 e *Anacanthorus* sp. 2 associadas a *Serrasalmus maculatus*, *Anacanthorus* sp. 4 e *Anacanthorus* sp. 5 associada a *Hoplerythrinus unitaeniatus*. E por fim, a duplicação de *Anacanthorus* sp. 6 e *Anacanthorus* sp. 7 associadas

a *Metynnis lippincottianus*. Espécies congêneres supostamente derivadas de uma duplicação seriam menos competitivas entre si, considerando o tempo de coexistência em um mesmo hospedeiro. Desta forma, pode-se dizer que a competição entre monogenéticos congêneres é praticamente inexistente, principalmente devido: à restrição de nicho, o isolamento reprodutivo e a especialização das estruturas de fixação (ROHDE, 1979 e 1991; ŠIMKOVÁ et al., 2000).

A transferência horizontal pode ser considerada um evento menos parcimonioso que a coespeciação e a duplicação (DESDEVISES et al., 2002), principalmente devido a competição com espécies de parasitos já estabelecidas, e as próprias defesas do sistema imunológico deste novo hospedeiro (ARAÚJO et al., 2015). No entanto, incongruências entre as árvores dos parasitos e seus hospedeiros, são geralmente justificadas pelo alto número de transferências horizontais (LEI e OLIVAL, 2014).

Estudos coevolutivos com diferentes grupos de parasitos (esporídeos, vespas e monogenéticos) e seus hospedeiros (aves, mamíferos e peixes) têm demonstrado que transferências horizontais são eventos aparentemente comuns (DESDEVISES et al., 2002; ZIETARA e LUMME, 2002; RICKLEFS et al., 2004; BLASCO-COSTA et al., 2012; DENG et al., 2013; SANTIAGO-ALARCON et al., 2014; HAHN et al., 2015). Porém, em outros estudos com ciclídeos e seus monogenéticos *Cichlidogyrus* (VANHOVE et al., 2015) e com espécies de bactérias *Bartonella* e seus hospedeiros mamíferos (LEI e OLIVAL, 2014), mostraram que em alguns casos as transferências horizontais são associações raras entre parasitos e hospedeiros.

No presente estudo, o único evento de duplicação seguida de transferência horizontal ocorreu entre espécies de *Salminus*, sendo que, estes hospedeiros compartilharam *Anacanthorus contortus* e *A. bicuspidatus*. Outros estudos com monogenéticos parasitos de peixes (ŠIMKOVÁ et al., 2004) e com esporídeos parasitos de aves (SANTIAGO-

ALÁRCON et al., 2014) tem mostrado que transferências horizontais são mais comuns entre espécies de hospedeiros congêneres. Resultado similar ao encontrado no presente estudo. Transferências horizontais entre hospedeiros congêneres provavelmente não levam a especiação dos parasitos, pois os novos hospedeiros não representam um novo recurso, por estar relacionado filogeneticamente com o hospedeiro de origem (JACSON, 1999; AGOSTA e KLEMENS, 2008).

A coespeciação, duplicação e a transferência horizontal podem estar ocorrendo com outras espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros em diferentes bacias hidrográficas do Brasil, o que fica mais evidente com estudos que registraram mais de uma espécie destes parasitos em uma mesma espécie de hospedeiro (TAKEMOTO et al., 2009; COHEN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013; LEÃO et al., 2015; MONTEIRO et al., 2015), ou ainda, a ocorrência de uma espécie de *Anacanthorus* igual a que ocorre em outras espécies de hospedeiros do mesmo gênero como pode ser observado na lista de espécies elaborada por Cohen et al. (2013).

Sendo assim, a hipótese mais provável, é que estes parasitos, sofreram coespeciação quando o hospedeiro passou por mudanças genéticas, fisiológicas, morfológicas significativas formando um novo gênero. Os resultados obtidos também apontaram que são duas as possíveis vias de especiação em *Anacanthorus* a duplicação e a coespeciação. No caso da transferência horizontal entre as espécies de *Salminus* acredita-se que tenha ocorrido como um recurso do parasito para sobrevivência, ocupando diferentes espécies de hospedeiros com características biológicas muito parecidas. O que pode ser explicado também pelo conceito de filtro (contato e compatibilidade) (EUZET e COMBES, 1980). Sendo que primeiramente o parasito teve a possibilidade de encontrar o hospedeiro em potencial (contato), e este hospedeiro forneceu as condições adequadas para a sobrevivência do parasito (compatibilidade).

A falta de estudos taxonômicos com estes parasitos na região dificultou o entendimento das relações evolutivas parasito/hospedeiro, visto que, 8 das 12 espécies de parasitos estudadas possivelmente são novas para a ciência. Sendo assim, não se sabe se elas ocorrem em outras espécies de peixes do mesmo gênero ou não, o que possibilitaria o aumento de interpretações de possíveis eventos coevolutivos como: coespeciação, duplicações e transferências horizontais.

3.5 CONCLUSÕES

Com o presente estudo de coespeciação pode-se verificar que a relação de especificidade e especiação dos *Anacanthorus* com eritrídeos, serrasalmídeos e briconídeos no alto rio Paraná e afluentes se deu por processos coevolutivos: a coespeciação e a duplicação. Sendo a duplicação uma importante via de especiação destes parasitos dentro das espécies de hospedeiros, já a transferência horizontal aparentemente não levou estes parasitos à especiar, uma vez que, só ocorreu entre hospedeiros do mesmo gênero. Com este estudo também foi possível verificar que as espécies de *Anacanthorus* presentes em hospedeiros próximos geneticamente, ou em uma mesma espécie de hospedeiro formam clados irmãos, sendo este um grande indicio de coespeciação, que foi confirmado também com as análises estatísticas utilizadas.

No entanto, os resultados obtidos, podem ser apenas uma representação local das possíveis vias de especiação de *Anacanthorus* na América Sul. Sendo assim, é incentivado mais estudos com outras espécies destes parasitos e seus hospedeiros em outras regiões do continente, para um maior entendimento da evolução deste que é um dos maiores gêneros em número de espécies de monogenéticos no continente Americano.

REFERÊNCIAS

- Araújo SBL, Braga MP, Brooks DR, Agosta SJ, Hoberg EP, von Hartenthal FW, Boeger WA. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PLoS One* 2015; 10(10): e0139225.
- Agosta SJ, Klemens JA. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters* 2008;11: 1123–1134.
- Balbuena JA, Míguez-Lozano R, Blasco-Costa I. PACo: A novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PLoS One* 2013;8(4): e61048.
- Blasco-Costa I, Míguez-Lozano R, Sarabeev V, Balbuena JA. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae. *Parasitology International* 2012;61: 619–627.
- Boeger WA, Kritsky DC. Coevolution of the Monogenoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. *International Journal for Parasitology* 1997; 27(12): 1495–1511.
- Bonett MR, Steffen MAA, Trujano-Alvarez L, Martin SD, Bursey CR, McAllister CT. Distribution, abundance, and genetic diversity of *Clinostomum* spp. metacercariae (Trematoda: Digenea) in a modified ozark stream system. *Journal of Parasitology* 2011;97(2): 177–184.
- Braga MP, Araújo SBL, Boeger WA. Patterns of interaction between Neotropical freshwater fishes and their gill Monogenoidea (Platyhelminthes). *Parasitology Research* 2014;113: 481–490.
- Brandão H, Yamada FH, Toledo, GM, Carvalho, ED, Silva, RJ. Monogeneans (Dactylogyridae) parasitizing gills of *Salminus hilarii* from a Neotropical reservoir, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Jaboticabal* 2013;22(4): 579-58.

- Brooks DR. Testing the Context and Extent of Host-Parasite Coevolution. *Systematic Biology* 1979;28(3): 299-307.
- Brooks DR. Historical ecology: a new approach to studying the evolution of ecological associations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1985;72: 660–680.
- Brooks DR, McLennan DA. *Parascript: parasites and the language of evolution*. Washington, DC: Smithsonian Inst. Press; 1993.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro Série livros 23: Museu Nacional; 2007, p. 195.
- Bueno-Silva M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estudos de Biologia* 2012;34(421): 157-163.
- Cohen SC, Kohn A, Boeger WA. Neotropical Monogenoidea. 57. Nine new species of Dactylogyridae (Monogenoidea) from the gill of *Salminus brasiliensis* (Characidae, Characiformes) from the Paraná River, State of Paraná, Brazil. *Zootaxa* 2012; 3049: 57-68.
- Cohen SC, Justo MCN, Kohn A. South American Monogenoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles. Rio de Janeiro: Ed. Oficina de Livros; 2013, 663p.
- Coleman AW. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genetics* 2003;19: 370–375.
- Cone DK, Burt MDB. The host specificity of *Urocleidus adspectus* (Mueller, 1938) (Monogenea:Ancyrocephalinae). *Journal of Parasitology* 1982;75: 702-706.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012;9: 772.
- Deng J, Yu F, Li HB, Gebiola M, Desdevises Y, Wu SA, Zhang YZ. Cophylogenetic relationships between *Anicetus* parasitoids (Hymenoptera:Encyrtidae) and their scale insect hosts (Hemiptera Coccidae). *BMC Evolution Biology* 2013;13: 275.

- Desdevises Y. Cophylogeny: insights from fish-parasite systems. *Parassitologia* 2007;49: 125-128.
- Desdevises Y, Jovelín R, Jousson O, Morand S. Comparison of ribosomal DNA sequences of *Lamellodiscus* spp. (Monogenea, Diplectanidae) parasitising *Pagellus* (Sparidae, Teleostei) in the north Mediterranean Sea: species divergence and coevolutionary interactions. *International Journal for Parasitology* 2000;30: 741–746.
- Desdevises Y, Morand S, Legendre, P. Evolution and determinants of host specificity in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). *Biological Journal of the Linnean Society* 2002;77: 431–443.
- Desdevises Y, Morand S, Jousson O, Legendre P. Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): The study of a complex host–parasite system. *Evolution* 2002;56:2459–2471.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST1.7. *Molecular Biology and Evolution* 2012;29(8): 1969–1973.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 2004;32(5): 1792-1797.
- Eschmeyer WN, Fricke R. Catalog of fishes: Genera, Species, References. 2015. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
- Acessado em 01/11/2015.
- Euzet L, Combes C. Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. In *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*. Tome III, C. Boquet, J. Genermont, and M. Lamotte (eds.). Mémoires de la Société Zoologique Française 1980;40: 239–285.
- Gasques LS, Graça RJ, Prioli SMAP, Takemoto RM, Prioli AJ. Molecular characterization of *Urocleidoides cuiabai* and *U. malabaricus* (Monogenea: Dactylogyridae) from the trahira fish *Hoplias aff. malabaricus* in the Paraná River, Brazil. *Journal of Helminthology* 2015;1-5.

- Gilmore SR, Cone DK, Lowe G, King SF, Jones SRM, Abbott CL. Molecular phylogeny of *Gyrodactylus* (Monogenea) parasitizing fishes in fresh water, estuarine, and marine habitats in Canada. *Canadian Journal of Zoology* 2012;90: 776-786.
- Graça WF, Pavanelli CS. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM; 2007, 241p.
- Graça RJ, Ueda BH, Oda FH, Takemoto, RM. Monogenea (Platyhelminthes) parasites from the gills of *Hoplias aff.malabaricus* (Bloch, 1974) (Pisces: Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain, states of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 2013;9(6): 1484-1487.
- Hafner MS, Nadler AS. Phylogenetic trees support the co-evolution of parasites and their hosts. *Nature* 1988;332: 258-259.
- Hahn C, Weiss SJ, Stojanovski S, Bachmann L. Co-Speciation of the ectoparasite *Gyrodactylus teuchis* (Monogenea, Platyhelminthes) and Its salmonid hosts. *PLoS One* 2015;10(6): e0127340.
- Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999;41: 95–98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes.Proceedings. *Biological Sciences /The Royal Society* 2003; 270(1512): 313-321.
- Huyse T, Volckaert F. Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from goby to goby. *Systematic Biology* 2005;54: 710–718.
- Jackson JA. Analysis of parasite host-switching: limitations on the use of phylogenies. *Parasitology* 1999;119: 111–123.
- Kadlec D, Šimková A, Gelhar M. The microhabitat distribution of two *Dactylogyrus* species parasitizing the gills of the barbel, *Barbus barbus*. *Journal Helminthology* 2003;77:317-325.

- Kearn GC. Evolutionary expansion of the Monogenea. *International Journal for Parasitology* 1994;24: 1227–1271.
- Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(8): 2761–2762.
- Kritsky DC, Thatcher VE, Kayton RJ. Neotropical Monogenoidea 2. The Anacanthorinae Price, 1965, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 from Amazonian fishes. *Acta Amazonica* 1979;9: 355–361.
- Lambert A, Gharbi SEL. Monogenean host specificity as a biological and taxonomic indicator for fish. *Biological Conservation* 1995;72: 227–235.
- Leão MSL, São Clemente SC, Cohen SC. *Anacanthorus toledoensis* n. sp. and *Mymarothecium ianwhittingtoni* n. sp. (Dactylogyridae: Monogenoidea) Parasitizing Cage-Reared *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes, Characidae) in the State of Paraná, Brazil. *Comparative Parasitology* 2015;82(2): 269–274.
- Lei BR, Olival KJ. “Contrasting Patterns in Mammal–Bacteria Coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in Bats and Rodents”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014;8(3): e2738.
- Legendre P, Desdevises Y, Bazin E. A statistical test for host-parasite coevolution. *Systematic Biology* 2002;51: 217–234.
- Lizama MAP, Takemoto RM, Ranzani-Paiva MJT, Ayroza LMS, Pavanelli GC. Relação parasito hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 2007;29(4): 437–445.
- Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992;56: 323–328.

- Matejusova I, Koubkova B, D'Amelio S, Cunningham CO. Genetic characterization of six species of diplozoids (Monogenea; Diplozoidae). *Parasitology* 2001; 123:465–474.
- Mendlová M, Desdevises Y, Civaňová K, Pariselle A, Šimková A. Monogeneans of West African cichlid fish: evolution and cophylogenetic interactions. *PLoS One* 2012;7(5): e37268
- Mendlová M, Šimková A. Evolution of host specificity in monogeneans parasitizing African cichlid fish. *Parasites & Vectors* 2014;7(69): 1-14.
- Mizelle JD, Price CE. Studies on monogenetic trematodes. XXVII. Gill parasites of the piranha with the proposal of *Anacanthorus* gen. n. *The Journal of Parasitology* 1965;51: 30-36.
- Monteiro CM, Kritsky DC, Brasil-Sato MC. Neotropical Monogenoidea. 56. New species of *Anacanthorus* (Dactylogyridae) from the gills of matrinhã, *Brycon orthotaenia* (Characiformes: Characidae), in the Rio São Francisco, Brazil. *Folia Parasitologia* 2010;57 (3): 164-8.
- Monteiro CM, Cohen SC, Brasil-Sato MC. New species and reports of dactylogyrids (Monogenoidea) from *Salminus franciscanus* (Actinopterygii: Bryconidae) from the upper São Francisco River, Brazil. *Zootaxa* 2015;3941(1): 137–143.
- Noble ER, Noble GA, Schad GA, Macinnes AJ. *Parasitology. The biology of animal parasites*. 6th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1989, 584p.
- Page RDM, Charleston MA. Trees within trees: Phylogeny and historical associations. *Trends Ecology and Evolution* 1998;13: 356–359.
- Paladini G, Hansen H, Fioravanti ML, Shinn AP. *Gyrodactylus longipes* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) from the Mediterranean. *Parasitology International* 2011;60: 410–418.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics evolution in R language. *Bioinformatics* 2004; 20:289–290

- Paterson AM, Gray RD. Host–parasite co-speciation, host switching, and missing the boat, in *Host–Parasite Evolution: General Principles and Avian Models* (Clayton, D.H. and Moore, J., eds), Oxford University Press; 1997.
- Perkins SL, Martinsen ES, Falk BG. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology* 2011;138(13): 1664-1674.
- Poisot T, Verneau O, Desdevises Y. Morphological and Molecular Evolution Are Not Linked in *Lamellodiscus* (Platyhelminthes, Monogenea). *PLoS One* 2011;6(10): e26252.
- Poulin R. Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *International Journal for Parasitology* 1992;22: 753 - 758.
- Rambaut A, Drummond AJ. TreeAnnotator v1.6.1. 2002-2010. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>. Acessado em agosto de 2015.
- Rambaut A. Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.2. 2006-2014. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. Acessado em agosto de 2015.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. Tracer v1.6. 2014. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Acessado em agosto de 2015.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2015. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em setembro de 2015.
- Ricklefs RE, Fallon SM, Bermingham E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology* 2004;53: 111–119.
- Rodhe K. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. *The American Naturalist* 1979; 114: 648-671.
- Rohde K. Intra- and interspecific interactions in low density populations in resource-rich habitats. *Oikos* 1991;60: 91-104.

- Ronquist, F. Reconstructing the history of host-parasite associations using generalized parsimony. *Cladistics* 1996;11: 73-89.
- Ronquist F. Parsimony analysis of coevolving species associations. *In: Co-speciation*. Chicago: Chicago University Press; 2002, 22–64 p.
- Ronquist F, Nylin S. Process and pattern in the evolution of species associations. *Systematic Zoology* 1990;39: 323-344.
- Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research* 1993;21(1): 173-174.
- Santiago-Alarcon D, Rodríguez-Ferraro A, Parker PG, Ricklefs R. Different meal, same flavor: cospeciation and host switching of haemosporidian parasites in some non-passerine birds. *Parasites & Vectors* 2014;7(286): 1-9.
- Schelkle B, Paladini G, Shinn AP, King S, Johnson M, van Oosterhout C, Mohammed RS, Cable J. *Ieredactylus rivuli* gen. et sp. nov. (Monogenea, Gyrodactylidae) from *Rivulus hartii* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in Trinidad. *Acta Parasitologica* 2011;56(4): 360–370.
- Sepúlveda FA, González MT. Molecular and morphological analyses reveal that the pathogen *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae) is a complex species: Implications for yellowtail *Seriola* spp. aquaculture. *Aquaculture* 2014;418(419): 94-100.
- Shi S, Li M, Yan S, Wang M, Yang C, Lun Z, Brown CL, Yang T. Phylogeography and demographic history of *Gotocotyla sawara* (Monogenea: Gotocotylidae) on japanese spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) along the coast of china. *Journal Parasitology* 2014;100(1): 85–92.
- Sicard M, Desmarais E, Lambert A. Molecular characterisation of Diplozoidae populations on five Cyprinidae species: Consequences for host specificity. *Comptes-Rendus de l' Academie des Sciences Série III—Sciences de la Vie-Life Sciences* 2001; 324:709–717.

- Šimková A, Desdevise Y, Gelnar M, Morand S. “Co-existence of nine gill ectoparasites (*Dactylogyrus*: Monogenea) parasitising the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology”. *International Journal for Parasitology* 2000;30(10): 1077–1088.
- Šimková A, Morand S, Jobet E, Gelnar M, Verneau O. Molecular phylogeny of con-generic monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation. *Evolution* 2004;58: 1001–18.
- Šimková A, Verneau O, Gelnar M, Morand S. Specificity and specialization of congeneric monogeneans parasitizing cyprinid fish. *Evolution* 2006;60(5): 1023–1037.
- Šimková A, Pečínková M, Řehulková E, Vyskočilová M, Ondračková M. *Dactylogyrus* species parasitizing European *Barbus* species: morphometric and molecular variability. *Parasitology* 2007;134: 1751-1765.
- Šimková A, Serbielle C, Pariselle A, Vanhove MPM, Morand S. “Speciation in *Thaparocleidus* (Monogenea: Dactylogyridae) Parasitizing Asian Pangasiid Catfishes,” *BioMed Research International* 2013; 1-14.
- Springer MS, DeBry RW, Douady C, Amrine HM, Madsen O, de Jong WW, Stanhope MJ. Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Molecular Biology and Evolution* 2001;18(2): 132-143.
- Takemoto RM, Pavanelli GC, Lizama MAP, Lacerda ACF, Yamada FH, Moreira LHA, Ceschini TL, Bellay S. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazilian Journal Biology* 2009;69(2): 691-705.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725–9.
- Thatcher, V. E. Amazon fish parasites. Sofia: Pensoft; 2006, 508p.
- Van Every LR, Kritsky DC. Neotropical Monogenoidea. *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) of piranha (Characoidea, Serrasalminidae) from the

Central Amazon, their phylogeny, and aspects of host-parasite coevolution. *Journal Helminthology Society of Washington* 1992;59(1): 52-75.

Vanhove MPM, Tessen B, Schoelink C, Jondelius U, Littlewood DTJ, Artois T, Huyse T. Problematic barcoding in flatworms: a case study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *Zookeys* 2013;365: 355–379.

Vanhove MPM, Pariselle A, Van Steenberge M, Raeymaekers JAM, Hablützel PI, Gillardin C, Hellemans B, Breman FC, Koblmüller S, Sturmbauer C, Snoeks J, Volckaert FAM, Huyse T. Hidden biodiversity in an ancient lake: phylogenetic congruence between Lake Tanganyika tropheine cichlids and their monogenean flatworm parasites. *Scientific reports* 2015;5: 13669.

Vawter L, Brown WM. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 1986;234(4773): 194-196.

Vilas R, Criscione CD, Blouin MS. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 2005;121: 839–846.

Zietara MS, Lumme J. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Evolution* 2002;56: 2445–2458.


Zietara MS, Kuusela J, Veselov A, Lumme J. Molecular faunistics of accidental infections of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea) parasitic on salmon *Salmo salar* L. and brown trout *Salmo trutta* L. in NW Russia. *Systematic Parasitology* 2008;69: 123–135.

4. CONCLUSÕES GERAIS

A filogenética molecular tem contribuído com novas informações sobre as relações de parentesco entre os grupos de parasitos bem como na identificação das espécies, estudos populacionais, biogeográficos e coevolutivos. Porém, a filogenia molecular esta longe em resolver todos os problemas taxonômicos e filogenéticos na Ictioparasitologia, e desta forma, aconselhamos a utilização desta ferramenta sempre que possível e se fizer necessário no teste de hipóteses em conjunto com informações morfológicas. Também é aconselhada a utilização de mais de um gene, o que torna mais confiável as reconstruções filogenéticas, esboçando as taxas evolutivas do organismo e não somente de um gene isoladamente.


Com o presente estudo pode-se verificar também que a relação de especificidade e especiação dos monogenéticos pertencentes a *Anacanthorus* com seus hospedeiros no alto rio Paraná e afluentes se deu por processos coevolutivos, como a coespeciação e a duplicação. No entanto, os resultados obtidos, podem ser apenas uma representação local das possíveis vias de especiação de *Anacanthorus* na América Sul. Sendo assim, é incentivado mais estudos com outras espécies destes parasitos e seus hospedeiros em outras regiões do continente, para um maior entendimento da evolução deste que é um dos maiores gêneros em número de espécies de monogenéticos no continente Americano.

Anexo II




[plos.org](#)[create account](#)[sign in](#)

[Publish](#)[About](#)[Browse](#)



advanced search

Submission Guidelines

 Read the Chinese translation of the PLOS policies referred to in this page. [PLOS编辑与出版规定](#)

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use any standard font and a standard font size.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout	<p>Manuscript text should be double-spaced.</p> <p>Do not format text in multiple columns.</p>
Page and line numbers	<p>Include page numbers and line numbers in the manuscript file.</p>
Footnotes	<p>Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.</p>
Language	<p>Manuscripts must be submitted in English.</p> <p>You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.</p>
Abbreviations	<p>Define abbreviations upon first appearance in the text.</p> <p>Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.</p> <p>Keep abbreviations to a minimum.</p>
Reference style	<p>PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references.</p> <p>See reference formatting examples and additional instructions below.</p>
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	<p>Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013. Database: figshare [Internet]. Accessed: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214.</p>
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	<p>Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.</p>

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section	<p><i>The following elements are required, in order:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript ➤ Abstract ➤ Introduction
Middle section	<p><i>The following elements can be renamed as needed and presented in any order:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Materials and Methods ➤ Results ➤ Discussion ➤ Conclusions (optional)

Ending section	<p><i>The following elements are required, in order:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Acknowledgments ➤ References ➤ Supporting information captions (if applicable)
Other elements	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately. ➤ Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited. ➤ Supporting information files are uploaded separately.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	<p>Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: <i>A Caenorhabditis elegans</i> Model</p> <p>Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial</p>
Short title	50 characters	State the topic of the study	<p>Cigarette Smoke Exposure and Innate Immunity</p> <p>SODIS and Childhood Diarrhoea</p>

Titles should be written in title case (all words capitalized except articles, prepositions, and conjunctions). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005</p> <p><i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.</i></p>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "In press" for page numbers or DOI.

Web sites or online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14 .
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis</i> . 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1 . Accessed 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 29 Jan 2014. Available: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html . Accessed 17 March 2014.
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available: http://cuminad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09

Equations

We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable.

Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., " $a^2 + b^2 = c^2$ "), Greek or other symbols (e.g., β , Δ , or ' prime '), or mathematical operators (e.g., \times , \geq , or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Nomenclature

Use correct and established nomenclature wherever possible.

Units of measurement

Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. [Read more about SI units](#).

Drugs

Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

Species names

Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles

Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).