

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA ANIMAL

TESE

**Estudo morfológico e molecular de *Anacanthorus* spp.
(Monogenea: Dactylogyridae) parasitando peixes
serrasalmídeos (Characiformes) no Brasil**

Juliana Moreira de Oliveira

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Estudo morfológico e molecular de *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) parasitando peixes serrasalmídeos (Characiformes) no Brasil

JULIANA MOREIRA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
José Luis Fernando Luque Alejos

e Co-orientação da Professora
Andrea Vetešniková Šimková

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

O48e Oliveira, Juliana Moreira de, 1991-
Estudo morfológico e molecular de Anacanthorus spp.
(Monogenea: Dactylogyridae) parasitando peixes
serrasalmídeos (Characiformes) no Brasil / Juliana
Moreira de Oliveira. - 2019.
51 f.: il.

Orientador: José Luis Fernando Luque Alejos.
Coorientadora: Andrea Vetešniková Šimková.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Biologia Animal, 2019.

1. Filogenia molecular. 2. Taxonomia. 3.
Anacanthorinae. 4. Serrasalmidae. 5. 28S. I. Luque
Alejos, José Luis Fernando, 1962-, orient. II.
Vetešniková Šimková, Andrea, 1974-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. IV. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

JULIANA MOREIRA DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

TESE APROVADA EM 27/02/2019

José Luis Fernando Luque Alejos. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Simone Chinicz Cohen. Dra. FIOCRUZ

Letícia Gabriela Poblete Vidal. Dra. UFRRJ

Raquel de Oliveira Simões. Dra. UFRRJ

Anderson Dias César. Dr. UNESA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inteiramente à minha mãe Nilza Valeria Moreira, pois sem seu amor e apoio incondicionais jamais chegaria aonde cheguei.

*“A satisfação está no esforço
e não apenas na realização final.”*

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Anuncio minha gratidão e reconhecimento em primeiro lugar a Deus, por me proporcionar o dom da vida, por iluminar meus caminhos e por sempre ter me amparado nos momentos mais difíceis pelos quais passei.

Ao meu orientador Dr. José Luis Fernando Luque Alejos, por ter me deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa desde o Mestrado, e, por ter acreditado nas minhas capacidades, fornecendo a orientação que tornou possível a concretização deste projeto.

A minha co-orientadora Dra. Andrea Vetešniková Šimková, do Instituto de Botânica e Zoologia da Masaryk University (MUNI), República Tcheca, por ter me recebido em seu laboratório e pela co-orientação indispensável à elaboração do capítulo 2.

Ao Dr. Tomáš Scholz, do Instituto de Parasitologia de České Budějovice, República Tcheca, pelo incentivo, auxílio no processamento do material e ensinamentos, fundamentais para a coleta do material utilizado na tese.

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ pela ajuda durante as coletas e exame dos hospedeiros nas bacias do Paraná e Amazônica, e aos professores Emil José Hernández Ruz da UFPA (Altamira), Luiz Eduardo Roland Tavares da UFMS e Ricardo Massato Takemoto da UEM por fornecerem as instalações e auxílio na coleta durante as expedições. Muito Obrigada!

A minha família, por todo amor, apoio e confiança concedidos ao longo da minha vida em especial a minha mãe Nilza Valeria Moreira e a minha irmã Aline Cristina Moreira de Oliveira (futura escritora de sucesso!).

Ao meu noivo Luis Felipe da Silva que sempre me apoiou em todos os momentos e ao nosso filho de quatro patas, Oliver. Vocês despertam o melhor de mim!

Aos amigos de longa data Fabiano Paschoal de Oliveira, Viviane Nunes Telles, e Nathália das Neves Cardoso pela amizade, auxílio e companheirismo nesses anos de convivência.

Aos amigos que o Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ me concedeu, Letícia Vidal, Naraiana Taborda, Iris Soares, Felipe Bisaggio, Carla “maluquete” Juliete e Philippe Vieira Alves por todas as coletas, companheirismo, amizade e por sempre me ajudarem no decorrer do curso. Amo vocês! Um agradecimento especial a Camila Santos Pantoja de Oliveira pela parceria inabalável e desesperos cronometrados desde nosso ingresso ao laboratório. Conseguimos!

Aos colegas da MUNI, especialmente Chahrazed Rahmouni, Michal Benovics e Vadym Krasnovyd, por toda ajuda e por tornarem minha estadia muito mais agradável. Děkuji!

A todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRRJ e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche.

RESUMO

OLIVEIRA, JULIANA MOREIRA DE. **Estudo morfológico e molecular de *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) parasitando peixes serrasalmídeos (Characiformes) no Brasil.** 2019. 69p. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

Com o objetivo de estudar a diversidade e a relação parasito-hospedeiro de *Anacanthorus* spp. parasitos de peixes da família Serrasalimidae, no período entre Outubro de 2015 e Julho de 2016 foram realizados levantamentos parasitológicos de 11 espécies de serrasalmídeos, provenientes de 4 localidades: o Rio Miranda (Mato Grosso do Sul), o Rio Mogi Guaçu (São Paulo), o Alto Rio Paraná (Paraná) e o Rio Xingu (Pará). Os parasitos foram analisados morfolologicamente, e algumas espécies foram sequenciadas geneticamente. Duas espécies novas de *Anacanthorus* foram encontradas e descritas, a primeira nas brânquias de *Serrasalmus maculatus*, e a segunda nas brânquias de *Myloplus schomburgkii*, ambas diferindo de seus congêneros principalmente pela morfologia do complexo copulador. Adicionalmente, novos registros de hospedeiro e geográficos foram fornecidos, juntamente com novas sequências parciais do gene COI mtDNA de espécies de *Anacanthorus*. A posição filogenética de *Anacanthorus* spp. parasitas de peixes serrasalmídeos do Brasil foi investigada com base em novas sequências parciais do gene 28S de espécies de *Anacanthorus* e da espécie *Mymarothecium viatorum*, e sequências de monogenéticos obtidas do GenBank. As análises suportam a monofilia dos anacantoríneos, e as relações filogenéticas entre *Anacanthorus* spp. corresponderam às relações filogenéticas entre as três linhagens principais de Serrasalimidae. A história coevolutiva entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos também foi investigada a fim de elucidar o processo de especiação das espécies de *Anacanthorus* desse sistema parasito-hospedeiro. A filogenia molecular dos serrasalmídeos estudados e de *Anacanthorus* spp. foi reconstruída a partir de sequências parciais dos genes 16S e 28S, respectivamente. A análise baseada em distância rejeitou a hipótese de coespeciação global neste sistema parasito-hospedeiro. O método baseado nas árvores revelou que a história evolutiva do sistema *Anacanthorus*-Serrasalimidae foi conduzida por múltiplos mecanismos de especiação. Coespeciação foi identificada, porém, apenas a níveis mais elevados, como linhagem de hospedeiros e gênero.

Palavras-chave: filogenia molecular, taxonomia, Anacanthorinae, Serrasalimidae.

ABSTRACT

OLIVEIRA, JULIANA MOREIRA DE. **Morphological and molecular study of *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) parasitizing serrasalmid fish (Characiformes) from Brazil.** 2019. 69p. Thesis (Ph.D. in Animal Biology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

With the aim of studying the diversity and the host-parasite association of *Anacanthorus* spp. parasites of fish of the family Serrasalminidae, between October 2015 to July 2016 parasitological surveys of 11 species of serrasalmids, from 4 different localities: the Miranda River (Mato Grosso do Sul), the Mogi Guaçu River (São Paulo), the Upper Paraná River (Paraná) and the Xingu River (Pará). Parasites were analyzed morphologically, and some species were sequenced genetically. Two new species of *Anacanthorus* were found and described, the first from the gills of *Serrasalmus maculatus*, and the second from the gills of *Myloplus schomburgkii*, both differing from its congeners mainly by the morphology of the copulatory complex. Additionally, new hosts and geographical records were provided, together with new partial sequences of the COI mtDNA gene of species of *Anacanthorus*. The phylogenetic position of *Anacanthorus* spp. parasites of serrasalmids fish was investigated based on partial sequences of the 28S gene of species of *Anacanthorus* and of *Mymarothecium viatorum*, and monogenean sequences retrieved from GenBank. The analyses support the monophyly of the anacanthorine, represented by *Anacanthorus* in this study, and the phylogenetic relationships between *Anacanthorus* spp. corresponded to the phylogenetic relationships among the three major lineages of Serrasalminidae. The coevolutionary history between *Anacanthorus* spp. and their serrasalmid hosts was also investigated to elucidate the speciation process of the species of *Anacanthorus* of this host-parasite system. The molecular phylogeny of the studied serrasalmids and of *Anacanthorus* spp. was reconstructed from partial 16S and 28S gene sequences, respectively. The distance-based analysis rejected the hypothesis of global cospeciation in this host-parasite system. The tree-based method revealed that the evolutionary history of the *Anacanthorus*-Serrasalminidae system was driven by multiple mechanisms of speciation. Cospeciation was identified, however, only at higher levels, such as host lineage and genera.

Key words: molecular phylogeny, taxonomy, Anacanthorinae, Serrasalminidae.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Novos registros de hospedeiro e geográficos das espécies de *Anacanthorus* encontradas no presente estudo.....12

Tabela 2. Porcentagem das divergências de pareamento entre as sequências parciais de COI mtDNA de *Anacanthorus* spp. Os números de acesso do GenBank também estão incluídos..14

CAPÍTULO II

Tabela 1. Lista de espécies de Dactylogyridea e Monocotylidea incluídas nas análises filogenéticas. Espécies de hospedeiros, localidades e números de acesso estão incluídos. (AUS – Áustria, AUT – Austrália, BR – Brasil, CH – China, RT – República Tcheca, AL – Alemanha, MX – México, PE – Peru, ES – Eslováquia.....22

CAPÍTULO III

Tabela 1. Lista de espécies de *Anacanthorus* obtidas no presente estudo, com seus respectivos hospedeiros serrasalmídeos e localidades.....33

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figuras 1–6. Estruturas esclerotizadas de *Anacanthorus* spp. **Figs 1–3.** *Anacanthorus* sp. n. 1 de *Serrasalmus maculatus* Kner. **1.** Complexo copulador (vista ventral). **2.** Gancho. **3.** 4A. **Figs 4–6.** *Anacanthorus* sp. n. 2 de *Myloplus schomburgkii* (Jardine & Schomburgk) **4.** Complexo copulador (vista ventral). **5.** Gancho. **6.** 4A.....10

CAPÍTULO II

Figura 1. Árvore filogenética derivada da análise de máxima verossimilhança (MV) de sequências parciais de 28S rDNA de 49 espécies de monogenéticos. Os valores de suporte (bootstrap) da MV são exibidos nos nós. Valores bootstrap < 50 não são relatados. As espécies sequenciadas no presente estudo são exibidas em negrito.....25

Figura 2. Consenso da topologia Bayesiana da análise filogenética de sequências parciais de 28S rDNA de 49 espécies de monogenéticos. Os valores de suporte das probabilidades posteriores da Inferência Bayesiana são exibidos nos nós. Probabilidades posteriores < 0.7 não são relatadas. As espécies sequenciadas no presente estudo são exibidas em negrito.....26

CAPÍTULO III

Figura 1. Árvore de Máxima Verossimilhança inferida a partir de sequências parciais de 28S rDNA de *Anacanthorus* spp. A espécie *Ligistaluridus pricei* (Mueller, 1936) (GenBank AJ969939) foi utilizada como grupo externo. (-) valores de bootstrap abaixo de 50. (*) espécies sequenciadas no presente estudo.....36

Figura. 2. Árvore de Máxima Verossimilhança inferida a partir de sequências parciais de 16S rRNA dos hospedeiros serrasalmídeos. A espécie *Leporinus obtusidens* (Valenciennes) (GenBank KT362311) foi utilizada como grupo externo. (-) valores de bootstrap abaixo de 50. (*) espécies sequenciadas no presente estudo.....37

Figura 3. *Tanglegram* de *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos obtido da comparação da árvore de Máxima Verossimilhança dos parasitos construída utilizando sequências parciais de 28S com a árvore dos hospedeiros resultante da análise filogenética de sequências de 16S. A ilustração do peixe foi obtida de Machado-Allison e Fink (1995) e a ilustração de *Anacanthorus* foi obtida de Van Every e Kritsky (1992).....38

Figura. 4. Uma das 4 possíveis reconstruções cofilogenéticas de *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos geradas pelo Jane. As ramificações pretas (independentes) representam a filogenia do hospedeiro. As ramificações azuis (dependentes) correspondem à filogenia dos parasitos. Os eventos e custos considerados foram coespeciação (0), duplicação (1), duplicação e troca de hospedeiro (2), perda (1) e falha para divergir (1).....39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. Capítulo I. NOVAS ESPÉCIES E REGISTROS DE <i>Anacanthorus</i> (MONOGENEA: DACTYLOGYRIDAE) PARASITANDO PEIXES SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES) EM BACIAS BRASILEIRAS, INCLUINDO DADOS MOLECULARES.	
2.1. RESUMO.....	5
2.2. ABSTRACT.....	6
2.3 INTRODUÇÃO.....	7
2.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.5. RESULTADOS.....	9
2.6. DISCUSSÃO.....	13
3. Capítulo II. POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE <i>Anacanthorus</i> spp. (MONOGENEA) PARASITOS DE SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES) NO BRASIL, DENTRE DACTYLOGYRIDAE.	
3.1. RESUMO.....	16
3.2. ABSTRACT.....	17
3.3 INTRODUÇÃO.....	18
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.5. RESULTADOS.....	24
3.6. DISCUSSÃO.....	27
4. Capítulo III. INTERAÇÕES COFILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES DE <i>Anacanthorus</i> (MONOGENEA: DACTYLOGYRIDAE) E SEUS HOSPEDEIROS SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES).	
4.1. RESUMO.....	30
4.2. ABSTRACT.....	31
4.3 INTRODUÇÃO.....	32
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.5. RESULTADOS.....	36
4.6. DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os monogenéticos são platelmintos hermafroditas altamente diversificados, caracterizados principalmente pela presença do haptor, o aparelho de fixação posterior que geralmente é provido de âncoras e/ou ganchos marginais (PAVANELLI et al., 2002). São organismos pequenos, em geral com menos de 1 mm, mas seu comprimento varia entre cerca de 300 µm podendo chegar a até quase 3 cm, sendo os marinhos geralmente maiores que os de água doce (ROBERTS; JANOVI, 2009; EIRAS et al., 2010). O corpo pode ser dividido em região anterior, que inclui os lóbulos, glândulas e órgãos cefálicos, região medial ou tronco, onde se localizam os órgãos reprodutivos (complexo copulador, vagina, ovário e testículo), pedúnculo, e região posterior, onde se encontra o haptor (MENDOZA-FRANCO, 2009).

Eles são comumente encontrados nas brânquias e órgãos externos de peixes ósseos marinhos e de água doce, e menos frequentemente, representantes desta classe, especialmente da família Polystomatidae Gamble, 1896, são registrados parasitando órgãos internos de outros grupos como anfíbios e répteis (tartarugas dulcícolas) (ver COHEN et al., 2013). Também há diversos registros desses parasitos em peixes cartilagosos (Chondrichthyes), porém apenas 8 (de cerca de 50) famílias de monogenéticos são reportadas regularmente nestes peixes, isto é, Acanthocotylidae Price, 1936, Amphibdellatidae Carus, 1885, Capsalidae Baird, 1853, Chimaericolidae Brinkmann, 1942, Hexabothriidae Price, 1942, Loimoidae Price, 1936, Microbothriidae Price, 1936 and Monocotylidae Taschenberg, 1879 (CRIBB et al., 2002). A espécie *Oculotrema hippopotami* Stunkard, 1924, foi registrada por Stunkard (1924) parasitando o olho do hipopótamo, porém até hoje este é o único registro de um representante do grupo em mamíferos. Espécies do gênero *Isancistrum* Beauchamp, 1912 já foram encontradas em braços, tentáculos e ventosas de cefalópodes no Atlântico Norte (BEAUCHAMP, 1912; LLEWELLYN, 1984).

Quanto ao ciclo de vida, os monogenéticos apresentam um ciclo direto, sem hospedeiros intermediários, que na maioria ovípara, após a liberação dos ovos uma larva ciliada (oncomiracídio) é liberada e infecta um novo hospedeiro (KEARN, 2014). Sua reprodução se dá através de fecundação cruzada (SMYTH; HALTON, 1983). Contudo, os representantes da família Gyrodactylidae Cobbold, 1864 são vivíparos em sua maioria, originando indivíduos similares que infectam novos hospedeiros através do contato direto, às vezes abrigando mais de uma geração de embriões, como uma “boneca russa” (BAKKE et al., 2007).

Geralmente os monogenéticos se alimentam de células epiteliais ou sanguíneas do hospedeiro, e quando presentes em grandes números nas brânquias dos peixes podem levar a diminuição da função respiratória (SMYTH; HALTON, 1983, BOEGER; VIANNA, 2006). Nesse sentido, a espécie *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 foi bastante estudada devido aos seus impactos negativos a populações de peixes salmonídeos no Atlântico Norte e no Mar Branco, tanto de cultivo quanto naturais, e tornou-se uma doença de notificação obrigatória segundo a OIE (*World Organization for Animal Health*), podendo resultar em restrições comerciais para seus hospedeiros (BAKKE et al., 2007; HANSEN et al., 2016).

Dentre os parasitos de peixes, talvez os monogenéticos sejam os mais hospedeiro-específicos, apresentando diferentes níveis de especificidade (espécie, gênero ou família) (ROHDE, 1979; WHITTINGTON et al., 2000). A soma desta característica a sua alta diversidade e ao fato de terem um ciclo de vida direto, levou a vários estudos direcionados a investigação de padrões de coespeciação, que indicaram que os monogenéticos se diversificam principalmente através da troca de hospedeiros (*host-switching*) (DESDEVISES et al., 2002;

PLAISANCE et al., 2005) ou pela especiação intra-hospedeiro (simpátrica) (ŠIMKOVÁ et al., 2004; MENDLOVÁ et al., 2012).

As relações filogenéticas da classe Monogenea vêm sendo amplamente investigadas ao longo dos anos, o que acabou gerando uma série de hipóteses a respeito de sua posição dentro do subfilo Neodermata, seu posicionamento como um grupo monofilético (que inclui todos os descendentes de um ancestral comum) e as inter-relações das famílias compreendidas na classe (BOEGER; KRITSKY, 2001). Estudos baseados em morfologia (EHLERS, 1985 a; BROOKS, 1989; BROOKS; MCLENNAN, 1993; ZAMPARO et al., 2001), no gene 18S rDNA (CAMPOS et al., 1998; LITTLEWOOD; OLSON, 2001) e na combinação dos dois (LITTLEWOOD et al., 1999 a, b), suportam a relação de Monogenea e Cestoda como grupos irmãos (que se originam do mesmo nó). Em contrapartida, estudos baseados em sequências parciais do gene ribossomal 28S rDNA (MOLLARET et al., 1997) e na combinação dos genes 18S rDNA e 28S rDNA completos (LOCKYER et al., 2003) rejeitam o conceito de Cercomeromorpha (Monogenea + Cestoda), porém até o momento a primeira hipótese é a mais difundida (ROBERTS; JANOVY, 2009). Outra grande problemática é o estabelecimento do grupo como monofilético. Análises morfológicas (BROOKS et al., 1985; EHLERS, 1985 a, b, 1986; BROOKS, 1989), baseadas no gene 18S rDNA (CAMPOS et al., 1998), e baseadas na combinação dos caracteres morfológicos com dados moleculares do gene 18S completo (LITTLEWOOD et al., 1999 a) sugerem que a classe seja um grupo monofilético. Porém, apesar dos dados morfológicos e das análises baseadas em marcadores moleculares que suportam a monofilia desta classe, uma série de estudos começou a questionar a validade dessa constatação. Estudos baseados na ultraestrutura do esperma não encontraram nenhuma sinapomorfia para a classe Monogenea (JUSTINE, 1991; JUSTINE, 2001), e em geral as análises com dados moleculares tendem a sugerir que o grupo não é monofilético (BAVERSTOCK et al., 1991; BLAIR, 1993; ROHDE et al., 1995; MOLLARET et al., 1997). Mas embora os dados moleculares geralmente suportem a não monofilia dos monogenéticos, Boeger e Kritsky (2001) ressaltam que as análises moleculares geralmente são baseadas em um número limitado de espécies, não representando a diversidade dos monogenéticos, e, além disso, listaram diversas sinapomorfias morfológicas para os integrantes da classe Monogenea. As inter-relações das famílias da classe Monogenea também foram alvo de muitos estudos baseados em dados morfométricos (BYCHOWSKY, 1957; GUSEV, 1978; JUSTINE, 1991; BOEGER; KRITSKY, 1993) e moleculares (OLSON; LITTLEWOOD, 2002). Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se dedicado a desvendar as relações filogenéticas entre as subfamílias de Dactylogyridae (ŠIMKOVÁ et al., 2003; PLAISANCE et al., 2005; MENDOZA-PALMERO et al., 2015).

A classe Monogenea atualmente está dividida em duas subclasses, Monopisthocotylea e Polyopisthocotylea (às vezes reportadas como Polyonchoinea e Heteronchoinea, quando considerada a classe Monogenoidea, ver BOEGER; KRITSKY, 2001), nos representantes da primeira, o haptor é resultado da transformação direta do aparelho de fixação larval, que raramente é pedunculado e apresenta pequenos ganchos marginais e dois pares de ganchos centrais (âncoras), enquanto na segunda ocorre uma metamorfose do aparelho de fixação larval, sendo geralmente pedunculado e contendo múltiplas unidades de fixação como ventosas, pinças e ganchos (EIRAS et al., 2010). Monopisthocotylea e Polyopisthocotylea compreendem 5 e 4 ordens, respectivamente, e juntas abrigam mais de 50 famílias de monogenéticos (BOEGER; KRITSKY, 1993). Dentre os membros de Monopisthocotylea, a família Gyrodactylidae, mencionada anteriormente, e a família Dactylogyridae Bychowsky, 1933 se destacam por sua grande diversidade, sendo dominantes nos artigos publicados sobre a classe (CRIBB et al., 2002). Apenas no gênero *Gyrodactylus* von Nordman, 1832 já foram descritas mais de 400

espécies (BAKKE et al., 2002), e o gênero *Dactylogyrus* Diesing, 1850 abriga mais de 900 espécies, sendo principalmente associados a peixes da família Cyprinidae (GIBSON et al., 1996).

Objeto de estudo

As ordens Characiformes e Siluriformes representam os componentes dominantes da ictiofauna Neotropical (VARI; MALABARBA, 1998), a primeira, abrigando cerca de 2.104 espécies pertencentes a 22 famílias, constitui a maior parte dos peixes dulcícolas do Brasil (FROESE; PAULY, 2018). Dentre as famílias da ordem Characiformes, a família Serrasalminidae, que inclui espécies como a piranha, o tambaqui e os pacus, se destaca por abrigar espécies de 15 gêneros de monogenéticos, ocorrendo às vezes de um único peixe abrigar cerca de 30 espécies (BOEGER; VIANNA, 2006). Dos 15 gêneros de monogenéticos encontrados em peixes serrasalmídeos, *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965, atualmente composto por 73 espécies nominais, é o mais representativo, com 36 espécies parasitando exclusivamente os peixes da família Serrasalminidae (COHEN et al., 2013; LEÃO et al., 2015). Eles são dactilogirídeos integrantes da subfamília Anacanthorinae Price, 1967, que atualmente compreende apenas dois gêneros, *Anacanthorus* e *Anacanthoroides* Kritsky & Thatcher, 1974, ambos neotropicais e parasitos de peixes da ordem Characiformes. Kritsky e Boeger (1989) realizaram uma análise filogenética de famílias e subfamílias dentro de Dactylogyroidea, baseada em características morfológicas, e seus resultados sugerem que a subfamília Anacanthorinae representa um grupo monofilético dentro da família Dactylogyridae. Porém até o momento nenhum estudo utilizou marcadores moleculares para avaliar a posição filogenética dos representantes desta subfamília dentre outros dactilogirídeos.

O uso de técnicas moleculares no estudo dos parasitos de peixes representa uma importante ferramenta que auxilia no processo da identificação das espécies, às vezes revelando complexos de espécies crípticas, e também possibilita reconstruções filogenéticas que vão ajudar a elucidar a história evolutiva dos parasitos (GRAÇA et al., 2016). Recentemente, Cohen et al. (2013) realizaram um levantamento da fauna de monogenéticos da América do Sul, e catalogaram 651 espécies, sendo 437 registradas no Brasil. Porém levando em consideração que o Brasil abriga mais de 4.500 espécies de peixes (ver FROESE; PAULY, 2018), e aceitando a estimativa de que cada peixe abriga pelo menos uma espécie de monogenético (WHITTINGTON, 1998), podemos concluir que o conhecimento atual da diversidade do grupo ainda é superficial. Apesar da sua grande diversidade, os monogenéticos neotropicais em geral, têm sido negligenciados em estudos moleculares.

O presente estudo tem como objetivo principal aumentar o conhecimento sobre a diversidade e as relações parasito-hospedeiro das espécies de *Anacanthorus* parasitando peixes serrasalmídeos, através de análises morfológicas e da utilização de marcadores moleculares. Logo, os seguintes objetivos específicos se fizeram necessários:

- (1) descrever espécies ainda não conhecidas pela ciência, adicionando dados moleculares quando possível, e observar possíveis padrões de distribuição geográfica e associação parasito-hospedeiro das espécies encontradas;
- (2) avaliar as relações filogenéticas das espécies de *Anacanthorus* parasitando peixes serrasalmídeos de diferentes bacias brasileiras, utilizando sequências parciais do DNA ribossomal 28S, e definir sua posição dentre outros dactilogirídeos;
- (3) e investigar a história cofilogenética entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos para elucidar o processo de especiação das espécies de *Anacanthorus*.

CAPÍTULO I –

NOVAS ESPÉCIES E REGISTROS DE *Anacanthorus* (MONOGENEA: DACTYLOGYRIDAE) PARASITANDO PEIXES SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES) EM BACIAS BRASILEIRAS, INCLUINDO DADOS MOLECULARES

RESUMO

Espécimes de duas novas espécies de *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965 foram coletados de serrasalmídeos no Brasil e são descritos no presente estudo. *Anacanthorus* sp. n. 1 parasito de *Serrasalmus maculatus* Kner tem grande semelhança com *A. xaniophallus* pela morfologia geral do complexo copulador, mas pode ser facilmente diferenciada por uma peça acessória maior com uma ponta ligeiramente curva, por ter uma aba basal no OCM (órgão copulador masculino) e pela morfologia do ganchos, com o polegar achatado. *Anacanthorus* sp. n. 2 parasito de *Myloplus schomburgkii* assemelha-se a *A. spinatus* por possuir um OCM em forma de J com alargamento terminal e uma peça acessória bifurcada, diferindo pelo ramo distalmente dobrado da peça acessória e pela base do OCM com a borda altamente esclerotizada. Além disso, novos registros de hospedeiros e geográficos são fornecidos para espécies anteriormente descritas de *Anacanthorus*, também incluímos dados moleculares para seis espécies de *Anacanthorus* (ou seja, para todas as espécies registradas em nosso estudo, exceto *Anacanthorus* sp. n. 2).

Palavras-chave: Monogenéticos, Anacanthorinae, Serrasalmidae, DNA mitocondrial, Brasil.

ABSTRACT

Specimens of two new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965 were retrieved from serrasalmids in Brazil and are described herein. *Anacanthorus* sp. n. 1 parasite of *Serrasalmus maculatus* Kner has great similarity to *A. xaniophallus* by the general morphology of the copulatory complex, but it can be easily differentiated by a larger accessory piece with a slightly curved point, by having a basal flap in the MCO (male copulatory organ) and by the morphology of hooks, with flattened thumb. *Anacanthorus* sp. n. 2 parasite of *Myloplus schomburgkii* resembles *A. spinatus* by possessing a J-shaped MCO with terminal flare and a bifurcated accessory piece, differing by the branch distally folded of the accessory piece and by the base of MCO with heavily sclerotized flap. Additionally, new hosts and geographical records are provided to previously described species of *Anacanthorus*, we also included molecular data to six species of *Anacanthorus* (i.e. for all the species recorded in our study, except *Anacanthorus* sp. n. 2).

Key words: Monogeneans, Anacanthorinae, Serrasalmidae, mitochondrial DNA, Brazil.

2.1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965, representam parasitos comuns dos Characiformes neotropicais. Caracterizam-se por possuir um haptor bilobado com 7 pares de ganchos e 2 pares de 4A's (ganchos reduzidos), gônadas situadas obliquamente ou ligeiramente sobrepostas, testículos pós ovarianos, vagina ausente e parede uterina distal modificada (espessada ou esclerotizada) (KRITSKY et al., 1992). Atualmente, existem 73 espécies nominais de *Anacanthorus*, a maioria delas (36) foram descritas a partir das brânquias de serrasalmídeos, seguidas por representantes das famílias Characidae (22) e Bryconidae (15) (COHEN et al., 2013, LEÃO et al., 2015), embora também tenham sido reportadas espécies não descritas de peixes da família Erythrinidae (GRAÇA et al., 2013, 2018).

Os membros da família Serrasalimidae, comumente conhecidos como piranhas e pacus, são endêmicos da América do Sul (FROESE e PAULY, 2018), e muitos deles representam espécies de peixes economicamente importantes para a aquicultura e pesca comercial, especialmente na região amazônica (CASTAGNOLI, 2000, SANTOS et al., 2009, LASSO et al., 2011). Segundo Ortí et al. (2008), diferentes hábitos alimentares podem ser reconhecidos entre esses peixes, incluindo carnivorina, frugivorina e lepidofagia (escamas). Além de *Anacanthorus*, os serrasalmídeos são também conhecidos por abrigar outros 14 gêneros de monogenéticos, sendo esses, *Amphithecium* Boeger & Kritsky, 1988, *Calpidothecium* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997, *Calpidothecioides* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997, *Enallothecium* Kritsky, Boeger & Jégu, 1998, *Heterothecium* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997, *Kritskyia* Kohn, 1990, *Linguadactyloides* Thatcher e Kritsky, 1983, *Mymarothecium* Kritsky, Boeger e Jégu, 1996, *Notothecium* Boeger e Kritsky, 1988, *Notothecioides* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997, *Notozothecium* Boeger & Kritsky, 1988, *Odothecium* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997, *Pithanothecium* Kritsky, Boeger e Jégu, 1997 e *Rhinoxenus* Kritsky, Boeger & Thatcher, 1988.

O gene mitocondrial citocromo c oxidase 1 (COI) tem sido amplamente utilizado para identificar espécies devido à sua variabilidade, incluindo espécies de monogenéticos, permitindo estudos de taxonomia integrativa (SEPÚLVEDA et al., 2014), variação genética (PETTERSEN et al., 2015), revelando complexos de espécies crípticas (SEPÚLVEDA e GONZÁLEZ, 2014) e padrões filogeográficos (LI et al., 2011). Mas apesar da grande diversidade de monogenéticos na região Neotropical, estudos incluindo dados moleculares ainda são escassos.

Durante um levantamento parasitológico, realizado em bacias hidrográficas brasileiras, espécies de *Anacanthorus* foram recuperadas de diferentes espécies de serrasalmídeos. A avaliação morfológica revelou duas espécies novas que são descritas no presente estudo. Além disso, novos hospedeiros e registros geográficos são fornecidos, juntamente com sequências parciais do gene COI mtDNA das espécies de *Anacanthorus*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Coleta e processamento de amostras

Os peixes foram capturados por pescadores locais com redes e anzóis do Rio Miranda (20°11'27" S; 56°30'19" O), Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil; do Rio Xingu (3°18'38" S; 51°55'52" O), Altamira, Pará, Brasil; do Rio Mogi Guaçu (21°58' S; 47°26' O), Pirassununga, São Paulo; e do Alto Rio Paraná (20°45' S; 53°16' O), Porto Rico, Paraná, Brasil. Os hospedeiros foram analisados imediatamente após a captura. As brânquias extraídas dos peixes foram colocadas em placas de Petri com água da torneira e examinadas para a presença de monogenéticos usando um microscópio estereoscópico. Os espécimes foram colocados individualmente em uma gota de água em uma lâmina e o haptor de cada parasito foi extirpado do corpo para análises moleculares. O restante do corpo foi montado em uma mistura de glicerina e ácido pícrico (GAP) e mantido como comprovante molecular. Além disso, alguns espécimes inteiros foram montados em GAP e mantidos como espécimes paragenóforos (ver ASTRIN et al., 2013 para terminologia). Após avaliação morfológica, estes espécimes fixados em GAP foram remontados em bálsamo do Canadá de acordo com o procedimento de Ergens (1969). Os desenhos foram feitos com o auxílio de um microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) equipado com um tubo de desenho. As medidas, todas em micrômetros, representam distâncias em linha reta entre pontos extremos e são expressas como a amplitude seguida pela média e número (n) das estruturas medidas entre parênteses; o comprimento do corpo inclui o do haptor. Numeração (distribuição) de pares de gancho segue Mizelle (1936; ver MIZELLE e PRICE, 1963). Os espécimes tipo e vouchers serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), no Rio de Janeiro, Brasil.

2.2.2 Análises moleculares

O DNA foi extraído em 200 µl de uma suspensão de 5% de Chelex™ em água deionizada contendo 2 µl de proteinase K, seguida de incubação a 56°C por 3 h, fervendo a 95°C por 8 min. A região do gene mitocondrial COI foi amplificada utilizando os primers Trem Co1F e Trem Co1R (BONETT et al., 2011). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1 x tampão de PCR, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de cada primer oligonucleotídico, 1 U de DNA polimerase Platinum Taq (Invitrogen), 0,4 mg/ml de BSA e 2,5 µl de DNA genômico, utilizando os parâmetros de ciclagem descritos em Graça et al. (2018) Os produtos de PCR foram purificados através de um tratamento enzimático com ExoProStar™ (GE Healthcare), preparados para o sequenciamento com a química de BigDye® v.3.1 (Applied Biosystems) e sequenciados em ambas as direções usando os primers de PCR. Sequências contíguas foram montadas no software Geneious (Geneious ver. 9, criado pela Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>) e depositadas no banco de dados do GenBank. As posições dos start e stop códons dos genes codificadores de proteínas foram identificadas utilizando o código gênico mitocondrial de equinodermos e os quadros de leitura de aminoácidos foram verificados no software Geneious.

2.3 RESULTADOS

Família Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Subfamília Anacanthorinae Price, 1967

Gênero *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965

Anacanthorus sp. n. 1 (Figs. 1–3)

Hospedeiro e localidade: *Serrasalmus maculatus* Kner (Characiformes: Serrasalminidae), Rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°11'27" S; 56°30'19" O).

Outro hospedeiro e localidade: *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, Rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°11'27" S; 56°30'19" O).

Local de infecção: brânquias.

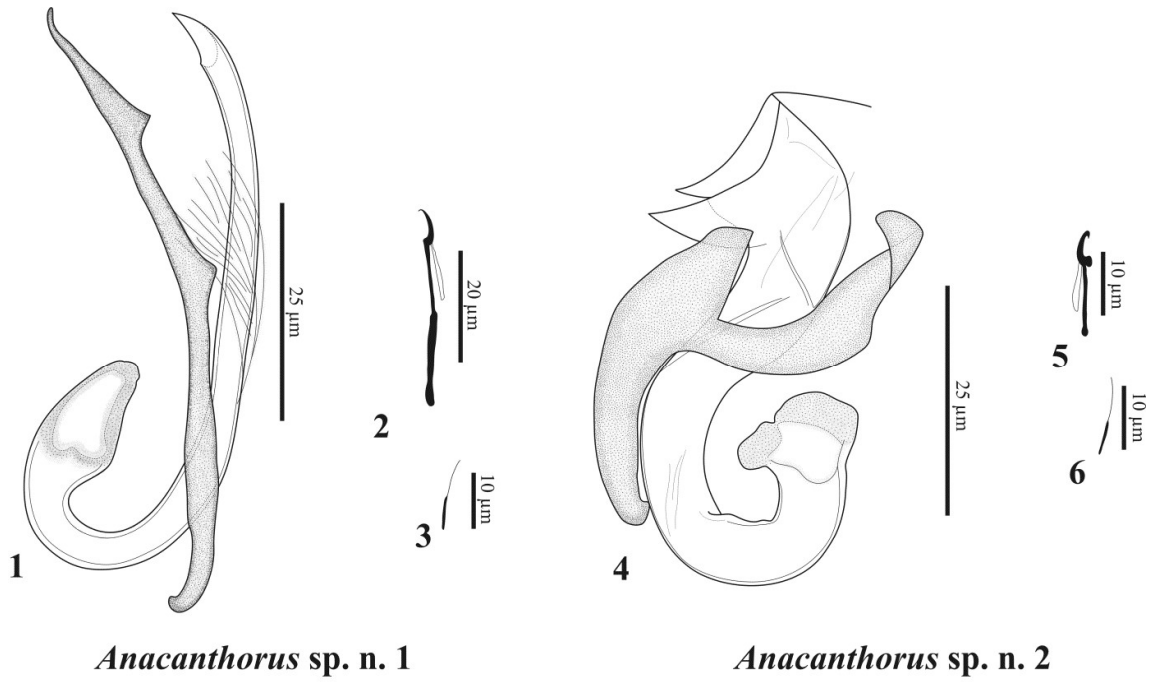
Espécimes depositados: CHIOC No. 40046 a-b e 40047 (Holótipo + 2 parátipos).

Sequências de DNA representativas: COI mtDNA (GenBank acc. No. MK757438).

Descrição (baseada em 7 espécimes montados em GAP): corpo fusiforme, 768 e 860 (n = 2) de comprimento; maior largura 115–151 (137; n = 5), perto do comprimento médio. Lóbulos cefálicos moderadamente desenvolvidos; 3 pares bilaterais de órgãos da cabeça. Quatro ocelos, par posterior maior e um pouco mais distante do que o par anterior; grânulos acessórios ausentes. Faringe subsférica 47–49 (48; n = 2) de largura. Haptor 95–133 (115; n = 5) de comprimento, 156–215 (182; n = 5) de largura; lobos haptorais bem desenvolvidos. Ganchos 34–40 (38; n = 21) de comprimento, similar em forma e tamanho, cada um com o polegar achatado, haste dilatada proximalmente, lâmina ligeiramente curva e ponta curva curta; Filamento do gancho (FG) cerca de 1/3 do comprimento da haste. Dois pares de 4A's semelhantes, cada um com 10–14 (12; n = 9) de comprimento, expandido-se proximalmente. Órgão copulador masculino (OCM) 59–65 (63; n = 7) de comprimento, eixo curvo em forma de J, com “pena” do OCM presente originando-se próximo ao comprimento médio, com aba basal curta. Peça acessória 64–72 (69; n = 7) de comprimento, não articulada ao OCM, em forma de haste com ponta levemente curva, com elevação submedial e subterminal. Testículo pós germarial, 45–53 (49; n = 2) de comprimento, 23–29 (26; n = 2) de largura; vesícula seminal uma dilatação de ducto deferente. Germário 91–99 (95; n = 2) de comprimento, alongado. Vitelária em dois campos bilaterais do tronco, da faringe até a região posterior do tronco, coextensiva com o ceco intestinal.

Comentários

Com base na morfologia geral do órgão copulador masculino e da peça acessória, *Anacanthorus* sp. n. 1 assemelha-se mais a *A. xaniophallus* Kritsky, Boeger & Van Every, 1992 de *Pristobrycon eigenmanni* (Norman) e *Pristobrycon* sp. (Characiformes: Serrasalminidae) no Amazonas, Brasil. Difere dessa espécie por ter uma aba basal no OCM (borda lateral em *A. xaniophallus*) e uma peça acessória maior em forma de bastão, com ponta ligeiramente curvada, elevação submedial e aba subterminal aguda (em forma de bastão com ponta terminal recurvada, ponto (músculo) de articulação submedial variavelmente desenvolvido em *A. xaniophallus*) e pela morfologia dos ganchos, com polegar achatado, haste dilatada proximalmente, lâmina levemente curvada e ponta curva curta (com polegar truncado e levemente deprimido, haste proximalmente aumentada).



Figuras 1–6. Estruturas esclerotizadas de *Anacanthorus* spp. **Figs 1–3.** *Anacanthorus* sp. n. 1 de *Serrasalmus maculatus* Kner. **1.** Complexo copulador (vista ventral). **2.** Gancho. **3.** 4A. **Figs 4–6.** *Anacanthorus* sp. n. 2 de *Myloplus schomburgkii* (Jardine & Schomburgk) **4.** Complexo copulador (vista ventral). **5.** Gancho. **6.** 4A.

Anacanthorus sp. n. 2 (Figs. 4–6)

Hospedeiro e localidade: *Myloplus schomburgkii* (Jardine & Schomburgk) (Characiformes: Serrasalminidae), Rio Xingu (3°18'38" S; 51°55'52" O), Altamira, Pará, Brasil.

Local de infecção: brânquias.

Espécimes depositados: CHIOC No. 40058 e 40059 (Holótipo + 1 parátipo).

Sequências de DNA representativas: Não disponível.

Descrição (baseada em 6 espécimes): Corpo fusiforme, 876 (n = 1) de comprimento; 222 (n = 1) de largura. Lóbulos cefálicos moderadamente desenvolvidos; 3 pares bilaterais de órgãos da cabeça. Quatro ocelos, par posterior maior e um pouco mais distante do que o par anterior; grânulos acessórios ausentes. Faringe subsférica 25–51 (36; n = 4) de largura. Haptor 113 (n = 1) de comprimento, 161 (n = 1) de largura; lobos haptoriais bem desenvolvidos. Ganchos 18–19 (18; n = 6) de comprimento, similares em forma e tamanho, cada um com o polegar truncado ligeiramente deprimido, haste delgada com pequeno alargamento proximal; Filamento do gancho cerca de 2/3 de comprimento da haste. Dois pares de 4A's semelhantes, cada um com 13–14 (13; n = 3) de comprimento, expandidos proximalmente. OCM 47–61 (52; n = 6) de comprimento, robusto, em forma de J invertido, com alargamento terminal, base com aba fortemente esclerotizada. Peça acessória 41–51 (46; n = 5) de comprimento, em forma de gancho, não articulada ao OCM. Testículo pós germarial, 168 (n = 1) de comprimento, 115 (n = 1) de largura; vesícula seminal uma dilatação do ducto deferente. Germário 81 (n = 1) de comprimento, suboval. Vitelária em dois campos bilaterais do tronco, da faringe até a região posterior do tronco, coextensiva com o ceco intestinal.

Comentários

Anacanthorus n. sp. 2 pode ser facilmente diferenciado das espécies congênicas por possuir um OCM em forma de J invertido com alargamento terminal, uma peça acessória em forma de gancho e pela base do OCM com uma aba fortemente esclerotizada.

Novos registros de hospedeiro e geográficos

Além da descrição de duas novas espécies de *Anacanthorus*, durante os levantamentos parasitológicos também foram encontradas espécies previamente descritas de *Anacanthorus* e alguns hospedeiros representam novos registros, e a bacia do Rio Paraná representa um novo registro geográfico para a maioria das espécies (ver Tabela 1).

Tabela 1. Novos registros de hospedeiro e geográficos das espécies de *Anacanthorus* encontradas no presente estudo.

Espécies	Hospedeiros	Bacia hidrográfica/País	Referências
<i>A. lepyrophallus</i> CHIOC No 40052 CHIOC No 40053	<i>Serrasalmus altispinnis</i> , <i>S. elongatus</i> ^a , <i>S. maculatus</i> , <i>S. marginatus</i> , <i>Serrasalmus</i> sp. (1 of Jégu), <i>Serrasalmus</i> sp. (2n = 58)	Amazon (Brazil), Paraná (Brazil)	Kritsky et al. (1992), Morey e Malta (2018)
<i>A. maltai</i> CHIOC No 40051	<i>Pygocentrus nattereri</i> ^a	Amazon (Brazil), Paraná (Brazil)	Boeger e Kritsky (1988)
<i>A. penilabiatus</i> CHIOC No 40050	<i>Colossoma macropomum</i> , <i>Leporinus macrocephalus</i> , <i>Piaractus brachypomus</i> , <i>P. mesopotamicus</i> ^a	Centros de Aquicultura, São Paulo, Brasil; Centro de Pesquisas Ictiológicas Rudolph von Ihering, Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, Pentecoste, Ceará, Brazil; Pesque-pagues em Franca, São Paulo, Brasil; Pesque-pagues da região de Assis, Pirassununga, Mogi-Mirim e Itapira, São Paulo, Brasil; Viveiros de peixes da Usina Hidrelétrica de Itaipu, Rio Paraná, Brasil; Paraná (Brasil);	Boeger et al. (1995), Martins and Romero (1996), Pamplona-Basilio et al. (2001), Tavares-Dias et al. (2001), Martins et al. (2002), Lizama et al. (2007), Cohen and Kohn (2009), Muller et al. (2016), Leão et al. (2017), Graça et al. (2018)
<i>A. sciponophallus</i> CHIOC No 40054	<i>Serrasalmus altispinnis</i> , <i>S. elongatus</i> ^a , <i>S. rhombeus</i> , <i>S. spilopleura</i> , <i>Serrasalmus</i> sp. (1 of Jégu), <i>Serrasalmus</i> sp. (2n = 58)	Amazon (Brasil), Paraná (Brasil)	Van Every e Kritsky (1992), Córdova e Pariselle (2007), Morey e Malta (2018)
<i>A. thatcheri</i> CHIOC No 40055	<i>Pygocentrus nattereri</i> ^a	Amazon (Brasil), Paraná (Brasil)	Boeger e Kritsky (1988), Iannacone e Luque (1993)

^a Hospedeiro-tipo. Espécies e bacias hidrográficas em negrito representam novos registros.

2.4 DISCUSSÃO

No presente artigo, duas novas espécies de *Anacanthorus* são descritas, novos hospedeiros e registros geográficos são fornecidos para espécies anteriormente descritas e dados moleculares são adicionados a seis espécies de *Anacanthorus* (isto é, para todas as espécies registradas em nosso estudo, exceto *Anacanthorus* sp. n. 2).

Embora existam 73 espécies nominais de *Anacanthorus*, a descoberta de duas novas espécies no presente estudo, juntamente com descrições recentes de espécies congênicas (LEÃO et al., 2015; MONTEIRO et al., 2015) são evidências de que a diversidade de *Anacanthorus* ainda não é totalmente conhecida. Os novos registros de hospedeiro para *A. lepyrophallus* e *A. sciponophallus* expandem a gama de hospedeiros para essas espécies, porém ainda permanecem parasitos exclusivos da família Serrasalmidae. Os monogenéticos sempre foram considerados como parasitas hospedeiro-específicos (Whittington et al., 2000), embora nem sempre sejam restritos a uma única espécie hospedeira, no caso do sistema *Anacanthorus*-Serrasalmidae existem espécies como *A. lepyrophallus* e *A. sciponophallus* (que podem ser encontradas em 5 e 8 hospedeiros, respectivamente), no entanto, das 36 espécies que parasitam os peixes serrasalmídeos 23 são estritamente especialistas, parasitando uma única espécie hospedeira.

Com exceção de *A. penilabiatus*, todas as espécies anteriormente descritas de *Anacanthorus* foram registradas apenas na bacia Amazônica, no entanto, os novos registros geográficos aqui apresentados expandem sua distribuição para a bacia do Paraná. Os inúmeros registros na bacia Amazônica podem ser devidos ao fato de esta bacia possuir a maior diversidade de peixes serrasalmídeos (FROESE e PAULY, 2018), o que acabou levando a um maior número de estudos nessa área.

Fornecemos novos dados moleculares para quase todas as espécies de *Anacanthorus* aqui estudadas, com exceção de *Anacanthorus* sp. n. 2 e *A. penilabiatus*, que foi recentemente sequenciada por Graça et al. (2018). A separação das espécies foi bem suportada pela análise molecular (ver Tabela 2). De acordo com Hebert et al. (2008), uma distância genética de 3% é suficiente para distinguir espécies de invertebrados. Com exceção das duas sequências de *A. lepyrophallus*, a menor distância genética é exibida por *A. maltai* e *A. thatcheri* (14%) que apresentam grande similaridade nos complexos copuladores. *Anacanthorus penilabiatus* é a mais distante geneticamente do conjunto de espécies de *Anacanthorus*, variando de 19,5 a 21, 2%, o que também corrobora com sua morfologia que é realmente diferente das outras espécies aqui estudadas.

A adição de dados moleculares em futuros estudos taxonômicos facilitará a identificação e diferenciação das espécies de *Anacanthorus* e também vai fornecer informação útil para estudos de variação genética e espécies crípticas. Espécies de *Anacanthorus* podem ser encontradas em um grande número de Characiformes neotropicais, portanto mais estudos com um conjunto maior de espécies são necessários, incluindo espécies de *Anacanthorus* de diferentes grupos de hospedeiros e áreas geográficas.

Tabela 2. Porcentagem das divergências de pareamento entre as sequências parciais de COI mtDNA de *Anacanthorus* spp. Os números de acesso do GenBank também estão incluídos.

Espécies	Números de acesso		1	2	3	4	5	6	7
<i>Anacanthorus lepyrophallus</i>	MK757434	1							
<i>Anacanthorus lepyrophallus</i>	MK757436	2	0.3						
<i>Anacanthorus maltai</i>	MK757439	3	16.7	16.7					
<i>Anacanthorus thatcheri</i>	MK757440	4	15.7	16	14				
<i>Anacanthorus sciponophallus</i>	MK757437	5	17.9	17.9	16.5	14.2			
<i>Anacanthorus</i> sp. n. 1	MK757438	6	16.9	17.2	16.7	14.4	16.4		
<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	MK757435	7	20.3	20.7	21	21	19.5	21.2	
<i>Ancyrocephalinae</i> sp.	MF939853	8	57.3	57.4	57.3	56.5	57.9	56.8	57.1

Houve um total de 627 posições no conjunto de dados.

CAPÍTULO II –

POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE *Anacanthorus* spp. (MONOGENEA) PARASITOS DE SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES) NO BRASIL, DENTRE DACTYLOGYRIDAE

RESUMO

Anacanthorus é um dos gêneros mais especiosos e frequentes dos monogenéticos neotropicais, embora ainda existam muitas lacunas no conhecimento de sua diversidade e filogenia. Realizamos uma análise filogenética molecular baseada em sequências parciais de 28S rDNA, a fim de investigar pela primeira vez a posição filogenética de *Anacanthorus* spp. infestando serrasalmídeos de duas bacias hidrográficas brasileiras, dentre Dactylogyridae. Sequências de 9 espécies de *Anacanthorus* foram analisadas em conjunto com uma sequência da espécie *Mymarothecium viatorum* e com sequências publicadas de outros membros dos Dactylogyridae. Análises filogenéticas suportaram o monofilismo dos monogenéticos anacantoríneos. Os Anacanthorinae (representados apenas por *Anacanthorus* spp.) formaram um grupo monofilético incluído no grande clado juntamente com o grupo de Ancyrocephalinae exclusivamente de água doce (clado A) e espécies de Ancylodiscoidinae. *Mymarothecium viatorum* foi posicionado dentro do clado de Ancyrocephalinae de água doce. As análises filogenéticas indicaram que as relações entre espécies de *Anacanthorus* refletem as relações entre as linhagens dos hospedeiros serrasalmídeos: o primeiro subgrupo inclui uma espécie específica para os hospedeiros do gênero *Piaractus*, membro da linhagem “pacus”, o segundo subgrupo inclui uma espécie da linhagem “*Myleus* tipo pacus” e o terceiro subgrupo inclui espécies da linhagem das “piranhas verdadeiras”. Concluímos que *Anacanthorus* e seus hospedeiros podem fornecer um modelo útil para estudar biogeografia e coevolução nos neotrópicos. No entanto, estudos futuros são necessários com foco em uma ampla variedade de hospedeiros e espécies de *Anacanthorus*, e também em representantes de outros gêneros que parasitam serrasalmídeos para investigar as relações filogenéticas entre os tão diversos monogenéticos parasitando o mesmo grupo hospedeiro.

Palavras-chave: *Anacanthorus*, Anacanthorinae, Serrasalmidae, região Neotropical, Ancyrocephalinae, 28S rDNA, filogenia molecular

ABSTRACT

Anacanthorus is one of the most specious and frequent genus of Neotropical monogeneans, although there are still many gaps in the knowledge of their diversity and phylogeny. We performed a molecular phylogenetic analyses based on partial 28S rDNA sequences, in order to investigate for the first time the phylogenetic position of *Anacanthorus* spp. infesting serrasalmids from two Brazilian river basins, within the Dactylogyridae. Sequences of 9 species of *Anacanthorus* were analyzed together with a sequence of the species *Mymarothecium viatorum* and with published sequences of other members of the Dactylogyridae. Phylogenetic analyses supported the monophyly of the anacanthorin monogeneans. The Anacanthorinae (represented only by *Anacanthorus* spp.) formed a monophyletic group included in the large clade together with the group of solely freshwater Ancyrocephalinae (clade A) and species of the Ancylo-discoidinae. *Mymarothecium viatorum* was placed within the clade of freshwater Ancyrocephalinae. The phylogenetic analyses indicated that the relationships among species of *Anacanthorus* reflect the relationships between the lineages of the serrasalmid hosts: the first subgroup includes a species specific to hosts of the genus *Piaractus*, member of the “pacus” lineage, the second subgroup includes a species from the “*Myleus*-like pacus” lineage and the third subgroup includes species from the lineage of the “true piranhas”. We conclude that *Anacanthorus* and their hosts can provide useful model to study biogeography and coevolution in the Neotropics. However, future studies are needed focusing a wider host range and species of *Anacanthorus*, and also on representatives of other genera parasitizing serrasalmids to investigate the phylogenetic relationships among such diverse monogeneans parasitizing the same host group.

Key words: *Anacanthorus*, Anacanthorinae, Serrasalmidae, Neotropical region, Ancyrocephalinae, 28S rDNA, molecular phylogeny

3.1 INTRODUÇÃO

Os peixes de água doce da família Serrasalminidae, representados por piranhas, pacus e seus parentes, atualmente compreendem 98 espécies válidas que são distribuídas ao longo de toda a América do Sul (FROESE e PAULY, 2018). Várias espécies deste grupo de peixes são economicamente importantes para captura comercial e aquicultura, especialmente na região amazônica (JUNK, 1984; MARSHALL, 1995; ARAUJO-LIMA e GOULDING, 1997). Muitos estudos filogenéticos baseados em diferentes marcadores moleculares (por exemplo, região de controle do DNAm, 12S e 16S RNAr) sugeriram que os Serrasalminidae formam três principais linhagens filogenéticas, ou seja, a linhagem dos “pacus” (incluindo *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*), “*Myleus* tipo pacus” (incluindo *Mylesinus*, *Myleus*, *Ossubtus* e *Tometes*) e a linhagem das “piranhas verdadeiras” (incluindo *Catoprion*, *Metynnis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus*) (ORTÍ et al., 1996, 2008; THOMPSON et al., 2014).

Peixes serrasalmídeos apresentam uma enorme diversidade de monogenéticos, considerando o nível genérico desse grupo de ectoparasitos. Até o momento, 92 espécies pertencentes a 15 gêneros foram registradas nesses peixes. A maioria desses registros teve origem no Brasil durante a década de 1990, quando pelo menos oito novos gêneros e 61 novas espécies de monogenéticos foram descritos em piranhas e seus parentes (BOEGER e VIANNA, 2006).

Dos 15 gêneros de monogenéticos parasitos de serrasalmídeos, *Anacanthorus* é o mais representativo, atualmente compreendendo 73 espécies nominais, distribuídas entre os peixes das famílias Bryconidae (15 espécies), Characidae (22) e Serrasalminidae (36), todos Characiformes, com exceção de um registro provavelmente acidental de *A. colombianus* Kritsky & Thatcher, 1974 no ciclídeo *Oreochromis mossambicus* (Peters) (COHEN et al., 2013; LEÃO et al., 2015). No entanto, espécies não descritas deste gênero também foram recentemente registradas em peixes da família Erythrinidae (Characiformes) (GRAÇA et al., 2013, 2018). Esses monogenéticos pertencem à subfamília Anacanthorinae Price, 1967, que é restrita à região neotropical, e atualmente abriga *Anacanthorus* e *Anacanthoroides* Kritsky & Thatcher, 1974, sendo este último representado por apenas duas espécies registradas parasitando peixes da família Prochilodontidae (KRITSKY e THATCHER, 1976; MONTEIRO e BRASIL-SATO, 2014).

De acordo com as análises morfológicas de Kritsky e Boeger (1989), Anacanthorinae parece representar um grupo monofilético dentro dos Dactylogyridae. Van Every e Kritsky (1992) usaram caracteres morfológicos de ganchos do haptor e órgãos reprodutivos para inferir relações filogenéticas entre espécies de *Anacanthorus* de serrasalmídeos da Amazônia Central, e concluíram que esse sistema parasita-hospedeiro pode representar um modelo adequado para estudos sobre biogeografia e coevolução nos neotrópicos, embora ainda existam muitas lacunas no conhecimento de sua diversidade e filogenia (isto é, posição filogenética de *Anacanthorus* dentro dos Dactylogyridae e relações interespecíficas dentro de *Anacanthorus*).

Usando a subunidade menor completa do DNA ribossomal (18S rDNA), Müller et al. (2016) realizaram um estudo de *A. penilabiatus* Boeger, Husak & Martins 1995 e *Mymarothecium viatorum* Boeger, Piasecki e Sobecka, 2002 (Ancyrocephalinae), ambos parasitos do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), enfocando a posição filogenética destes monogenéticos dentre outros dactiloirídeos. Recentemente, Graça et al. (2018) investigaram os processos coevolutivos entre espécies selecionadas de *Anacanthorus* e seus hospedeiros no sul do Brasil e mostraram a coespeciação parasita-hospedeiro ao nível das famílias hospedeiras (Serrasalminidae, Bryconidae e Erythrinidae e suas espécies de *Anacanthorus*).

Anacanthorus é o gênero mais especioso parasitando Characiformes, que representam a maior parte dos peixes de água doce do Brasil, mas estes parasitos têm sido negligenciados em

estudos moleculares. Portanto o objetivo deste estudo foi realizar análises filogenéticas moleculares baseadas em sequencias parciais de 28S rDNA, a fim de investigar pela primeira vez a posição filogenética de *Anacanthorus* spp. infestando serrasalmídeos de duas bacias hidrográficas brasileiras, dentre os Dactylogyridae.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e processamento de amostras

Os peixes foram capturados por pescadores locais com redes de emalhar e ganchos das seguintes localidades no Brasil: Rio Miranda (20°11'27" S; 56°30'19" O) e Rio Negro (19°34'40" S; 56°09'08" O), Pantanal, Mato Grosso do Sul; Alto Rio Paraná (20°45' S; 53°16' O), Porto Rico, Paraná; e Rio Xingu (3°12' S, 52°12' O), Altamira, Pará (ver Tabela 1). Os peixes foram examinados para a presença de monogenéticos imediatamente após a captura. As brânquias extraídas dos peixes foram colocadas em placas de Petri com água da torneira e examinadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os espécimes foram colocados individualmente em uma gota de água em uma lâmina e o haptor de cada espécime foi retirado do corpo para análises moleculares e preservado em etanol absoluto. O restante do corpo foi montado em uma mistura de glicerina e picrato de amônio (GAP) e mantido como voucher molecular. Além disso, alguns espécimes inteiros foram montados em GAP e mantidos como espécimes paragenóforos (ver ASTRIN et al., 2013 para terminologia). A determinação taxonômica das espécies foi baseada principalmente na morfologia do órgão copulador masculino e dos ganchos haptorais seguindo as descrições originais de Boeger e Kritsky (1988), Van Every e Kritsky (1992) e Boeger et al. (1995). Após avaliação morfológica, os espécimes fixados em GAP foram remontados em bálsamo do Canadá de acordo com o procedimento de Ergens (1969). Os espécimes representativos serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil e na Coleção Helmintológica do Instituto de Parasitologia da Academia Tcheca de Ciências (IPCAS), República Tcheca.

3.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA foi extraído em 200 µl de uma suspensão de 5% de Chelex™ em água deionizada contendo 2 µl de proteinase K, seguida de incubação a 56°C por 3 h, fervendo a 95°C por 8 min. A região do gene parcial da subunidade maior do DNA ribossomal (28S rRNA, domínios D1-D3) foi amplificada usando os primers C1 e D2 (HASSOUNA et al., 1984) ou U178 e L1642 (LOCKYER et al., 2003). Para o último par de primers, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1 x PCR buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada primer oligonucleotídico, 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 mg/ml de BSA e 2,5 µl de DNA genômico, utilizando os parâmetros de ciclagem descritos em Mendoza-Palmero et al. (2015). Para os primers C1 e D2, as reações de PCR foram realizadas num volume final de 15 µl contendo 1 x tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de cada primer oligonucleotídico, 1 U de DNA polimerase Taq (Fermentas) 6,6 mg/ml de BSA e 5 µl de DNA genômico, usando os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação a 94°C por 2 min, seguida por 39 ciclos de 94°C por 20 s, anelamento a 58°C por 30 s e alongamento a 72°C durante 1 min 30 s, com um alongamento final a 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o kit ExoSAP-IT (Ecoli, Bratislava, SK) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados diretamente usando os pares de primers da PCR C1 – D2 ou U178 – L1642 e dois primers internos adicionais (1200F e 1200R, ver LOCKYER et al., 2003) com um kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). O sequenciamento foi realizado em um ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequências contíguas foram geradas no software Geneious (Geneious ver. 9 criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>) e depositadas no banco de dados GenBank, porém os números de acesso ainda não foram disponibilizados.

3.2.3 Análises filogenéticas

Nove espécies de *Anacanthorus* e *Mymarothecium viatorum* (as espécies hospedeiras são mostradas na Tabela 1) foram sequenciadas para o gene parcial 28S rRNA e alinhadas com 35 espécies pertencentes à Dactylogyridea e 4 espécies de Monocotylidea obtidas do GenBank (ver Tabela 1). As sequências foram alinhadas com o algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) implementado no Geneious. As regiões alinhadas ambigualmente foram removidas do alinhamento usando GBlocks v. 0.91 (TALAVERA e CASTRESANA, 2007) usando uma seleção menos rigorosa. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando espécies de Monocotylidae, Tetraonchinae e Pseudomurraytrematidae como grupos externos (ver Tabela 1 para espécies). O modelo de substituição TVM + I + G (modelo de transversão incluindo a proporção de sítios invariáveis e distribuição gama), selecionado pelo jModelTest (POSADA, 2008), foi utilizado para as análises de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). A busca pela árvore de MV e a reamostragem de bootstrap com 1.000 replicações foram realizadas utilizando PHYML (GUINDON e GASCUEL, 2003) implementado no Geneious. As análises de IB foram realizadas usando MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), executando quatro cadeias Monte Carlo Markov por 107 gerações, com árvores sendo amostradas a cada 103 gerações e as primeiras 1.000 amostras foram descartadas como “burn in”. O software Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al., 2014) foi utilizado com a finalidade de verificar a convergência e a mistura de diferentes parâmetros e confirmar que o tamanho efetivo da amostra (ESS) de cada parâmetro foi adequado para fornecer estimativas razoáveis da variância nos parâmetros do modelo (isto é, valores de ESS > 200).

Tabela 1. Lista de espécies de Dactylogyridea e Monocotylidea incluídas nas análises filogenéticas. Espécies de hospedeiros, localidades e números de acesso estão incluídos. (AUS – Áustria, AUT – Austrália, BR – Brasil, CH – China, RT – República Tcheca, AL – Alemanha, MX – México, PE – Peru, ES – Eslováquia).

Parasito	Hospedeiro	Família do hospedeiro	Localidade	Número de acesso	Referências
Dactylogyridea					
Dactylogyridae					
<i>Actinocleidus recurvatus</i>	<i>Lepomis gibbosus</i>	Centrarchidae	Rio Dunaj, ES	AJ969951	Šimková et al. (2006)
<i>Aliatrema cribbi</i>	<i>Chaetodon citrinellus</i>	Chaetodontidae	Polinésia Francesa	AY820612	Plaisance et al. (2005)
<i>Ameloblastella chavarriai</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Heptapteridae	Lago Catemaco, MX	KP056251	Mendoza-Palmero et al. (2015)
<i>Ameloblastella</i> sp. 16	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	Hypophthalmidae	Rio Nanay, PE	KP056255	Mendoza-Palmero et al. (2015)
<i>Ancyrocephalus paradoxus</i>	<i>Sander lucioperca</i>	Percidae	Rio Morava, RT	AJ969952	Šimková et al. (2006)
<i>Ancyrocephalus percae</i>	<i>Perca fluviatilis</i>	Percidae	Lago Constance, AL	KF499080	Berhrmann-Godel et al. (2013)
<i>Anacanthorus amazonicus</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Serrasalmidae	Rio Negro, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus jegui</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Serrasalmidae	Rio Negro, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus lepyrophallus</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Serrasalmidae	Rio Baía, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus maltai</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Serrasalmidae	Rio Miranda, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Serrasalmidae	Rio Paraná, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus rondonensis</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Serrasalmidae	Rio Miranda, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus thatcheri</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Serrasalmidae	Rio Miranda, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus</i> sp. 1	<i>Serrasalmus marginatus</i>	Serrasalmidae	Rio Paraná, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Anacanthorus</i> sp. 2	<i>Myleus setiger</i>	Serrasalmidae	Rio Xingu, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Bravohollisia rosetta</i>	<i>Pomadasys maculatus</i>	Haemulidae	Guangdong, CH	DQ537364	Wu et al. (2007)
<i>Bychowkyella pseudobagri</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	Bagridae	Guangdong, CH	EF100541	Wu et al. (2008)
<i>Dactylogyrus extensus</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Cyprinidae	Rio Morava, RT	AJ969944	Šimková et al. (2006)
<i>Dactylogyrus inversus</i>	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Lateolabracidae	CH	AY548928	Ding and Liao (não publicado)
<i>Euryhaliotrema perezponcei</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	Lutjanidae	Baía Cerritos, MX	HQ615996	Soler-Jiménez et al. (não publicado)
<i>Euryhaliotrematoides annulocirrus</i>	<i>Chaetodon vaganundus</i>	Chaetodontidae	AUT	AY820613	Plaisance et al. (2005)
<i>Euryhaliotrematoides microphallus</i>	<i>Heniochus chrysostomus</i>	Chaetodontidae	Palau	AY820617	Plaisance et al. (2005)
<i>Haliotrema angelopterum</i>	<i>Chaetodon kleinii</i>	Chaetodontidae	Palau	AY820620	Plaisance et al. (2005)
<i>Haliotrema aurigae</i>	<i>Chaetodon auriga</i>	Chaetodontidae	AUT	AY820621	Plaisance et al. (2005)
<i>Haliotrematoides guttati</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	Lutjanidae	Baía Cerritos, MX	HQ615993	Soler-Jiménez et al. (não publicado)
<i>Haliotrematoides spinatus</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	Lutjanidae	Costa do Pacífico, MX	KC663679	García-Vázquez et al. (não publicado)

<i>Ligictaluridus pricei</i>	<i>Ameiurus nebulosus</i>	Ictaluridae	Rio Moldau, RT	AJ969939	Šimková et al. (2006)
<i>Mymarothecium viatorum</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Serrasalmodidae	Rio Paraná, BR	Não disponível	Presente estudo
<i>Onchocleidus similis</i>	<i>Lepomis gibbosus</i>	Centrarchidae	Rio Danúbio, ES	AJ969938	Šimková et al. (2006)
<i>Onchocleidus</i> sp.	<i>Lepomis macrochirus</i>	Centrarchidae	Guangzhou, CH	AY841873	Ding e Liao (unpublished)
<i>Parasciadicleithrum octofasciatum</i>	<i>Rocio octofasciata</i>	Cichlidae	Riacho sem nome em Ejido Reforma Agraria, MX	KY305885	Mendoza-Palmero et al. (2017)
<i>Pseudodactylogyrus anguillae</i>	<i>Anguilla Anguilla</i>	Anguillidae	Rio Dunaj, ES	AJ969950	Šimková et al. (2006)
<i>Pseudodactylogyrus bini</i>	<i>Anguilla Anguilla</i>	Anguillidae	Lago Neusiedler, AUS	AJ969949	Šimková et al. (2006)
<i>Pseudohaliotrema sphincteroporos</i>	<i>Siganus doliatus</i>	Siganidae	Green Island, AUT	AF382058	Olson e Littlewood (2002)
<i>Quadriacanthus kobiensis</i>	<i>Clarias batrachus</i>	Clariidae	Guangzhou, CH	AY841874	Ding e Liao (2005)
<i>Sciadicleithrum meekii</i>	<i>Thorichthys meeki</i>	Cichlidae	Riacho sem nome em Ejido Reforma Agraria, MX	KY305889	Mendoza-Palmero et al. (2017)
<i>Sciadicleithrum splendidae</i>	<i>Parachromis friedrichsthalii</i>	Cichlidae	Lagoa El Vapor, MX	KY305890	Mendoza-Palmero et al. (2017)
<i>Tetrancistrum</i> sp.	<i>Siganus fuscescens</i>	Siganidae	Heron Island, AUT	AF026114	Mollaret et al. (1997)
<i>Thaparocleidus asoti</i>	<i>Parasilurus asotus</i>	Siluridae	Cidade Chongqing, CH	DQ157669	Wu et al. (2006)
<i>Thaparocleidus siluri</i>	<i>Silurus glanis</i>	Siluridae	Rio Morava, RT	AJ969940	Šimková et al. (2006)
<i>Unibarra paranoplatensis</i>	<i>Aguarunichthys torosus</i>	Pimelodidae	Santa Clara, PE	KP056219	Mendoza-Palmero et al. (2015)
<i>Vancleaveus janauacaensis</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	Doradidae	Rio Itaya, PE	KP056240	Mendoza-Palmero et al. (2015)
Pseudomurraytrematidae					
<i>Pseudomurraytrema</i> sp.*	<i>Catostomus ardens</i>	Catostomidae	Rio Snake, Idaho	AF382059	Olson e Littlewood (2002)
Tetraonchinea					
Anoplodiscidae					
<i>Anoplodiscus cirruspiralis</i> *	<i>Sparus aurata</i>	Sparidae	Sydney, AUT	AF382060	Olson e Littlewood (2002)
Tetraonchidae					
<i>Tetraonchus monenteron</i> *	<i>Esox lucius</i> (Linnaeus)	Esocidae	Rio Morava, RT	AJ969953	Šimková et al. (2006)
Monocotyliidea					
<i>Calicotyle affinis</i> *	<i>Chimaera monstrosa</i>	Chimaeridae	Noruega	AF382061	Olson e Littlewood (2002)
<i>Clemacotyle australis</i> *	<i>Aetobatus narinari</i>	Myliobatidae	Heron Island, AUT	AF348350	Chisholm et al. (2001)
<i>Decacotyle lymmae</i> *	<i>Aetobatus narinari</i>	Myliobatidae	Heron Island, AUT	AF348359	Chisholm et al. (2001)
<i>Dendromonocotyle octodiscus</i>	<i>Dasyatis americana</i>	Dasyatidae	Golfo do México	AF348352	Chisholm et al. (2001)

As seqüências em negrito foram obtidas no presente estudo. * Espécies usadas como grupos externos.

3.3 RESULTADOS

As novas sequências parciais de rDNA 28S foram obtidas para 9 espécies de *Anacanthorus* (*A. amazonicus*, *A. jegui*, *A. lepyrophallus*, *A. maltai*, *A. penilabiatus*, *A. rondonensis*, *A. thatcheri*, *Anacanthorus* sp. 1 e *Anacanthorus* sp. 2) e *Mymarothecium viatorum*, e elas variaram de 612 pb a 716 pb (quando utilizados os primers C1 e D2) e de 1425 pb a 1434 pb (quando utilizados os primers U178 e L1642). Os espécimes identificados como *Anacanthorus* sp. 1 e *Anacanthorus* sp. 2 representam duas espécies não descritas. Um alinhamento inequívoco de todas as espécies analisadas de Dactylogyridea e Monocotylidea abrangeu 391 posições e incluiu 205 caracteres informativos de parcimônia, 227 variáveis e 164 conservados. As análises de MV e IB geraram árvores filogenéticas com topologia similar e o monofilétismo de *Anacanthorus* foi fortemente suportado em ambas as análises (Figs. 1 e 2). Os Anacanthorinae, representados apenas por *Anacanthorus* spp. neste estudo, parece formar um grupo monofilético agrupando-se junto com o clado A que inclui somente Ancyrocephalinae de água doce e o clado de Ancylo-discoidinae. *A. penilabiatus* teve uma posição basal dentro do clado de *Anacanthorus*. Embora as árvores filogenéticas de MV e IB apresentem a mesma topologia, a relação de *Anacanthorus* como um grupo irmão do clado A de Ancyrocephalinae de água doce foi fracamente suportada usando a análise de MV. *Mymarothecium viatorum*, outro monogenético parasito de peixes serrasalmídeos, foi posicionado dentro do clado A de Ancyrocephalinae.

O clado B, incluindo representantes de espécies de água doce e marinha de Ancyrocephalinae, foi bem suportado pela análise de IB, mas não na análise de MV. Os Dactylogyrinae formaram um grupo monofilético irmão de Pseudodactylogyrinae (apenas fracamente suportado) e agrupado com o clado B de Ancyrocephalinae. Dentro do clado B de Ancyrocephalinae, 5 espécies marinhas formaram um grupo bem suportado (clado C) com base nas análises de IB e MV.

Dentro de Anacanthorinae, ou seja, *Anacanthorus*, usando a análise de MV, as relações filogenéticas entre *Anacanthorus* parecem refletir a filogenia de seus hospedeiros serrasalmídeos. *A. penilabiatus* de *Piaractus mesopotamicus*, membro do clado dos “pacus”, tem a posição basal dentre as espécies de *Anacanthorus* seguido da posição de *Anacanthorus* sp. 2 de *Myleus setiger* (esta posição foi fracamente ou moderadamente suportada pelas análises de IB e MV, respectivamente), representante do clado “*Myleus*-like pacus”. Finalmente, o grande grupo de *Anacanthorus* inclui dois cladogramas das espécies dos representantes da linhagem das “piranhas verdadeiras”, o primeiro bem suportado incluindo *A. lepyrophallus* e *A. amazonicus*, o seguinte incluindo *Anacanthorus* sp. 1, *A. jegui*, *A. thatcheri* e *A. maltai*. *A. rondonensis* de *Pygocentrus nattereri*, um representante da linhagem das “piranhas verdadeiras”, teve a posição basal neste grande grupo de *Anacanthorus*.

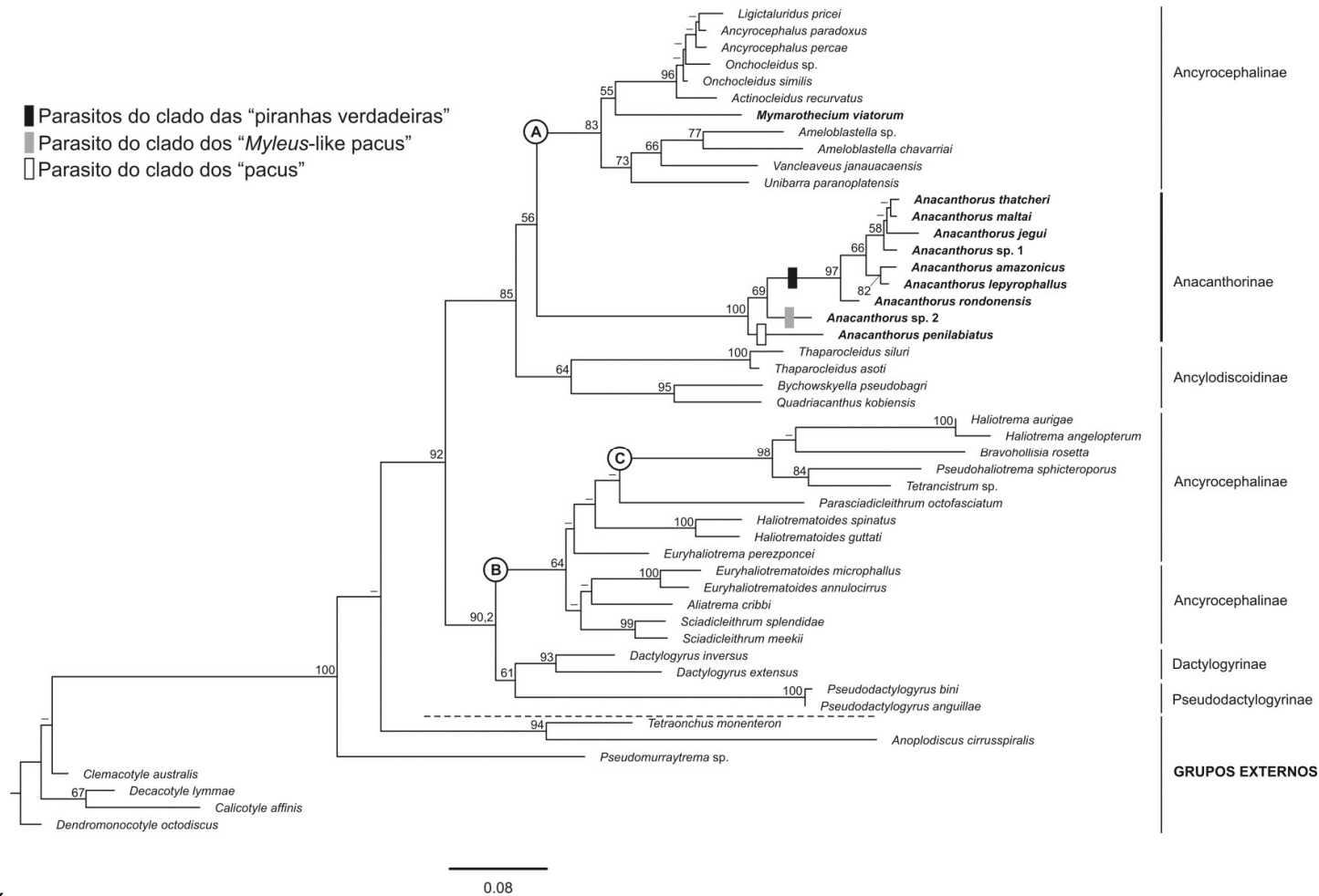


Figura 1. Árvore filogenética derivada da análise de máxima verossimilhança (MV) de seqüências parciais de 28S rDNA de 49 espécies de monogenéticos. Os valores de suporte (bootstrap) da MV são exibidos nos nós. Valores bootstrap < 50 não são relatados. As espécies sequenciadas no presente estudo são exibidas em negrito.

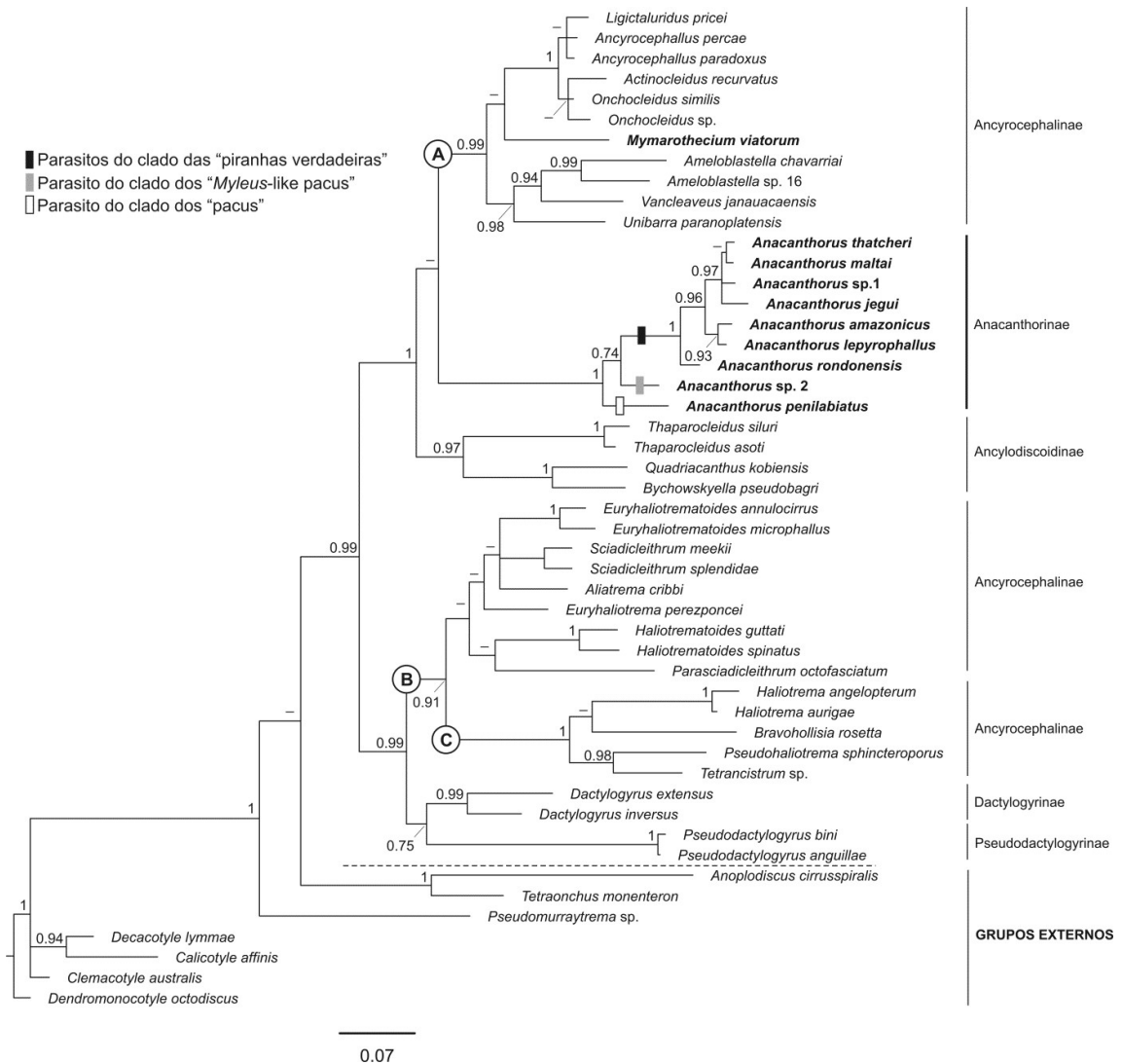


Figura 2. Consenso da topologia Bayesiana da análise filogenética de sequências parciais de 28S rDNA de 49 espécies de monogenéticos. Os valores de suporte das probabilidades posteriores da Inferência Bayesiana são exibidos nos nós. Probabilidades posteriores < 0.7 não são relatadas. As espécies sequenciadas no presente estudo são exibidas em negrito.

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a posição filogenética de *Anacanthorus* dentro dos Dactylogyridae foi avaliada pela primeira vez com base nas análises de sequências parciais de 28S rDNA. Representantes de 5 subfamílias dentro dos Dactylogyridae, isto é, Ancyrocephalinae, Ancylodiscoidinae, Anacanthorinae, Dactylogyrinae e Pseudodactylogyrinae, foram incluídos nas análises. Usando dados moleculares, confirmamos a monofilia dos Anacanthorinae (aqui representada apenas por *Anacanthorus*) de acordo com os estudos anteriores baseados em caracteres morfológicos (KRITSKY e BOEGER, 1989; VAN EVERY e KRITSKY, 1992), embora não tenhamos incluído nenhum membro de *Anacanthoroides* nas análises filogenéticas.

Nossos resultados mostraram que os padrões filogenéticos entre *Anacanthorus* spp. correspondem aos de seus hospedeiros Characiformes, especialmente os dos Serrasalmidae. Ortí et al. (1996) inferiram a primeira filogenia molecular de Serrasalmidae usando marcadores mtDNA (12S e 16S rRNA), e encontraram as três principais linhagens, uma incluindo o “pacus” na posição mais basal, seguida pelo clado incluindo os “*Myleus*-like pacus” e por um clado que inclui o grupo mais diversificado de Serrasalmidae, representado pelas “piranhas verdadeiras”. Eles também encontraram o posicionamento de *Acnodon* como um grupo irmão das duas últimas linhagens e também sugeriram a parafilia de alguns gêneros, como *Myleus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*. Mais tarde Ortí et al. (2008) realizaram uma análise baseada em sequências completas da região de controle do mtDNA (D-loop) e em sequências parciais de 12S e 16S rRNA e seus achados corroboraram com a divisão anterior de três linhagens principais, e também sugeriram que *Pristobrycon*, *Myloplus* e *Tometes* não são monofiléticos. Mais recentemente, Thompson et al. (2014) realizaram uma robusta análise filogenética baseada em sequências de 10 genes nucleares (2 exons e 8 introns) e da região controle do mtDNA. Seus resultados também concordaram com os estudos anteriores sobre as relações filogenéticas dentro dos serrasalmídeos baseadas no mtDNA, mostraram a não-monofilia de *Pristobrycon*, *Tometes*, *Myloplus*, *Mylesinus* e também da suposta espécie *Serrasalmus rhombeus*, confirmando que ainda existem muitas lacunas para resolver na taxonomia deste grupo de peixes.

Nossos resultados podem sugerir que os processos de coespeciação desempenharam um papel entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos (pelo menos no nível das três linhagens de serrasalmídeos). Recentemente, Graça et al. (2018) sugeriram que há coespeciação entre *Anacanthorus* e suas linhagens hospedeiras representando as diferentes famílias (Serrasalmidae, Bryconidae e Erythrinidae), embora as duplicações tenham sido o evento coevolutivo mais frequente na especiação de *Anacanthorus* parasitando espécies da mesma família. De fato, a coespeciação entre monogenéticos e seus hospedeiros não tem sido significativa em alguns grupos extensivamente estudados, como *Lamellodiscus* (DESDEVISES et al., 2002), *Gyrodactylus* (ZIETARA e LUMME, 2002), *Dactylogyrus* (ŠIMKOVÁ et al., 2004, 2006) e *Cichlidogyrus* (MENDLOVÁ et al., 2012).

As relações filogenéticas entre *Anacanthorus* spp. parecem refletir também a similaridade na morfologia do complexo copulador. Embora não tenhamos analisado as mesmas espécies previamente avaliadas por Van Every e Kritsky (1992), sua reconstrução filogenética usando morfologia de complexos copuladores é semelhante à nossa reconstrução filogenética usando dados moleculares (considerando a mesma espécie em ambas as análises). No entanto, para investigar com eficácia a congruência de filogenias construídas sobre dados moleculares e morfológicos, é necessário realizar um sequenciamento para um grande conjunto de espécies de *Anacanthorus* em estudos futuros potencialmente focados no mapeamento dos caracteres dos complexos copuladores para a reconstrução filogenética molecular.

De acordo com nossos resultados, as espécies de *Anacanthorus* parecem estar relacionadas a alguns membros de água doce de Ancyrocephalinae (clade A) e espécies de

Ancylo-discoidinae, entretanto como os valores de suporte para este clado em ambas análises foram baixos, suas relações permanecem inconclusivas. *Mymarothecium viatorum*, parasito exclusivo da linhagem dos “pacus”, foi posicionado entre os Ancyrocephalinae de água doce (clado A). Usando o 18S rDNA completo, Müller et al. (2016) mostraram que *M. viatorum* se agrupa com *A. penilabiatus*. Ambos os marcadores ribossômicos (28S e 18S rDNA) têm sido amplamente utilizados para reconstruir filogenias de monogenéticos e, em muitos casos, produziram topologias semelhantes (por exemplo, PLAISANCE et al., 2005; FRANCOVÁ et al., 2017; VERMA et al., 2017). Assim, o achado de Müller et al. (2016) provavelmente se deve à falta de sequências de espécies intimamente relacionadas às espécies de *Anacanthorus* (ou seja, ausência dos representantes de Ancyrocephalinae de água doce).

Concluimos que *Anacanthorus* e seus hospedeiros podem fornecer um modelo útil para estudar biogeografia e coevolução nos neotrópicos. No entanto, estudos futuros são necessários com foco em uma ampla variedade de hospedeiros e espécies de *Anacanthorus*, e também em representantes de outros gêneros que parasitam serrasalmídeos para investigar as relações filogenéticas entre estes diversos monogenéticos parasitando o mesmo grupo hospedeiro.

CAPÍTULO III –

INTERAÇÕES COFILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Anacanthorus* (MONOGENEA: DACTYLOGYRIDAE) E SEUS HOSPEDEIROS SERRASALMÍDEOS (CHARACIFORMES)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a história coevolutiva entre *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos de duas diferentes bacias brasileiras para elucidar o processo de especiação das espécies de *Anacanthorus* desse sistema parasito-hospedeiro. A filogenia molecular dos serrasalmídeos estudados foi reconstruída a partir de sequências parciais do gene mitocondrial 16S obtidas no presente estudo juntamente com sequências previamente publicadas. A filogenia das espécies de *Anacanthorus* foi reconstruída a partir de sequências parciais de 28S obtidas no presente estudo. A análise baseada em distância (AxParafit) rejeitou a hipótese de coespeciação global neste sistema parasito-hospedeiro. O método baseado nas árvores revelou que a história evolutiva do sistema *Anacanthorus*-Serrasalmidae foi conduzida por múltiplos mecanismos de especiação. Coespeciação foi identificada, porém, apenas a níveis mais elevados, como linhagem de hospedeiros e gênero.

Palavras-chave: 28S rDNA, coevolução, 16S mtDNA, peixe, Anacanthorinae, Brasil.

ABSTRACT

The goal of the present study was to investigate the coevolutionary history between *Anacanthorus* spp. and their serrasalmid hosts from two Brazilian River basins to elucidate the speciation process of the species of *Anacanthorus* of this host-parasite system. The molecular phylogeny of the studied serrasalmids was reconstructed from partial 16S mitochondrial gene sequences. The phylogeny of the *Anacanthorus* species was reconstructed from the 28S partial sequences obtained in the present study. The distance-based analysis (AxParafit) rejected the hypothesis of global cospeciation in this host-parasite system. The tree-based method revealed that the evolutionary history of the *Anacanthorus*-Serrasalmidae system was driven by multiple mechanisms of speciation. Cospeciation was identified, however, only at higher levels, such as host lineage and genera.

Key words: 28S rDNA, coevolution, 16S mtDNA, fish, Anacanthorinae, Brazil.

4.1 INTRODUÇÃO

Os processos coevolutivos em sistemas parasito-hospedeiro têm sido alvo de vários estudos ao longo dos anos (BROOKS, 1979; BROOKS e MCLENNAN, 1993; BOEGER et al., 1997; DESDEVISES et al., 2002; ŠIMKOVÁ et al., 2004). Devido à sua especificidade, diferentes gêneros de monogenéticos já foram investigados neste contexto, como *Dactylogyrus* parasitos de Cyprinidae (ŠIMKOVÁ et al., 2004), *Lamellodiscus* parasitos de Sparidae (DESDEVISES et al., 2002), *Gyrodactylus* parasitos de diversos peixes marinhos e dulcícolas (ZIETARA e LUMME, 2002; HUYSE et al., 2003; HUYSE e VOLCKAERT, 2005), *Polystoma* parasitos de anfíbios (BENTZ et al., 2001) e *Cichlidogyrus* parasitos de Cichlidae (MENDLOVÁ et al., 2012).

O termo coevolução se refere ao processo de mudança genética adaptativa recíproca em duas ou mais espécies (BROOKS, 1987; WOOLHOUSE et al., 2002; BANKS e PATERSON, 2005). Foram definidos quatro tipos de eventos coevolutivos básicos: coespeciação (especiação simultânea entre hospedeiro e parasito), troca de hospedeiros (colonização de um novo hospedeiro por um parasito), duplicação (quando ocorre a especiação de um parasito e ambas as espécies permanecem no mesmo hospedeiro), e evento de separação ou falha para divergir (quando a especiação do hospedeiro não é seguida pela especiação do parasito) (PAGE, 1994a; PAGE e CHARLESTON, 1998; CONOW et al., 2010).

A família Serrasalminae compreende atualmente 98 espécies válidas de peixes de água doce, incluindo espécies como o tambaqui, os pacus e as piranhas, que estão distribuídas ao longo de toda a América do Sul (FROESE e PAULY, 2018). Diferentes estudos filogenéticos corroboram com a divisão da família Serrasalminae em três linhagens principais: “pacus” (*Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*), “*Myleus* tipo pacus” (*Mylesinus*, *Myleus*, *Ossubtus* e *Tometes*) e “piranhas verdadeiras” (*Catoprion*, *Metynnis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus*) (ORTÍ et al., 1996, 2008; THOMPSON et al., 2014). E este grupo de peixes em particular é conhecido por abrigar uma grande diversidade de monogenéticos (15 gêneros), incluindo espécies de *Anacanthorus*, um dos gêneros neotropicais mais diversos (BOEGER e VIANNA, 2006, COHEN et al., 2013).

Atualmente o gênero *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965 é composto por 73 espécies parasitas de peixes Characiformes (Bryconidae, Characidae e Serrasalminae) da região Neotropical, das quais 36 espécies são exclusivamente parasitas de serrasalmídeos (COHEN et al. 2013; LEÃO et al., 2015). A associação parasito-hospedeiro entre espécies de *Anacanthorus* e seus hospedeiros Characiformes já foi estudada anteriormente por Van Every e Kritsky (1992) utilizando uma abordagem morfológica, revelando que este grupo forneceria um bom modelo para estudos coevolutivos e biogeográficos e, mais recentemente, por Graça et al. (2018), que conseguiram demonstrar uma coespeciação nesse sistema ao nível das famílias hospedeiras, através de uma abordagem molecular.

O objetivo deste estudo foi reconstruir a filogenia molecular dos hospedeiros (serrasalmídeos) e seus monogenéticos parasitos (*Anacanthorus* spp.) para investigar sua história cofilogenética e elucidar o processo de especiação das espécies de *Anacanthorus* desse sistema parasito-hospedeiro.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e processamento de amostras

Os peixes foram capturados por pescadores locais com redes de emalhar e ganchos das seguintes localidades no Brasil: Rio Miranda (20°11'27" S; 56°30'19" O) e Rio Negro (19°34'40" S; 56°09'08" O), Pantanal, Mato Grosso do Sul; Alto Rio Paraná (20°45' S; 53°16' O), Porto Rico, Paraná; e Rio Xingu (3°12' S, 52°12' O), Altamira, Pará (ver Tabela 1). Os peixes foram examinados para a presença de monogenéticos imediatamente após a captura. As brânquias extraídas dos peixes foram colocadas em placas de Petri com água da torneira e examinadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os espécimes foram colocados individualmente em uma gota de água em uma lâmina e o haptor de cada espécime foi retirado do corpo para análises moleculares e preservado em etanol absoluto. O restante do corpo foi montado em uma mistura de glicerina e picrato de amônio (GAP) e mantido como comprovante molecular. Além disso, alguns espécimes inteiros foram montados em GAP e mantidos como espécimes paragenóforos (ver ASTRIN et al., 2013 para terminologia). As determinações de espécies foram baseadas principalmente na morfologia do órgão copulador masculino e dos ganchos haptorais seguindo as descrições originais de Boeger e Kritsky (1988), Van Every e Kritsky (1992) e Boeger et al. (1995). Após avaliação morfológica, os espécimes fixados em GAP foram remontados em bálsamo do Canadá de acordo com o procedimento de Ergens (1969). Os espécimes representativos serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil e na Coleção Helmintológica do Instituto de Parasitologia da Academia Tcheca de Ciências (IPCAS), República Tcheca.

Tabela 1. Lista de espécies de *Anacanthorus* obtidas no presente estudo, com seus respectivos hospedeiros serrasalmídeos e localidades.

Parasito	Hospedeiro	Localidade
Dactylogyridea		
Dactylogyridae		
<i>Anacanthorus amazonicus</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Rio Negro, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil
<i>Anacanthorus jegui</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Rio Negro, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil
<i>Anacanthorus lepyrophallus</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Rio Baía, Estado do Paraná, Brasil
<i>Anacanthorus maltai</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Rio Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil
<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Rio Paraná, Estado do Paraná, Brasil
<i>Anacanthorus rondonensis</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Rio Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil
<i>Anacanthorus thatcheri</i>	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Rio Miranda, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil
<i>Anacanthorus</i> sp. 1	<i>Serrasalmus marginatus</i>	Rio Paraná, Estado do Paraná, Brasil
<i>Anacanthorus</i> sp. 2	<i>Myleus setiger</i>	Rio Xingu, Estado do Pará, Brasil

2.2.2 Análise molecular dos parasitos

O DNA foi extraído em 200 µl de uma suspensão de 5% de Chelex™ em água deionizada contendo 2 µl de proteinase K, seguida de incubação a 56°C por 3 h, fervendo a 95°C por 8 min. A região do gene parcial da subunidade maior do DNA ribossomal (28S rRNA, domínios D1-D3) foi amplificada usando os primers C1 e D2 (HASSOUNA et al., 1984) ou U178 e L1642 (LOCKYER et al., 2003). Para o último par de primers, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1 x PCR buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada primer oligonucleotídico, 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 mg/ml de BSA e 2,5 µl de DNA genômico, utilizando os parâmetros de ciclagem descritos em Mendoza-Palmero et al. (2015). Para os primers C1 e D2, as reações de PCR foram realizadas num volume final de 15 µl contendo 1 x tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de cada primer oligonucleotídico, 1 U de DNA polimerase Taq (Fermentas) 6,6 mg/ml de BSA e 5 µl de DNA genômico, usando os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação a 94°C por 2 min, seguida por 39 ciclos de 94°C por 20 s, anelamento a 58°C por 30 s e alongamento a 72°C durante 1 min 30 s, com um alongamento final a 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o kit ExoSAP-IT (Ecoli, Bratislava, SK) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados diretamente usando os pares de primers da PCR C1 – D2 ou U178 – L1642 e dois primers internos adicionais (1200F e 1200R, ver LOCKYER et al., 2003) com um kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). O sequenciamento foi realizado em um ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequências contíguas foram geradas no software Geneious (Geneious ver. 9 criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>) e depositadas no banco de dados GenBank porém os números de acesso ainda não foram disponibilizados.

4.2.3 Análise molecular dos hospedeiros

Amostras de tecido do hospedeiro foram preservadas em etanol absoluto para posterior extração de DNA. O DNA foi extraído com o Kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A região do gene parcial mitocondrial 16S rRNA foi amplificada usando os primers 16Sar-L e 16Sbr-H (PALUMBI et al. 1991). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo 1 x PCR buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,3 mM de cada primer oligonucleotídico, 1,2 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 6 µl de DNA genômico, utilizando os parâmetros de ciclagem descritos em Hilsdorf et al. (2008). Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o kit ExoSAP-IT (Ecoli, Bratislava, SK) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados diretamente usando os pares de primers da PCR 16Sar-L e 16Sbr-H com um kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). O sequenciamento foi realizado em um ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequências contíguas foram geradas no software Geneious (Geneious ver. 9 criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>) e serão depositadas no banco de dados GenBank.

4.2.4 Análises filogenéticas e cofilogenéticas

As sequências foram alinhadas com o algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) implementado no Geneious. As sequências de *Leporinus obtusidens* e *Ligictaluridus pricei* foram obtidas do Genbank e utilizadas como grupos externos nos alinhamentos dos hospedeiros e dos parasitos, respectivamente. O método de Máxima Verossimilhança (MV) foi utilizado para a reconstrução filogenética das espécies de *Anacanthorus* e dos peixes serrasalmídeos. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado pelo jModelTest, o modelo de substituição GTR + G, foi selecionado para o alinhamento dos parasitos e o modelo de substituição TIM2 + I foi selecionado para os hospedeiros. A busca pela árvore de MV e a reamostragem de bootstrap com 1.000 replicações foram realizadas utilizando PHYML (GUINDON e GASCUEL, 2003) implementado no Geneious. Nas árvores filogenéticas resultantes, o suporte dos cladogramas, indicado pelos valores de bootstrap, foi considerado da seguinte maneira: suporte fraco 50-63%, suporte moderado 64-75%, bom suporte 76-88% e suporte forte 89-100% (YANG et al., 2006).

Dois métodos de análise coevolutivos foram usados: um método baseado em distância chamado AxParaFit (STAMATAKIS et al., 2007) implementado no software CopyCat (Cophylogenetic Analysis Tool) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2007) e um método baseado em árvore implementado no software Jane 4.0 (CONOW et al., 2010).

A análise do AxParafit utiliza as distâncias patrísticas das árvores dos parasitos e dos hospedeiros e uma matriz das associações parasito-hospedeiro para realizar testes estatísticos que visam detectar a presença de congruência global entre as filogenias do hospedeiro e do parasito, assim como a significância de associações parasito-hospedeiro individuais (MEIER-KOLTHOFF et al., 2007). O nível de significância adotado para o teste do AxParafit foi de 0,02

A análise do Jane 4.0 tenta encontrar um mapeamento da árvore do parasito para a árvore do hospedeiro, assumindo alguma combinação de eventos de coespeciação, duplicação, duplicação com troca de hospedeiro, perda e falha em divergir (termos definidos na introdução). Cada um desses cinco tipos de eventos tem um custo associado que pode ser especificado pelo usuário, buscando encontrar um mapeamento com o menor custo total (CONOW et al., 2010). Esta análise foi realizada com a configuração padrão do software para os custos e gerações.

. Um *tanglegram* (diagrama comparativo entre duas árvores filogenéticas) representando as associações parasito-hospedeiro foi reconstruído utilizando o software TreeMap 1.0 (PAGE, 1994b).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise filogenética

As sequências parciais de rDNA 28S das espécies de *Anacanthorus* variaram de 612 pb a 716 pb (quando utilizados os primers C1 e D2) e de 1425 pb a 1434 pb (quando utilizados os primers U178 e L1642), e as sequências parciais de 16S rRNA dos hospedeiros variaram de 588 pb a 611 pb. Um alinhamento inequívoco de todas as espécies analisadas de *Anacanthorus* abrangeu 626 posições e o alinhamento das espécies analisadas de serrasalmídeos abrangeu 605 posições.

As espécies de *Anacanthorus* se dividiram em 3 clados principais (Fig. 1), o clado A contendo a espécie *A. penilabiatus* parasita da linhagem dos “pacus”, o clado B contendo *Anacanthorus* sp. 2 que parasita uma espécie pertencente à linhagem dos “*Myleus* tipo pacus” e o clado C incluindo as espécies parasitas da linhagem das “piranhas verdadeiras”. Estas divisões foram fortemente suportadas, porém as relações interespecíficas das espécies do clado C foram moderadamente suportadas.

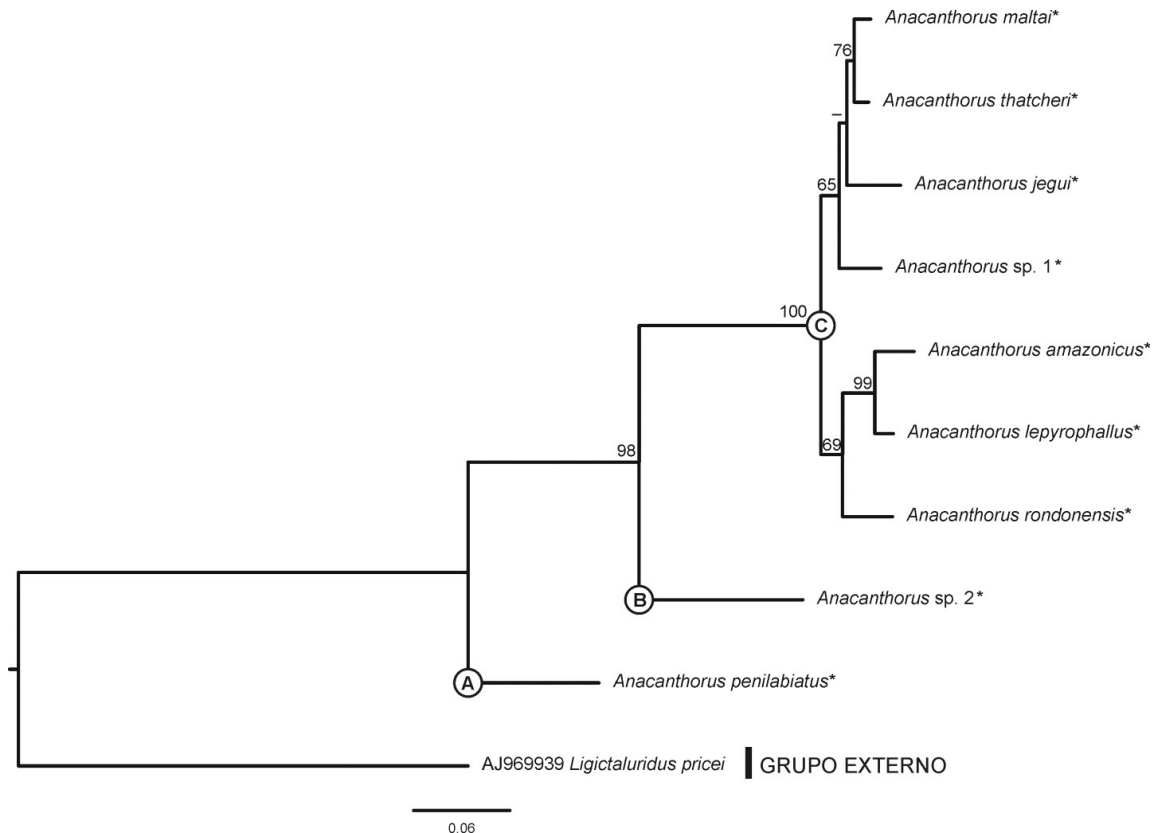


Figura 1. Árvore de Máxima Verossimilhança inferida a partir de sequências parciais de 28S rDNA de *Anacanthorus* spp. A espécie *Ligictaluridus pricei* (Muller, 1936) (GenBank AJ969939) foi utilizada como grupo externo. (-) valores de bootstrap abaixo de 50. (*) espécies sequenciadas no presente estudo. Os números de acesso das sequências obtidas no presente estudo ainda não estão disponíveis.

Em relação aos serrasalmídeos, a situação foi similar, as espécies também se dividiram em 3 clados principais (Fig. 2), o mais basal (clado A) incluindo o pacu *Piaractus mesopotamicus*, o clado B contendo as espécies *Tometes kranponhah* e *Myleus setiger*, ambos pertencentes à linhagem dos “*Myleus* tipo pacu” e o clado C abrangendo as espécies do gênero *Serrasalmus* e *Pygocentrus nattereri* integrantes da linhagem das “piranhas verdadeiras”. A divisão dos serrasalmídeos estudados foi fortemente suportada. As relações interespecíficas das espécies do clado B foram bem suportadas, enquanto as do clado C tiveram baixo suporte, indicando que suas relações ainda são incertas.

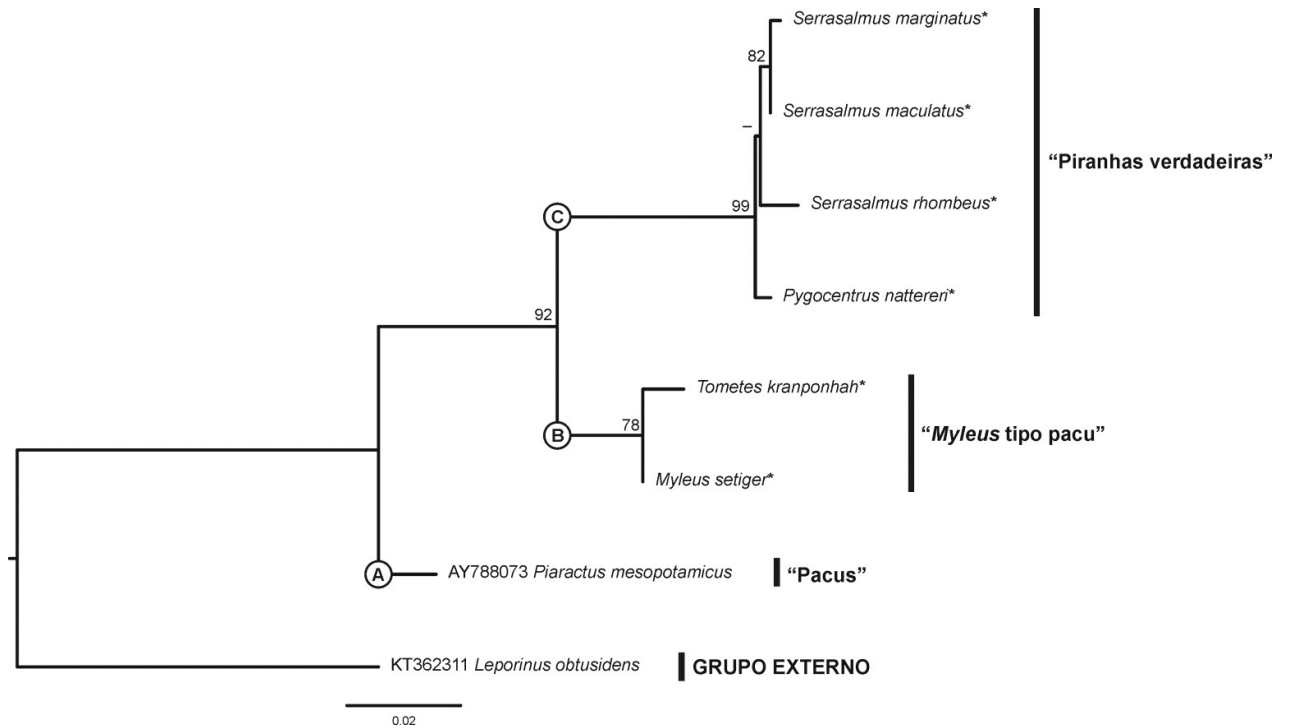


Figura. 2. Árvore de Máxima Verossimilhança inferida a partir de sequências parciais de 16S rRNA dos hospedeiros serrasalmídeos. A espécie *Leporinus obtusidens* (Valenciennes) (GenBank KT362311) foi utilizada como grupo externo. (-) valores de bootstrap abaixo de 50. (*) espécies sequenciadas no presente estudo. Os números de acesso das sequências obtidas no presente estudo ainda não estão disponíveis.

O tanglegram indicou uma alta congruência entre as árvores dos hospedeiros e dos parasitos em relação às linhagens dos hospedeiros (Fig. 3).

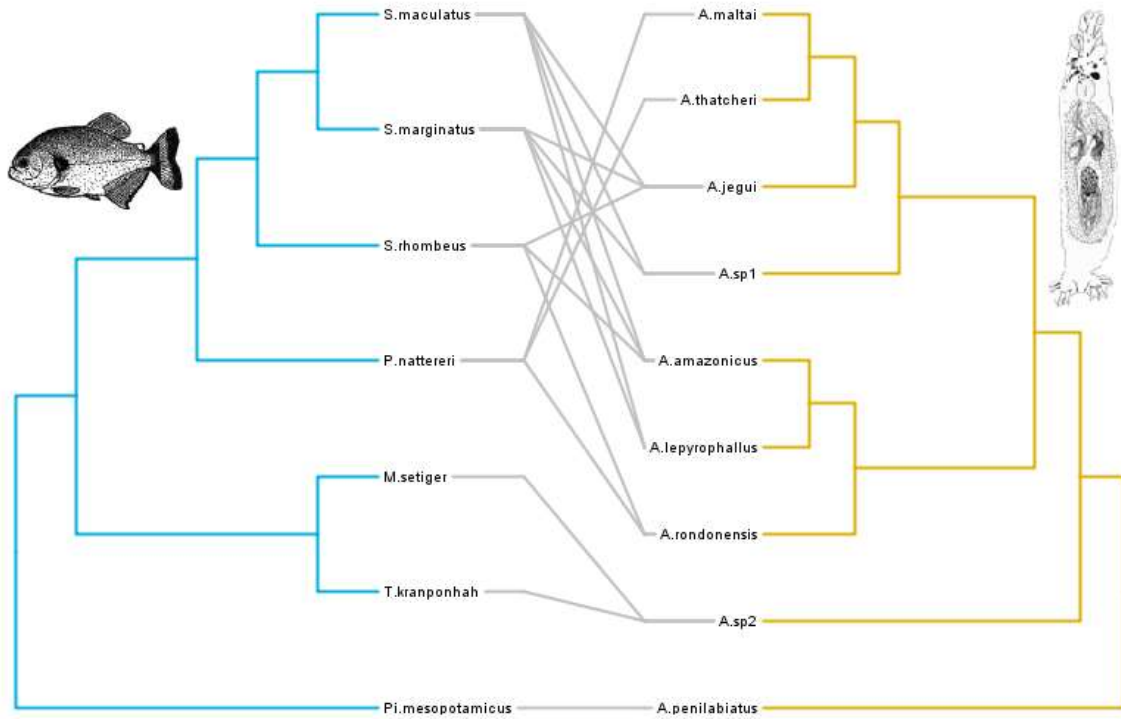


Figura 3. Tanglegram de *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos obtido da comparação da árvore de Máxima Verossimilhança dos parasitos construída utilizando sequências parciais de 28S com a árvore dos hospedeiros resultante da análise filogenética de sequências de 16S. A ilustração do peixe foi obtida de Machado-Allison e Fink (1995) e a ilustração de *Anacanthorus* foi obtida de Van Every e Kritsky (1992).

4.3.2 Análise cofilogenética

Utilizando o AxParafit, a estrutura cofilogenética global não foi significativa ($p = 0,11712$). Houve apenas uma conexão individual significativa, isto é, *M. setiger*–*Anacanthorus* sp. 2 ($p = 0,01301$), sugerindo coespeciação nesta associação.

O esquema de menor custo retornado pelo Jane (Fig. 4) correspondeu a duas coespeciações, cinco duplicações, uma duplicação seguida por troca de hospedeiros, uma perda e oito falhas para divergir.

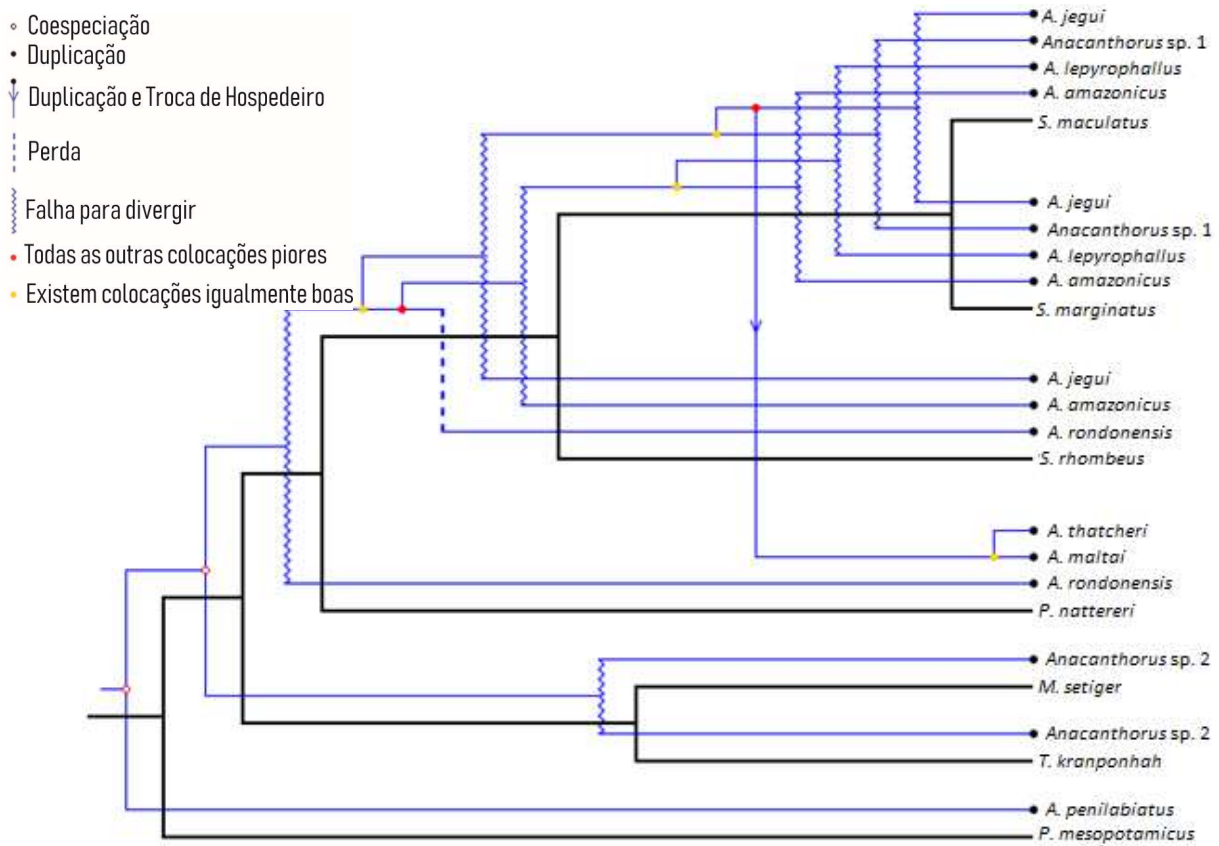


Figura 4. Uma das 4 possíveis reconstruções cofilogenéticas de *Anacanthorus* spp. e seus hospedeiros serrasalmídeos geradas pelo Jane. As ramificações pretas (independentes) representam a filogenia do hospedeiro. As ramificações azuis (dependentes) correspondem à filogenia dos parasitos. Os eventos e custos considerados foram coespeciação (0), duplicação (1), duplicação e troca de hospedeiro (2), perda (1) e falha para divergir (1).

4.4 DISCUSSÃO

Apesar da congruência entre as árvores dos parasitos e dos hospedeiros ao nível da linhagem dos hospedeiros, no presente estudo, a análise baseada em distância sugere que a estrutura cofilogenética global no sistema *Anacanthorus*-Serrasalminidae não é significativo. Porém no teste de conexões individuais parasito-hospedeiro, a associação *M. setiger*-*Anacanthorus* sp. 2 foi estatisticamente significativa, e de acordo com Legendre et al. (2002), quando o teste global não é significativo e o teste de conexões individuais revela associações significantes, provavelmente estamos lidando com uma estrutura mista que contém uma porção aleatória e uma porção coevolutiva.

Os resultados obtidos pela análise baseada em árvores revelaram que a coespeciação, a duplicação, a troca de hospedeiros, a perda e a falha para divergir desempenharam um papel na condução da especiação no sistema *Anacanthorus*-Serrasalminidae estudado no presente trabalho. Dentre estes, os processos de falha para divergir e duplicação parecem desempenhar os papéis mais importantes na história evolutiva desse sistema parasito-hospedeiro. Porém a alta quantidade de falhas para divergir provavelmente se deve ao fato de que algumas espécies desse sistema parasito-hospedeiro podem ser consideradas generalistas, parasitando mais de dois hospedeiros, sendo muito similar ao padrão observado por Desdés et al. (2002) entre as espécies de *Lamellodiscus* e os peixes da família Sparidae. As duplicações explicando a diversificação de monogenéticos tem sido observada em diversos sistemas parasito-hospedeiro como *Dactylogyrus*-Cyprinidae (ŠIMKOVÁ et al., 2004) e *Thaparocleidus*-Pangasiidae (ŠIMKOVÁ et al., 2013).

Embora tenhamos usado um diferente conjunto de espécies e diferentes marcadores moleculares, os resultados obtidos na análise baseada em árvores corroboram com os obtidos no estudo de Graça et al. (2018), pois os eventos de coespeciação também se deram nos níveis mais elevados, ao nível de linhagem dos hospedeiros (*Myleus* tipo pacu) e gênero (*Piaractus*), que, como afirmaram os autores, podem estar ligados a eventos biogeográficos.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A fauna de monogenéticos parasitos de serrasalmídeos é extremamente rica e diversa, porém o encontro de duas espécies desconhecidas de *Anacanthorus* reitera que o nosso conhecimento da mesma ainda é incipiente.
- O uso da taxonomia integrativa no estudo dos monogenéticos auxilia na validação de espécies além de fornecer dados para estudos futuros em diferentes abordagens.
- A análise filogenética dos anacantoríneos baseada no gene 28S rDNA revelou que eles formam um grupo monofilético dentro de Dactylogyridae, corroborando com estudos prévios baseados em morfologia.
- Apesar da sua alta especificidade, nosso estudo mostrou que a coespeciação não foi o evento coevolutivo mais frequente na história evolutiva das espécies de *Anacanthorus* estudadas, corroborando com os estudos coevolutivos mais recentes de monogenéticos.
- O gênero *Anacanthorus* é composto por mais de 70 espécies válidas, e, portanto, mais estudos envolvendo diferentes conjuntos de espécies são necessários para desvendar a história evolutiva desse gênero tão diverso.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **So Fruitful a Fish: Ecology, Conservation, and Aquaculture of the Amazon's Tambaqui**. Columbia University Press, New York, USA, 1997, 191 p.
- ASTRIN, J. J.; ZHOU, X.; MISOF, B. The importance of biobanking in molecular taxonomy, with proposed definitions for vouchers in a molecular context. **ZooKeys**, v. 635, p. 67–70, 2013.
- BAKKE, T. A.; CABLE, J.; HARRIS, P. D. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian-doll killers”. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 161–460, 2007.
- BAKKE, T. A.; HARRIS, P. D.; CABLE, J. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 281–308, 2002.
- BAKKE, T. A.; HARRIS, P. D.; JANSEN, P. A.; HANSEN, L. P. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 13, p. 63–74, 1992.
- BANKS, J. C.; PATERSON, A. M. Multi-host parasite species in cophylogenetic studies. **International Journal for Parasitology**, v. 35, 741–746, 2005.
- BAVERSTOCK, P. R.; FIELKE, R.; JOHNSON, A. M.; BRAY, R. A.; BEVERIDGE, I. Conflicting phylogenetic hypotheses for the parasitic platyhelminths tested by partial sequencing of 18S ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 329–339, 1991.
- BEAUCHAMP, P. DE. *Isancistrum loliginis* n.g. n.sp. trematode parasite du Calmar et l'inexistence de *Solencotyle chiajei* Diesing. **Bulletin de la Société zoologique de France**, v. 37, p. 96–99, 1912.
- BENTZ, S.; LEROY, S.; DU PREEZ, L.; MARIAUX, J.; VAUCHER, C.; VERNEAU, O. Origin and evolution of African *Polystoma* (Monogenea: Polystomatidae) assessed by molecular methods. **International Journal for Parasitology**, v. 31, 697–705, 2001.
- BERHRMANN-GODEL, J.; ROCH, S.; BRINKER, A. Gill worm *Ancyrocephalus percae* (Ergens 1966) outbreak negatively impacts the Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. stock of Lake Constance, Germany. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 925–930, 2013.
- BLAIR, D. The phylogenetic position of the Aspidobothrea within the parasitic flatworms inferred from ribosomal RNA sequence data. **International Journal for Parasitology**, v. 23, p. 169–178, 1993.
- BOEGER, W. A.; HUSAK, W. S.; MARTINS, M. L. Neotropical Monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatus* n. sp. (Dactylogyridae, Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Serrasalminae), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 699–701, 1995.
- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Phylogeny and a revised classification of the Monogenoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes). **Systematic Parasitology**, v. 26, 1–32, 1993.

- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Coevolution of the Monogenoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 1495–1511, 1997.
- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Neotropical Monogenea. 12. Dactylogyridae from *Serrasalmus nattereri* (Cypriniformes, Serrasalminidae) and aspects of their morphologic variation and distribution in the Brazilian Amazon. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 55, p. 188–213, 1988.
- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. Em: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (eds.) **Interrelationships of the Platyhelminthes**. Taylor & Francis, London, 2001, p. 92–98.
- BOEGER, W. A.; VIANNA, R. T. Monogenoidea. In: THATCHER, V. E. (ed). **Amazon Fish Parasites**, 2nd edn. Bulgaria: Pensoft, 2006, p. 42–116.
- BONETT, M. R.; STEFFEN, M. A. A.; TRUJANO-ALVAREZ, L.; MARTIN, S. D.; BURSEY, C. R.; MCALLISTER, C. T. Distribution, abundance, and genetic diversity of *Clinostomum* spp. metacercariae (Trematoda: Digenea) in a modified Ozark stream system. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 177–184, 2011.
- BROOKS, D. R. Testing the context and extent of host-parasite coevolution. **Systematic Zoology**, v. 28, p. 299–307, 1979.
- BROOKS, D. R. Analysis of host-parasite coevolution. **International Journal for Parasitology**, v. 17, p. 291–297, 1987.
- BROOKS, D. R. The phylogeny of the Cercomeria (Platyhelminthes: Rhabdocoela) and general evolutionary principles. **Journal of Parasitology**, v. 75, 606–616, 1989.
- BROOKS, D. R.; MCLENNAN, D. A. **Parascript: parasites and the language of evolution**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993, p. 429.
- BROOKS, D. R.; O'GRADY, R. T.; GLEN, D. R. The phylogeny of the cercomeria Brooks, 1982 (Platyhelminthes). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 52, p. 1–20, 1985.
- BYCHOWSKY, B. E. **Monogenetic trematodes, their classification and phylogeny**. Academy of Sciences U.S.S.R., Moscow: Leningrad, 1957, 627 p. (Em Russo).
- CAMPOS, A.; CUMMING, M. P.; REYES, J. L.; LACLETTE, J. P. Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, p. 1–10, 1998.
- CASTAGNOLI, N. Brazil fish culture. In: STICKNEY, R. R. (Ed.). **Encyclopedia of Aquaculture**. New York: John Wiley and Sons, 2000, p. 123–128.
- CHISHOLM, L. A., MORGAN, J. A. T., ADLARD, R. D.; WHITTINGTON, I. D. Phylogenetic analysis of the Monocotylidae (Monogenea) inferred from 28S rDNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1537–1547, 2001.
- COHEN, S. C.; JUSTO, M. C.; KOHN, A. (Eds.). **South American Monogenoidea Parasites of Fishes, Amphibians and Reptiles**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2013, p. 663.

- COHEN, S. C.; KOHN, A. On Dactylogyridae (Monogenea) of four species of characid fishes from Brazil. **Check List**, v. 5, p. 351–356, 2009.
- CONOW, C.; FIELDER, D.; OVADIA, Y.; LIBESKIND-HADAS, R. “Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem”. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 5, p. 16, 2010.
- CÓRDOVA, L.; PARISELLE, A. Monogenoidea en *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766) de la Cuenca Amazónica Boliviana. **Revista Peruana de Biología**, v. 14, p. 11–16, 2007.
- CRIBB, T. H.; CHISHOLM, L. A.; BRAY, R. A. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 321–328, 2002.
- 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**, v. 56, p. 2459–2471, 2002.
- DING, X-J; LIAO, X-H. Phylogenetic position of the monogeneans *Pseudodactylogyrus*, *Heteronchocleidus* and *Trianchoratus* inferred from the 5' terminal sequences of 28S rDNA. **Acta Zootaxonomica Sinica**, v. 30, p. 244–251, 2005. (Em Chinês)
- EHLERS, U. Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. Em: MORRIS, S. C.; GEORGE, J. D.; GIBSON, R.; PLATT, H. M. **The origins and relationships of lower invertebrates**. Oxford University Press, Oxford, 1985 a, p. 143–158.
- EHLERS, U. **Das Phylogenetische System der Plathelminthes**. Stuttgart, New York, Gustav Fischer, 1985 b, 317 p.
- EHLERS U. Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. **Hydrobiologia**, v. 132, p. 1–12, 1986.
- EIRAS, J. D. C.; TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C.; ADRIANO, E. A. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Clichetec, Maringá, 2010, 333 p.
- ERGENS, R. The suitability of ammonium picrate-glycerin in preparing slides of lower Monogenoidea. **Folia Parasitologica**, v. 16, p. 320, 1969.
- FRANCOVÁ, K.; SEIFERTO VÁ, M.; BLAŽEK, R.; GELNAR, M.; MAHMOUD, Z. N.; ŘEHULKOVÁ, E. *Quadriacanthus* species (Monogenea: Dactylogyridae) from catfishes (Teleostei: Siluriformes) in eastern Africa: new species, new records and first insights into interspecific genetic relationships. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 361, 2017.
- FROESE, R.; PAULY, D. (Eds.). 2018. FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <www.fishbase.org>, version 06/2018. Acesso em: Agosto de 2018.
- GIBSON, D. I.; TIMOFEEVA, T. A.; GERASEV, P. I. A catalogue of the nominal species of the monogenean genus *Dactylogyrus* Diesing, 1850 and their host genera. **Systematic Parasitology**, v. 35, p. 3–48, 1996.
- GRAÇA, R. J.; FABRIN, T. M. C.; GASQUES, L. S.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; TAKEMOTO, R. M. Molecular markers in studies on fish parasites (Platyhelminthes). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, p. 495–500, 2016.
- GRAÇA, R. J.; FABRIN, T. M. C.; GASQUES, L. S.; PRIOLI, S. M. A. P.; BALBUENA, J. A.; PRIOLI, A. J.; TAKEMOTO, R. M. Topological congruence between phylogenies of

Anacanthorus spp. (Monogenea: Dactylogyridae) and their Characiformes (Actinopterygii) hosts: A case of host-parasite cospeciation. **Plos One**, v. 13, e0193408, 2018.

GRAÇA, R. J.; UEDA, B. H.; ODA, F. H.; TAKEMOTO, R. M. Monogenea (Platyhelminthes) parasites from the gills of *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces: Erythrinidae) in the upper Paraná River floodplain, States of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Check List**, v. 9, p. 1484–1487, 2013.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696–704, 2003.

GUSEV, A. V. Monogenoidea of freshwater fishes. Principles of systematics, analysis of world fauna and its evolution. **Parazitologicheskii Sbornik**, v. 28, 96–198, 1978 (Em Russo)

HANSEN, H.; COJOCARU, C.-D.; MO, T. A. Infections with *Gyrodactylus* spp. (Monogenea) in Romanian fish farms: *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 extends its range. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 444, 2016.

HASSOUNA, N.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, J. P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 3563–3583, 1984.

HILSDORF, S.; OLIVEIRA, C.; LIMA, F. C. T. D.; MATSUMOTO, C. K. A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 366–371, 2008.

HUYSE, T.; VOLCKAERT, F. A. M. Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from goby to goby. **Systematic Biology**, v. 54, p. 710–718, 2005.

HUYSE, T.; AUDENAERT, V.; VOLCKAERT, F. A. M. Speciation and host-parasite relationships in the parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1679–1689, 2003.

IANACONE, J.; LUQUE, J. L. New records of helminth parasitic on Peruvian Amazonian fishes (Osteichthyes). **Revista de Biología Tropical**, v. 41, p. 303–305, 1993.

JUNK, W. J. Ecology, fisheries and fish culture in Amazonia. In: SIOLI, H. (ed.). **The Amazon, Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin**. Dordrecht: Dr. W Junk Publishers, 1984, p. 443–476.

JUSTINE, J. L. Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermiogenetic and spermatozoal ultrastructural characters. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 821–838, 1991.

JUSTINE, J. L. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. Em: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (eds.) **Interrelationships of the Platyhelminthes**. London: Taylor & Francis, 2001, p. 231–238.

KEARN, G. C. Some aspects of the biology of monogenean (Platyhelminth) parasites of marine and freshwater fishes. **Oceanography**, v. 2, p. 2, 2014.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A., VAN EVERY, L. R. Neotropical Monogenoidea. 17. *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) from characoid fishes

of the central Amazon. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 59, 25–51, 1992.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A. The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Bychowsky, 1937 (Monogenea: Dactylogyroidea). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 207–211, 1989.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E. New monogenetic trematodes from freshwater fishes of western Colombia with the proposal of *Anacanthoroides* gen. n. (Dactylogyridae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 43, p. 129–134, 1976.

LASSO, C. A.; GUTIÉRREZ, F. P.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; CORDOBA, E. A.; RAMÍREZ-GIL H.; AJIACO-MARTÍNEZ, R. E. **Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia II. Pesquerías Continentales de Colombia: Cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y Vertiente del Pacífico**. Bogotá, Colombia: Instituto Alexander von Humboldt, 2011, p. 289.

LEÃO, M. S. L.; CLEMENTE, S. C. S.; COHEN, S. C. *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**, v. 82, p. 269–274, 2015.

LEÃO, M. S. L.; JUSTO, M. C. N.; BUENO, G. W.; COHEN, S. C.; SÃO CLEMENTE, S. C. Parasitism by Monogenoidea in *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes, Characidae) cultivated in Paraná River (Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 787–793, 2017.

LEGENDRE, P.; DESDEVISES, Y.; BAZIN, E. A new statistical method to assess host-parasite coevolution. **Systematic Biology**, v. 51, p. 217–234, 2002.

LI, M.; SHI, S-F.; BROWN, C. L.; YANG, T-B. Phylogeographical pattern of *Mazocraeoides gonialosae* (Monogenea, Mazocraeidae) on the dotted gizzard shad, *Konosirus punctatus*, along the coast of China. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1263–1272, 2011.

LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D. Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. Em: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (eds.) **Interrelationships of the Platyhelminthes**. Taylor & Francis, London, 2001, p. 262–278.

LITTLEWOOD, D. T. J.; ROHDE, K.; CLOUGH, K. A. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, p. 75–114, 1999 a.

LITTLEWOOD, D. T. J.; ROHDE, K.; BRAY, R. A.; HERNIOU, E. A. Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 68, p. 257–287, 1999 b.

LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; AYROZA, L. M. S.; PAVANELLI, G. C. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assi, Estado de São Paulo, Brasil. 2. *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, p. 437–445, 2007.

LLEWELLYN, J. The biology of *Isancistrum subulatae* n. sp., a monogenean parasitic on the squid, *Alloteuthis subulata*, at Plymouth. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 64, p. 285–302, 1984.

- LOCKYER, A. E.; OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T. J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 155–171, 2003.
- MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W. L. **Sinopsis de las Especies de la Subfamilia Serrasalminae Presentes en la Cuenca del Orinoco**. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela, 1995.
- MARSHALL, E. Homely fish draws attention to Amazon deforestation. **Science**, v. 267, p. 814, 1995.
- MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 24, p. 981–985, 2002.
- MARTINS, M. L.; ROMERO, N. G. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitológico e histopatológico. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p. 489–500, 1996.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; HUSON, D. H.; GÖKER, M. CopyCat: cophylogenetic analysis tool. **Bioinformatics**, v. 23, p. 898–900, 2007.
- MENDLOVÁ, M.; DESDEVISES, Y.; CIVÁŇOVÁ, K.; PARISELLE, A.; ŠIMKOVÁ, A. Monogeneans of West African cichlid fish: evolution and cophylogenetic interactions. **Plos One**, v. 7, e37268, 2012.
- MENDOZA-FRANCO, E. F. II. 2 Clase: Monogenoidea. In: CASPETA-MANDUJANO, J. M.; CABAÑAS-CARRANZA, G.; MENDOZA-FRANCO, E. F. **Helmintos parásitos de peces dulceacuícolas mexicanos (Caso Morelos)**. México: AGT Editor, 2009, p. 18–20.
- MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; SCHOLZ, T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 164, 2015.
- MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; HERNÁNDEZ-MENA, D.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. *Parasciadicleithrum octofasciatum* n. gen., n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae), parasite of *Rocio octofasciata* (Regan) (Cichlidae: Perciformes) from Mexico characterised by morphological and molecular evidence. **Parasitology Internacional**, v. 66, p. 152–162, 2017.
- MIZELLE, J. D. New species of trematodes from the gills of Illinois fishes. **American Midland Naturalist**, v. 17, p. 785–806, 1936.
- MIZELLE, J. D.; PRICE, C. E. Additional haptor hooks in the genus *Dactylogyrus*. **Journal of Parasitology**, v. 49, p. 1028–1029, 1963.
- MIZELLE, J. D.; PRICE, C. E. Studies on monogenetic trematodes. XXVIII. Gill parasites of the piranha with proposal of *Anacanthorus* gen. n. **Journal of Parasitology**, v. 51, p. 30–36, 1965.
- MOLLARET, I.; JAMIESON, G. M. B.; ADLARD, R. D.; HUGALL, A.; LECOINTRE, G.; CHOMBARD, C.; JUSTINE, J-L. Phylogenetic analysis of the Monogenea and their

- relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 90, p. 433–438, 1997.
- MONTEIRO, C. M.; BRASIL-SATO, M. C. A new species of *Anacanthoroides* and redescription of *Apedunculata discoidea* (Monogeneoidea) parasitizing *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii) from the São Francisco River, Brazil. **Zootaxa**, v. 3784, p. 259–266, 2014.
- MONTEIRO, C. M.; COHEN, S. C.; BRASIL-SATO, M. C. New species and reports of dactylogyrids (Monogeneoidea) from *Salminus franciscanus* (Actinopterygii: Bryconidae) from the upper São Francisco River, Brazil. **Zootaxa**, v. 3941, p. 137–143, 2015.
- MÜLLER, M. I.; CECCARELLI, P. S.; UETA, M. T. Supplementary studies on *Anacanthorus penilabiatus* and *Mymarothecium viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae) from *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Serrasalminidae) in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 61, p. 508–515, 2016.
- OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogenetics of the Monogenea – evidence from a medley of molecules. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 233–244, 2002.
- ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 343–351, 2008.
- ORTÍ, G.; PETRY, P.; PORTO, J. I. R.; JÉGU, M.; MEYER, A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 169–182, 1996.
- PAGE, R. D. M. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms and areas. **Systematic Biology**, v. 43, p. 58–77, 1994a.
- PAGE, R. D. M. “Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages”. **Cladistics**, v. 10, p. 155–173, 1994b.
- PAGE, R. D.; CHARLESTON, M. A. Trees within trees: phylogeny and historical associations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 13, p. 356–359, 1998.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W. O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. **The Simple Fool’s Guide do PCR**, v. 2.0. Honolulu: University of Hawaii, 1991, p. 42.
- PAMPLONA-BASILIO, M. C.; KOHN, A.; FEITOSA, V. A. New host records and description of the egg of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 667–668, 2001.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Eduem, Maringá, 2002, 305 p.
- PETTERSEN, R. A., MO, T. A.; HANSEN, H.; VØLLESTAD, L. A. Genetic population structure of *Gyrodactylus thymalli* (Monogenea) in a large Norwegian river system. **Parasitology**, v. 142, p. 1693–1702, 2015.
- PLAISANCE, L.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; MORAND, S. Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and

- colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae). **Zoologica Scripta**, v. 34, p. 425–436, 2005.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253–1256, 2008.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; DRUMMOND, A. J. Tracer v1.6. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>, 2014.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology 8th ed.** McGraw-Hill, New York, 2009, 720 p.
- ROHDE, K. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. **The American Naturalist**, v. 114, p. 648–671, 1979.
- ROHDE, K.; JOHNSON, A. M.; BAVERSTOCK, P. R.; WATSON, N. A. Aspects of the phylogeny of Platyhelminthes based on 18S ribosomal DNA and protonephridial ultrastructure. **Hydrobiologia**, v. 305, p. 27–35, 1995.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M., VAN DER MARK, P.; AYRES D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.
- SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 874–876, 2009.
- SEPÚLVEDA, F. A., GONZÁLEZ, M. T. Molecular and morphological analyses reveal that the pathogen *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae) is a complex species: Implications for yellowtail *Seriola* spp. aquaculture. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 94–100, 2014.
- SEPÚLVEDA, F. A.; GONZÁLEZ, M. T.; OLIVA, M. E. Two new species of *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae) based on morphometric and molecular evidence: parasites of two inshore fish species of northern Chile. **Journal of Parasitology**, v. 100, p. 344–349, 2014.
- ŠIMKOVÁ, A.; MATĚJUSOVÁ, I.; CUNNINGHAM, C. O. A molecular phylogeny of the Dactylogyridae sensu Kritsky & Boeger (1989) (Monogenea) based on the D1–D3 domains of large subunit rDNA. **Parasitology**, v. 132, p. 43–53, 2006.
- ŠIMKOVÁ, A.; MORAND, S.; JOBET, E.; GELNAR, M.; VERNEAU, O. Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyryus*): a case of intrahost speciation. **Evolution**, v. 58, p. 1001–1018, 2004.
- ŠIMKOVÁ, A.; PLAISANCE, L.; MATEJUSOVÁ, I.; MORAND, S.; VERNEAU, O. Phylogenetic relationships of the Dactylogyridae Bychowsky, 1933 (Monogenea: Dactylogyridea): the need for the systematic revision of the Ancyrocephalinae Bychowsky, 1937. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 1–11, 2003.
- ŠIMKOVÁ, A.; SERBIELLE, C.; PARISELLE, A.; VANHOVE, M. P.; MORAND, S. Speciation in *Thaparocleidus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitizing Asian pangasiid catfishes. **BioMed Research International**, v. 2013, ID 353956, 2013.

- SMYTH, J. D.; HALTON, D. W. **The physiology of trematodes**. Cambridge University Press, Reino Unido, 1983, 432 p.
- STAMATAKIS, A.; AUCH, A. F.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GÖKER, M. AxPcoords & parallel AxParafit: statistical co-phylogenetic analyses on thousands of taxa. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 405, 2007.
- STUNKARD, H. W. A new trematode, *Oculotrema hippopotami* n. g., n. sp., from the eye of the hippopotamus. **Parasitology**, v. 16, p. 436–441, 1924.
- TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, p. 564–577, 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. D.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pagues do município de Franca, São Paulo, Brasil. II. Metazoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 81–95, 2001.
- THOMPSON, A. W.; BETANCUR-R, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; ORTÍ, G. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 242–257, 2014.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, v. 1, p. 1–12, 1998.
- VAN EVERY, L. R.; KRITSKY, D. C. Neotropical Monogeneida. 18. *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) of piranha (Characoidea, Serrasalminidae) from the central Amazon, their phylogeny, and aspects of host-parasite coevolution. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 59, p. 52–75, 1992.
- VERMA, J.; AGRAWAL, N.; VERMA, A. K. The use of large and small subunits of ribosomal DNA in evaluating phylogenetic relationships between species of *Cornudiscooides* Kulkarni, 1969 (Monogeneoidea: Dactylogyridae) from India. **Journal of Helminthology**, v. 91, p. 206–214, 2017.
- WHITTINGTON, I. D. Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1481–1493, 1998.
- WHITTINGTON, I. D.; CRIBB, B. W.; HAMWOOD, T. E.; HALLIDAY, J. A. Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas? **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 305–320, 2000.
- WOOLHOUSE, M. E. J.; WEBSTER, J. P.; DOMINGO, E.; CHARLESWORTH, B.; LEVIN, B. R. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. **Nature Genetics**, v. 32, p. 569–577, 2002.

- WU, X. Y.; ZHU, X. Q.; XIE, M. Q.; WANG, J. Q.; LI, A. X. The radiation of *Thaparocleidus* (Monogeneoidea: Dactylogyridae: Ancylo-discoidinae): phylogenetic analyses and taxonomic implications inferred from ribosomal DNA sequences. **Parasitology Research**, v. 102, p. 283–288, 2008.
- WU, X. Y.; ZHU, X. Q.; XIE, M. Q.; LI, A. X. The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 659–668, 2006.
- WU, X. Y.; ZHU, X. Q.; XIE, M. Q.; LI, A. X. The evaluation for generic-level monophyly of Ancyrocephalinae (Monogenea, Dactylogyridae) using ribosomal DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 530–544, 2007.
- YANG, J.; SHUNPING, H.; FREYHOF, J.; WITTE, K.; LIU, H. The phylogenetic relationships of the Gobioninae (Teleostei: Cyprinidae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. **Hydrobiologia**, v. 553, p. 255–266, 2006.
- ZAMPARO, D.; BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P.; MCLENNAN, D. A. Phylogenetic analysis of the Rhabdocoela (Platyhelminthes) with emphasis on the Neodermata and relatives. **Zoologica Scripta**, v. 30, p. 59–77, 2001.
- ZIETARA, M. S.; LUMME, J. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). **Evolution**, v. 56, p. 2445–2458, 2002.