

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

TESE

DIVERSIDADE DE COCCÍDIOS: *Isospora* spp. E *Eimeria* spp. DE AVES SILVESTRES DO
SUDESTE BRASILEIRO

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA

2021



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

**DIVERSIDADE DE COCCÍDIOS: *Isospora* spp. E *Eimeria* spp. DE AVES SILVESTRES
DO SUDESTE BRASILEIRO**

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Pereira Beto

Co-orientador:

Prof. Dr. Ildemar Ferreira

Discente:

Mariana de Souza Oliveira

Defesa submetida como requisito
para obtenção do grau de **Doutora
em Biologia Animal**, no Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Animal.

Seropédica

Setembro, 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d48d de Souza Oliveira , Mariana , 1993-
DIVERSIDADE DE COCCÍDIOS: Isospora spp. E Eimeria
spp. DE AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO /
Mariana de Souza Oliveira . - Seropédica, 2021.
191 f.

Orientador: Bruno Pereira Berto.
Coorientador: Ildemar Ferreira.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Biologia
Animal, 2021.

1. Aves. 2. Coccídios. 3. Protozoários. 4. Biologia
Molecular. 5. Mata Atlântica. I. Pereira Berto, Bruno
, 1984-, orient. II. Ferreira, Ildemar, 1951-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal.
IV. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**



TERMO Nº 997 / 2021 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.066979/2021-44

Seropédica-RJ, 15 de setembro de 2021.

Seropédica, 15 de setembro de 2021

MARIANA DE SOUZA OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a)**, no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

TESE APROVADA EM 15/09/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

BRUNO PEREIRA BERTO
(Orientador)

ILDEMAR FERREIRA

VIVIANE MOREIRA DE LIMA

ÁGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA

SERGIAN VIANNA CARDOZO - UNIGRANRIO

LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS - UNIFAP

SERGIO THODE FILHO - IFRJ

HERMES RIBEIRO LUZ - UFMA

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 20:00)

AGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 4073611

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 19:31)

BRUNO PEREIRA BERTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 1971595

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 19:57)

ILDEMAR FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 387289

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 18:52)

VIVIANE MOREIRA DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 1764496

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 14:39)

HERMES RIBEIRO LUZ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 088.990.417-09

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 14:57)

SERGIAN VIANNA CARDOZO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 082.157.777-83

(Assinado digitalmente em 15/09/2021 23:42)

LUCIO ANDRÉ VIANA DIAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 528.742.651-87

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **997**, ano:
2021, tipo: **TERMO**, data de emissão: **15/09/2021** e o código de verificação: **acdf4b2775**

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus por me fornecer resistência e superação para continuar nos momentos em que pensei em desistir.

A minha mãe que é o grande exemplo em minha vida, e que sem seu apoio eu não teria alcançado nada do que alcancei.

Ao Felipe, que me aturou nos momentos mais estressantes e esgotantes dessa trajetória.

Minha irmã, Nathalia, não menos importante, que sempre me aconselha e me incentiva nas tomadas de decisões difíceis.

*Aos amigos que nunca faltaram e aos que foram adquiridos durante essa jornada.
Por último, dedico aos meus animais, grandes amigos de patas e asas, são eles os que mais nos entendem e os que mais nos amam, por isso dedico sempre aos meus doguinhos e as aves que sempre serão as grandes estrelas da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Sempre, em primeiro lugar, vou agradecer a Deus, pela força e resiliência que me traz, por não me deixar desistir quando nada mais faz sentido e por segurar meu coração e mente quando ambos estão falhando. Deus muito obrigada por me deixar em pé, me guiando e me fortalecendo a cada dia.

Minha grande e rainha JUJU, minha mãe Maria Julia que lutou, trabalhou, abriu mão de seus sonhos para que suas filhas pudessem estudar, por isso meu muito obrigada e sempre que puder irei retribuir tudo que fez e que ainda faz por mim. Minha irmã Nathalia, que lutou junto comigo e com minha mãe para vencer na vida, meu orgulho. Muito obrigada pelo apoio de sempre, pelo incentivo e pela amizade. Ao Felipe que me atura a exatos 10 anos, a pessoa que mais entende meu psicológico e que está sempre ali por perto pra me segurar caso eu venha a cair. Obrigada por me aturar, você é muito especial para mim.

Durante todos esses anos eu precisei de grande ajuda psicológica para me manter em pé, então, gostaria de agradecer a minha psicóloga Sara que vem trabalhando comigo sobre os meus próprios conhecimentos, e que hoje me faz refletir sobre o quanto eu sou boa no que for que eu faça, mesmo que seja uma simples tarefa do dia-a-dia.

Durante meus 6 anos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) ganhei de Deus duas pessoas muito especiais, que sem elas eu não teria conseguido defender o Mestrado e muito menos o Doutorado: Os Prof. Dr. Ildemar Ferreira e Prof. Dr. Bruno Pereira Berto (Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ), pessoas que me direcionaram nos momentos de crise nos projetos, levando a resultados positivos e produtivos dentro da vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório que ganhei e que me ensinaram muita coisa, tanto profissional quanto pessoal.

Agradeço por ter sempre pessoas, amigos, amigos de patas e asas que sempre estão em apoio e torcida por mim, que vivem junto comigo os momentos, sempre na torcida e na expectativa.

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

Deixo aqui o meu muito obrigada a todos!

*“Seja sua MELHOR versão, quando eu mudo
tudo ao redor muda”*

RESUMO

OLIVEIRA, Mariana de Souza. **Taxonomia e Ecologia de coccídios: *Isospora* spp. e *Eimeria* spp. de aves Silvestres do Brasil e de Portugal.** 2021. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O Brasil encontra-se entre os países mais biodiversos do mundo, e essa biodiversidade está avaliada pelo tamanho de seu território, apresentando assim, uma grande quantidade de espécies endêmicas, tornando-se importante para investimentos em conservação de aves. Aves são animais de muita importância ecológica, essenciais para manutenção do equilíbrio, atuantes como dispersoras de sementes, agentes polinizadores, reguladores de populações de presas e, com maior importância, sendo bioindicadores de conservação, pois são animais conhecidos pela sensibilidade em alterações nos habitats. Os principais fatores relacionados a extinção de espécies silvestres são a degradação dos ambientes naturais, introdução de espécies exóticas, fatores causados pela superexploração pelos humanos, impactando não só à fauna, mas também a flora e microbiota, e indiretamente favorecendo para o aparecimento e transmissão de doenças parasitárias. Os parasitos podem ser atuantes principais em manutenção dessa biodiversidade, através da manutenção das diversidades em comunidades ecológicas, assim atuando como espécies-chaves para tal. Porém, também podem causar declínio em populações naturais, diminuindo tanto a sobrevivência quanto a reprodução de seus hospedeiros. Dentre os diferentes tipos de parasitas, os coccídios em aves destacam-se. Estes são protozoários intracelulares predominantemente intestinais, os quais revelam fundamental importância, principalmente em ambientes antropizados, pois aves estressadas em decorrência dos impactos antrópicos tendem a serem mais susceptíveis a infecção e colonização dos coccídios. Assim, os coccídios desempenham função de biomarcadores de impactos ambientais. Coccídios se encaixam em um grupo diversificado e complexo de parasitas, destacando-se os gêneros *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875, que são mais relevantes parasitos de aves das ordens Passeriformes e Columbiformes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar fezes de aves silvestres capturadas em áreas de Mata Atlântica, como os Parque Nacional do Itatiaia, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, áreas de preservação e reflorestamento do Instituto Federal do Rio de Janeiro em Pinhal-RJ, e Distrito de Cacaria em Piraí-RJ, além de amostras de fezes enviadas de Portugal, para identificar e quantificar os parasitos coccidianos presentes. Após as análises morfológicas dos

oocistos encontrados, análises moleculares foram realizadas em amostras viáveis, através do sequenciamento de regiões dos genes COI e 18S, além de análises filogenéticas. Como resultado foram produzidos cinco artigos científicos, sendo três artigos de descrição de nova espécie, sendo uma *Isospora* sp. e duas *Eimeria* spp., um artigo de redescricao de uma *Isospora* sp. de novos hospedeiros, e um artigo com redescricao de uma *Eimeria* sp. de aves de Portugal.

Palavras-chave: Aves, Passeriformes, Columbiformes, Coccídios, protozoários, Biologia Molecular, sequenciamento, Mata Atlântica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mariana de Souza. **Taxonomy and ecology of coccidians: *Isospora* spp. and *Eimeria* spp. of wild birds from Brazil and Portugal** 2021. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Brazil is among the most biodiverse countries in the world, and this biodiversity is evaluated by the size of its territory, transformed, a large amount of endemic species, making it important for investments in bird conservation. Birds are animals of great ecological importance, essential for the maintenance of balance, acting as seed dispersers, pollinating agents, prey regulators and, most importantly, being conservation bioindicators, as they are animals known for their sensitivity to changes in habitats. The main factors related to the extinction of wild species are the degradation of natural environments, introduction of exotic species, caused by overexploitation by humans, impacting not only the fauna, but also the flora and microbiota, and indirectly favoring the appearance and transmission of parasitic diseases. Parasites can play a major role in maintaining this biodiversity, through the maintenance of diversities in ecological communities, thus acting as key-species for this purpose. However, they can also cause decline in natural populations, decreasing so much the level of reproduction of their hosts. Among the different types of parasites, coccidia in birds stand out, they are predominantly intestinal intracellular protozoa, revealing fundamental importance, especially in anthropogenic environments, as birds stressed by human impacts tend to be more susceptible to infection and colonization of coccidia. Thus, coccidia play the role of biomarkers of environmental impacts. Coccidia fit into a diverse and complex group of parasites, highlighting the genera of *Isospora* Schneider, 1881 e *Eimeria* Schneider, 1875, which are of greater relevance for parasites of birds of the Passeriformes and Columbiformes orders. In this context, the objective was to analyze feces of wild birds captured in areas of the Atlantic Forest, Parque Nacional do Itatiaia, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, preservation and reforestation area of the Instituto Federal de Pinheiral and in the District of Cacaria, Rio de Janeiro, in addition to the feces presented from Portugal, to identify and quantify coccidian parasites present. After the morphological analysis of the found oocysts, molecular analyzes were settled in the viable ones, working on DNA sequence analysis of COI and 18S genes, in addition to phylogenetic analysis. As a result we obtained five articles, three articles with records of new species, one *Isospora* sp. and two *Eimeria* spp., a redescription article of

an *Isospora* sp. with new hosts, and an article with redescription of an *Eimeria* sp. in birds from Portugal.

Keywords: Birds, Passeriformes, Columbiformes, Coccidia, Protozoa, Molecular Biology, sequencing, Atlantic Forest.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Desenho do oocisto esporulado do gênero *Eimeria* sp., Barra de escala: 10µm.21

Figura 2. Desenho do oocisto esporulado do genro de *Isoospora*. sp, Barra de escala: 29910µm.....22

Metodologia Geral

Figura 1: Captura de ave por rede de neblina (A); Retirada da ave da rede de neblina (B);
Processamento das aves (C); Caixa para coleta das fezes (D); Amostras de Oopds (E).23

Figura 2: Amostras sendo incubadas no Dicromato de Potássio (A); Lâminas para a leitura das
amostras (B); Processamento das amostras (C).24

Capítulo I

Figura 1 : Representantes das aves hospedeiras, *Turdus flavipes* (A); *Turdus leucimelas* (B); *Turdus amaurochalinus* (C).29

Figura 2. Desenho do oocisto esporulado de *Isoospora brasilsatoae* n. sp, novas espécies de coccídio recuperada de *Turdus flavipes*, *Turdus leucomelas* e de *Turdus amaurochalinus*. Barra de escala: 29910µm.30

Figura 3. Fotomicrografias (A-C) de oocistos esporulados de *Isoospora brasilsatoae* n. sp, nova espécie de coccídio recuperada *Turdus flavipes* (A), *Turdus leucomelas* (B) *Turdus amaurochalinus*(C).
Corpo de Stieda (sb), corpo sub-Stieda (ssb), resíduo de esporocisto (sr), estrias (str) e o corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10µm.32

Capítulo II

Figura1: Representante da *Columbina talpacoti*, ave hospedeira.43

Figura 2. Desenho (A) e fotomicrografias (B – E) de oocistos esporulados de *Eimeria columbinae* n.sp. recuperado da Rolinha-roxa *Columbina talpacoti*. Observe a camada interna (il) e externa (ol) da parede da micrópila do oocisto (m), resíduo do oocisto (ou), corpo refrático (rb), corpode Stieda (sb) e subStieda (ssb). 5 µm.....44

Figura 3. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados emColumbiformes. *Isoospora gallicolumbae* (A). *Isoospora* sp. De Matsubara et al. (2017) (B). *Eimeria labbeana* (C). *Eimeria columbarum* (D). *Eimeria columbae* (E). *Eimeria sphenocercae* (F). *Eimeria kapotei* (G).
Tudo na mesma escala. Barra de escala 10 µm.54

Figura 4. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados em Columbiformes. *Eimeria turturi* (A). *Eimeria waiganiensis* (B). *Eimeria duculai* (C). *Eimeria gourai*(D). *Eimeria palumbi* (E). *Eimeria curvata* (F). *Eimeria zenaidae* (G). Tudo na mesma escala. Barrade escala 10 µm54

Figura 5. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados em Columbiformes. *Eimeria janovyi* (A). *Eimeria livialis* (B). *Eimeria columbapalumbi* (C). *Eimeria mauritiensis* (D). *Eimeria lyoni* (E). *Eimeria* sp. (F) *Eimeria columbinae* (G). Tudo na mesma escala. Barra de escala55

Figura 6. Árvore com probabilidade máxima estimada a partir das seqüências do gene COI de espécies Eimeriides. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%).....59

Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das seqüências do gene 18S de espécies Eimeriides. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%) para junção de vizinhos (NJ) e probabilidade máxima (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.60

Capítulo III

Figura 1: Representante das aves hospedeiras Juriti-pupu *L. verreauxi* (A) e Juriti-gemeadeira *L.*

<i>rufaxilla</i> (B)	69
Figura 2. Desenho do oocisto esporulado de <i>Eimeria ferreirai</i> n. sp., uma nova espécie de coccídio recuperada de pombas <i>Leptotila</i> spp. Barra de escala: 10µm.....	71
Figura 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de <i>Eimeria ferreirai</i> n. sp., uma nova espécie de coccídio recuperada de <i>Leptotila</i> spp. Observe a camada interna (IL) e externa (OL) da parede do oocisto, micrúpila (M), capuz polar (MC), núcleo (N), grânulo polar (PG), corpo refrátil (RB), corpo de Stieda (SB) e o resíduo de esporocisto (SR). Barra de escala: 10µ.....	72
Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das seqüências do gene COI de espécies Eimeriide. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 repetições (> 50%) para Vizinhaça (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.	78

Capítulo IV

Figura 1: Exemplares das aves hospedeiras <i>Dendrocincla turdina</i> (A); <i>Xiphocolaptes albicollis</i> (B).	85
Figura 2: Desenho de composição do oocisto esporulado para a descrição de <i>Isospora striata</i> de arapaçus da Mata Atlântica brasileira. Barra de escala: 10 µm.....	86
Figura 3: Fotomicrografias de <i>Isospora striata</i> recuperadas de Arapaçu-liso <i>Dendrocincla turdina</i> (a – e) e de Arapaçu-de-garganta-branca <i>Xiphocolaptes albicollis</i> (f – j). Observe a camada interna (il) e a camada externa lisa (sol) da parede do oocisto, micrúpila (m), núcleo (n).	87
Figura 4: Árvore de verossimilhança máxima estimada a partir das sequências do gene COI de espécies de <i>Isospora</i> . Os números representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para junção de vizinho (NJ) e máxima verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.	90
Figura 5: Distribuição geográfica dos dendrocolaptídeos hospedeiros de <i>Isospora striata</i> na região Neotropical (com base em dados da IUCN 2020). <i>Xiphorhynchus chunchotambo</i> e <i>Xiphorhynchus ocellatus</i> estão distribuídos na Amazônia. Os hospedeiros relatados neste trabalho, <i>Xiphocolaptes albicollis</i> e <i>Dendrocincla turdina</i> distribuídos nas áreas geográficas na Mata Atlântica no sudeste do Brasil (a). <i>Sittasomus griseicapillus</i> (b) e <i>Dendroplex picus</i> (c) são exemplos de arapaçus com ampla distribuição geográfica neotropical que são simpátricas com <i>X. chunchotambo</i> , <i>X. ocellatus</i> , <i>X. albicollis</i> e <i>D. turdina</i>	90

Capítulo V

Figura 1: Exemplares das aves hospedeira <i>Streptopelia decaocto</i> (A); <i>Columba palumbus</i> (B).....	100
Figura 2:. Desenho de linha de <i>Eimeria labbeana</i> , uma espécie de coccídio recuperada de pássaros columbiformes. Barra de escala: 10 µm.	102
Figura: 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de <i>Eimeria labbeana</i> , uma espécie de coccídio recuperada de (A-D) <i>Streptopelia decaocto</i> , e (E-H) <i>Columba palumbus</i> de Portugal. Observe os corpos refráteis anterior (arb) e posterior (prb), camada interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto, micrúpila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), resíduo de esporocisto (sr) e o corpo Stieda (sb). Barrade escala: 10 µm.	106
Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI de espécies de coccídios. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para Neighbour-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.	107
Figura 5: Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene 18S de espécies de coccídios. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para Neighbour-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.	108

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Morfologia comparada de *Eimeria* spp. recuperados de Columbidae do Novo Mundo.....34

Capítulo II

Tabela 1. Morfologia comparada de espécies de Eimeriidae registradas em Columbiformes do mundo.
.....56

Capítulo III

Tabela 1. Morfologia comparada de *Eimeria* spp. recuperados de Columbiformes do mundo.74

Capítulo IV

Table 1. Morfologia comparativa de espécies de *Isospora* registrados em arapaçus (Dendrocolaptidae).
.....91

Capítulo V

Table 1. Morfologia comparativa de *Eimeria* spp. registrado em Columbiformes do mundo109

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
Ecologia de Aves Silvestres	18
Parasitas de Aves Silvestres	19
Coccídios.....	20
OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES.....	22
METODOLOGIA GERAL.....	22
Áreas de Coletas	22
Captura das Aves	23
Análises morfológicas.....	24
Análises moleculares	24
Análises de sequência de DNA	25
CAPÍTULO I.....	26
INTRODUÇÃO.....	29
METODOLOGIA	30
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO.....	32
CAPÍTULO II.....	39
INTRODUÇÃO.....	42
METODOLOGIA	43
RESULTADOS	43
Descrição das novas espécies	43
Resumo Taxonômico	45
Análise filogenética	45
DISCUSSÃO.....	46
Análise filogenética.....	52
CONCLUSÕES	61
BIBLIOGRAFIA.....	61
CAPÍTULO III.....	65
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS	68
RESULTADOS	69
DISCUSSÃO.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	78
CAPÍTULO IV.....	81

INTRODUÇÃO	84
MATERIAIS E MÉTODOS	84
RESULTADOS	85
<i>Prevalência e identificação</i>	85
<i>Resumo taxonômico</i>	86
<i>Análise filogenética</i>	87
DISCUSSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO V.....	96
INTRODUÇÃO	99
MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
<i>Coleta de amostras</i>	99
<i>Análises morfológicas</i>	100
<i>Análise estatística</i>	100
RESULTADOS	101
<i>Prevalência e identificação</i>	101
<i>Resumo Taxonômico</i>	102
<i>Observações</i>	103
<i>Análise filogenética</i>	103
DISCUSSÃO.....	104
REFERÊNCIAS	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
ANEXOS.....	116
Anexo I	116
<i>Isospora brasilsatoae</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes <i>Turdus</i> spp.(Passeriformes: Turdidae) from Brazil.....	116
Anexo II	116
Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and <i>Eimeria columbinae</i> n. sp. from <i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809) from Brazil	116
Anexo III	116
<i>Eimeria ferreirai</i> n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves <i>Leptotila</i> spp.	116
(Columbiformes: Columbidae) from Brazil.....	116
Anexo IV	116
Distribution, redescription, and molecular identification of <i>Isospora striata</i> McQuiston et al.1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America.	116
Anexo V	116
Supplementary morphological data and molecular analyses of <i>Eimeria labbeana</i> (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal.	116
Anexo VI	116
Declaração de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do GrandeRio.	116
Anexo VII	116
Autorização para atividades com finalidade científica no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)/Ministério do Meio Ambiente (MMA)	116

INTRODUÇÃO GERAL

Entre todos os países reconhecidos mundialmente, apenas 17 são considerados megadiversos. A denominação se dá devido abrigarem 70% de toda a biodiversidade mundial. Entre esses países, o Brasil ocupa o primeiro lugar por ser o quinto em extensão territorial, além de abrigar 14% da biodiversidade mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2005).

A explicação para a riqueza biológica do Brasil está no grande número de espécies endêmicas, a enorme cobertura vegetal, a variedade de biomas e a imensa costa litorânea. Ocupando 47,8% da América Latina, o Brasil é conhecido como o continente das aves, abrigando cerca de um terço de todas as espécies existentes no planeta, representando praticamente 57% do total de aves residentes da América do sul. Tornando-o um dos países mais importantes para o investimento em conservação de aves do mundo (SICK, 1997; LEWINSOHN; PRADO, 2005; MARINI; GARCIA, 2005; VILELA, 2012).

Os principais fatores envolvidos na extinção das espécies selvagens são a destruição e perda dos habitats naturais, a introdução de espécies exóticas, o aumento da ocorrência de doenças e a superexploração das espécies para uso humano (MARINI; GARCIA, 2005), onde além dos impactos diretos à fauna, flora e microbiota, indiretamente favorecem a transmissão e susceptibilidade dos animais silvestres às doenças parasitárias (BERTO; LUZ, 2016).

Parasitas podem operar como espécies-chave, representando um papel crucial na manutenção da diversidade em comunidades ecológicas e ecossistemas. Por outro lado, podem ameaçar a biodiversidade causando declínio de populações naturais, uma vez que, parasitos diminuem tanto a sobrevivência como a reprodução de seus hospedeiros (ALTIZER et al., 2001; SMITH et al., 2009). As infecções parasitárias podem interferir no comportamento e no desenvolvimento reprodutivo das aves, em virtude de uma nutrição inadequada e estresse propiciando o aparecimento de infecções secundárias (FREITAS et al., 2002).

O estudo das interações entre esses parasitos-hospedeiros é de fundamental importância para se entender processos ecológicos, evolutivos e comportamentais, incluindo seleção sexual (CLAYTON, 1991), migração e capacidade competitiva. Por exemplo, indivíduos parasitados podem ser mais susceptíveis a predadores e menos hábeis para estabelecer territórios (ALTIZER et al., 2000). Portanto o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa e na estrutura de comunidade, dispersão e diversidade genética (SCOTT, 1988).

Entre os diferentes grupos de parasitas em aves, destacam-se os coccídios, protozoários intracelulares, predominantemente intestinais, identificados por amostras fecais (DOLNIK et al.,

2010; BERTO; LUZ, 2016). Os estudos de prevalência e densidade de coccídios revelam-se de fundamental importância, principalmente em ambientes antropizados, como áreas desmatadas para a realização de atividades pecuárias e urbanização, pois aves estressadas em decorrência dos impactos antrópicos tendem a serem mais susceptíveis a infecção e colonização dos coccídios. Desta forma, os coccídios desempenham função de biomarcadores de impactos ambientais (LOPES et al., 2013)

Ecologia de Aves Silvestres

A ecologia das aves e seus estudos é de imensa importância para a preservação da natureza e sua fauna. Muitos dos estudos feitos em meio natural podem ser ampliados pelas descrições de estudos realizados em cativeiro, observando o comportamento. Esses estudos complementam os trabalhos taxonômicos, biogeográficos e parasitológicos, onde tais estudos no Brasil só ganharam forças no início do último século, onde estudos de vocalização, alimentação e reprodução levam a compreensão das aves no geral (SICK, 1997).

As manifestações sonoras são tão características quanto a morfologia, levando a identificação das espécies morfologicamente semelhantes. O som é produzido na seringue, estrutura presente na extremidade inferior da traqueia, bifurcação dos brônquios. O repertório das diversas espécies varia em diferentes proporções. A um exame acurado verifica-se em todas as aves a ocorrência de diversos tipos de comunicação vocal (SICK, 1997).

Em relação as manifestações alimentares, os passeriformes podem ser classificados como Frugívoras, granívoras, insetívoras, nectarívoras, carnívoras, pscívoras, necrófagas ou onívoras, sendo assim, animais de muita importância ecológica, essenciais para manutenção do equilíbrio, atuantes como dispersoras de sementes, agentes polinizadores, reguladores de populações de presas e, com maior importância, sendo bioindicadores de conservação, pois são animais conhecidos pela sensibilidade em alterações nos habitats (Machado et al., 2006).

A época reprodutiva das aves em geral se dá entre os meses de setembro a janeiro, mas em cada espécie as atividades são sincronizadas, correspondendo a uma real adaptação hereditária. As atividades reprodutivas são condicionadas pela fartura de alimentos, o que facilita a criação da prole; o começo da época de chuva, que provoca aumento de insetos, beneficiando os insetívoros. Com o fim da época de seca ocorrerá uma abundância de frutas, favorecendo os frugívoros. Os granívoros dependem da maturação de sementes. E os beija-flores aproveitam-se da floração, porém apresentam cronogramas referentes aos tipos de periodizações dos vegetais, devido a sua adaptação aos mesmos (SICK, 1997).

Além de todas essas características, as aves também podem ser observadas pelas suas interações, onde as relações parasitas-hospedeiro também podem ser relevantes, onde muitas aves abrigam alguns parasitas como: piolhos-de-pena do gênero *Phthiraptera* Nitzsch, 1818, e outros ectoparasitos, nematóides, trematódeos e cestóides, além de hemoprotozoários e protozoários intestinais (SOULSBY, 1987). As aves apresentam não só relações entre indivíduos de mesma espécie (relação intraespecíficas), como apresentam também relações entre indivíduos de espécies diferentes (relação interespecíficas), que podem ser observadas em bandos mistos pelas matas, fenômeno muito visto nas regiões neotropicais. A maior oportunidade para a associação de várias espécies ocorre durante a busca de alimento, e algumas vezes durante a nidificação, em aves que formam colônias (SICK, 1997).

Parasitos de Aves Silvestres

Parasitos podem operar como espécies-chave, representando um papel crucial na manutenção da diversidade em comunidades ecológicas e ecossistemas. Por outro lado, podem ameaçar a biodiversidade causando declínio de populações naturais, uma vez que, parasitos diminuem tanto a sobrevivência como a reprodução de seus hospedeiros (ALTIZER et al., 2001; SMITH et al., 2009). As infecções parasitárias podem interferir no comportamento e no desenvolvimento reprodutivo das aves, em virtude de uma nutrição inadequada e estresse propiciar o aparecimento de infecções secundárias (FREITAS et al., 2002; HUEZA, 2008).

Em cativeiro é mais nítida a manifestação das doenças em aves, onde estas apresentam doenças virais, bacterianas, micóticas e parasitárias (GODOY; MATUSHIMA, 2010), porém a mais representativa e considerada uma grande causadora de mortalidade por enterite em muitas espécies de aves é a coccidiose, uma doença causada por protozoários da família Eimeriidae, onde estão incluídos os gêneros *Eimeria* e *Isospora* (FREITAS et al., 2003; SCHRENZEL et al., 2005; SAKS et al., 2006). Muitos desses casos estão relacionados a superlotação nos cativeiros, gerando um estresse de confinamento, e toda essa carga parasitária levam a um desgaste do animal, resultando em disfunção de órgãos internos, desidratação e perda de energia (GODOY, 2007). Casos em cativeiro são importantes para se avaliar a intensidade da coccidiose e o impacto que pode ser gerado em populações naturais, pois parasitas intestinais estão associados a ecologia das aves (DOLNIK, 2006; LÓPEZ et al., 2007).

As identificações das espécies de coccídios podem registrar novos hospedeiros e uma nova localidade, contribuindo para o conhecimento da distribuição e dispersão dos coccídios, além de confirmar, ou não, a impossibilidade de transmissão de coccídios entre aves de famílias distintas.

Populações de aves com nichos ecológicos distintos, em diferentes períodos sazonais e/ou que habitam diferentes localidades com diferentes condições ambientais podem apresentar diferentes prevalências e densidades de coccídios (GOMEZ et al., 1982; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990; BERTO *et al.* 2008a; GIRAUDEAU *et al.* 2014). Sendo assim, o estudo da distribuição dos coccídios de aves hospedeiras em diferentes localidades e períodos, poderia evidenciar padrões de prevalências e densidades específicas associadas com determinados aspectos dos hospedeiros e ambientes.

Coccídios

Classificação

O termo coccidia designa uma ordem de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa denominada: Eucoccidiorida. A característica que melhor define este grupo de micro-organismos é o oocisto resistente, dotado de uma parede protetora (SOUZA et al., 2005)

Os coccídios formam um grupo diversificado e complexo de parasitos existindo algumas famílias, gêneros e espécies (MASSEY, 2003). Os coccídios dos gêneros *Isospora* e *Eimeria*, que são os mais relevantes parasitos de aves da ordem Passeriformes (BERTO et al. 2011), segundo Ruggiero et al. (2015), apresentam a seguinte classificação:

Super-reino: Eukaryota Whittaker e Margulis, 1978

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881

Morfologia e aspectos biológicos

Eimeria Schneider, 1875

Oocistos de *Eimeria* spp, figura 1, são compostos por quatro esporocistos, contendo dois esporozoítos cada (LEVINE, 1985). Além disso, esse gênero apresenta diferenças entre os tamanhos (diâmetro),

ontornos (elíptico, oval ou circular), estruturas internas, espessura de parede e cor de acordo com as espécies (SCHNITZLER et al., 1999). A parede dos oocistos desse coccídio apresenta diferenças entre as espécies, podendo ter espículas, rugas, micrópila, capuz polar entre outras, e sendo menos comum a presença de corpos de Stieda e substieda (CASAS et al., 1995).

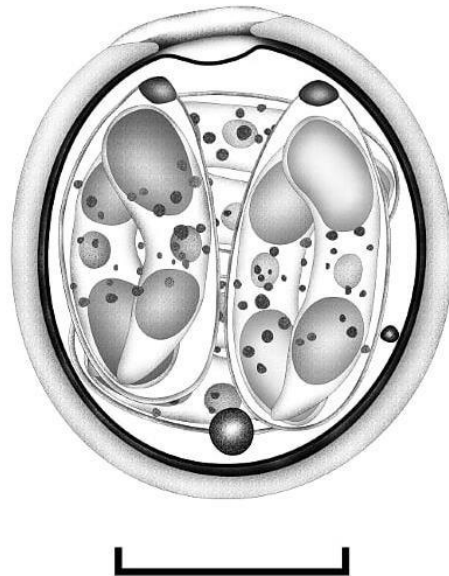


Figura 1. Desenho do oocisto esporulado do gênero *Eimeria* sp., Barra de escala: 10µm.

Isospora Schneider, 1881

Coccídios do gênero *Isospora*, figura 2, são dispóricos tetrazóicos, o que significa que possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (LEVINE, 1985; GARCIA; BRUCKNER, 1997). Em geral, o oocisto não possui corpo residual (BERENGUER, 2006); diferentemente, do que ocorre com as espécies do gênero *Eimeria*. Oocistos de *Isospora* spp. possuem paredes mais uniformes, sendo necessário observar outras características tais como corpo de Stieda e substieda para identificar-se especificamente (BERTO et al., 2014).

Protozoários do gênero *Isospora* geralmente estão relacionados a infecções entéricas, mas podem acometer outros órgãos como rins, fígado e baço. No intestino, infectam as células do epitélio intestinal causando sua destruição. A manifestação clínica dependerá do dano causado nas células intestinais pelas formas juvenis do parasito, o qual resultará na diminuição da alimentação, da absorção de nutrientes e do processo digestivo, além de aumentar a suscetibilidade a outros agentes. Aves parasitadas podem ser assintomáticas ou desenvolverem sinais clínicos como diarreia, penas eriçadas e morte (PEREIRA et al., 2011).

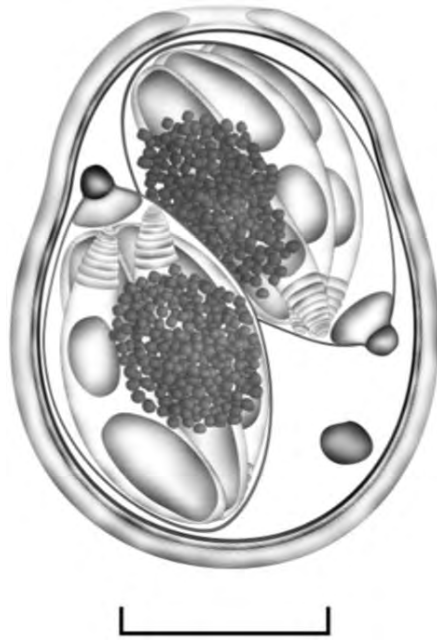


Figura 2. Desenho do oocisto esporulado do genero de *Isospora*. sp, Barra de escala: 29910 μ m.

OBJETIVOS E DEMAIS OBSERVAÇÕES

O presente estudo tem como objetivo principal o conhecimento sobre a diversidade das espécies de coccídios parasitando aves silvestres, identificando e quantificando coccídios de aves capturadas em algumas localidades do Brasil e Portugal.

Os objetivos específicos foram: (1) Pesquisar oocistos de coccídios de amostras fecais de aves silvestres capturadas em algumas localidades do Brasil e Portugal, estabelecendo prevalências e distribuições; (2) Quantificar os oocistos pela contagem do número de oocistos por defecação (OoPD), conferindo as densidades específicas; e (3) Identificar especificamente os coccídios, por métodos morfológicos e moleculares, descrevendo e redescrindo espécies de acordo com seus respectivos hospedeiros e localidades.

Neste sentido, são apresentados a seguir cinco capítulos que conferem com cinco artigos publicados contendo os resultados desta trabalho de doutorado.

METODOLOGIA GERAL

Áreas de Coletas

Foram realizadas expedições em em cinco localidades diferentes da região de Mata Atlântica (1) Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida localizada na Serra da Mantiqueira, na fronteira dos Estados do Rio de

Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2018a); (2) Parque Nacional da Serra dos Órgãos sede Teresópolis e uma área fragmentada da Mata Atlântica no município de Guapimirim, localizada ao redor do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (ICMBIO 2018b); (3) Cacaria, no município de Piraí, no estado do Rio de Janeiro; (4) área rural no Distrito de Santa Rita de Cássia, no município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro; (5) Campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro.

Captura das Aves

As aves são capturadas através de rede de neblina com tamanhos de malhas diferenciados objetivando a captura de aves de diferentes portes. As redes são frequentemente verificadas, a cada 15 minutos, e aves capturadas são retiradas manualmente tentando amenizar o estresse. Após a retirada das aves, as mesmas foram mantidas em caixas individuais com papel absorvente limpo. Após a identificação das espécies, as aves foram fotografadas e liberadas. As fezes observadas como procedentes foram coletadas e colocadas em um tubo de centrifugação com uma solução de dicromato de potássio a 2,5% ($K_2Cr_2O_7$). As permissões de coleta de campo foram concedidas à B.P. Berto pelo SISBIO / ICMBio (licenças 42798-1; 45200-1; 49605-1; 54951-1) e CEUA / UFRRJ (protocolos IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616).



Figura 1: Captura de ave por rede de neblina (A); Retirada da ave da rede de neblina (B); Processamento das aves (C); Caixa para coleta das fezes (D); Amostras de Oopds (E).

Análises morfológicas

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia de Coccídios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e foram incubadas em tubos de centrifuga e regularmente oxigenadas por agitação, à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 10 dias ou até $\sim 70\%$ dos oocistos estarem esporulados. Os oocistos foram isolados por flotação em solução de açúcar Sheather (gravidade específica: 1,20) e examinados microscopicamente usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014a). As observações morfológicas, desenhos de linha, fotomicrografias e medições foram feitas usando um microscópio binocular Olympus BX (Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Itália). Os desenhos de linha foram editados usando dois aplicativos de software da CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, versão 11.0, Corel Corporation, Canadá), ou seja, Corel DRAW e Corel PHOTO-PAINT. Todas as medições estão em micrômetros e são fornecidas como o intervalo seguido pela média entre parênteses.

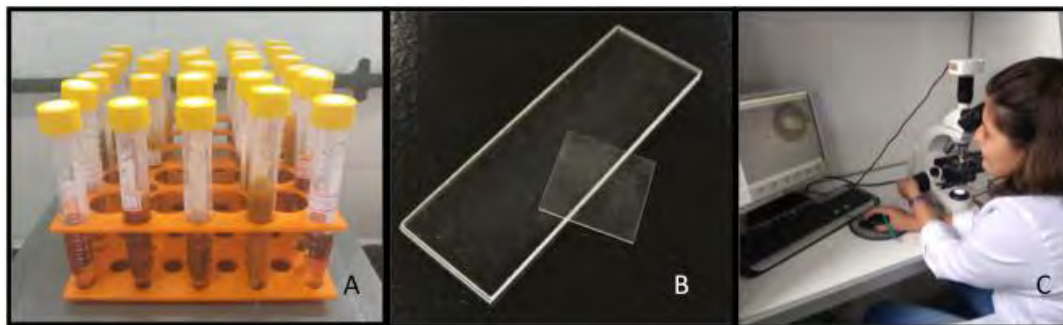


Figura 2: Amostras sendo incubadas no Dicromato de Potássio (A); Lâminas para a leitura das amostras (B); Processamento das amostras (C).

Análises moleculares

Oocistos individuais identificados com as mesmas características da espécie a ser redescrita sob microscopia de luz foram isolados, ressuspensos em PBS e lavados por centrifugação até que o sobrenadante se tornasse claro (Dolnik et al. 2009). O DNA foi extraído dos oocistos usando o kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Para lisar totalmente os oocistos, quatro ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados antes da extração do DNA. A amplificação por PCR para o gene COI foi realizada por aninhamento de PCR, conforme previamente descrito por Dolnik et al. (2009) e Yang et al. (2015).

Os iniciadores externos COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') e COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produziram um produto de PCR de 302 pb de

tamanho. Os primers internos COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3 ') e COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3 ') produziram um fragmento de 257 bp de tamanho. A reação de PCR continha 12,5 µL de mistura principal incolor GoTaq® G2 Hot Start (Promega) (1 ×), 0,25 µL de cada primer (0,2 µM), 3 µL de DNA (para a reação primária) ou 3 µL de produto de PCR primário (para a reação secundária) e 9 µL de água sem nuclease. Tanto a PCR primária quanto a secundária foram conduzidas usando as mesmas condições de ciclagem: 1 ciclo de 94 ° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C por 30s, 47 ° C por 45s e 72 ° C por 1 min e uma extensão final de 72 ° C por 5 min. Os fragmentos da segunda rodada de PCR foram purificados usando o Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brasil).

Análises de sequência de DNA

Todos os fragmentos de PCR foram sequenciados utilizando os primers forward e reverse PCR da Ludwig Biotechnology, usando um analisador genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) para sequenciamento Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados usando o programa Chromas 2.6. As sequências foram comparadas entre si e com outros parasitas coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Árvores filogenéticas foram construídas para espécies coccidianas nas sequências COI para isolados adicionais do GenBank. As análises de alinhamento e parcimônia foram conduzidas usando MEGA versão 7 (Tamura et al. 2007). A história evolutiva foi inferida usando a união de vizinhos (NJ) e métodos de máxima verossimilhança (ML), e as distâncias foram calculadas usando o método de Tamura-Nei com base na seleção de modelo usando ModelTest em MEGA 7. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando a junção de vizinhos e algoritmos BioNJ a uma matriz de pares. As distâncias estimadas usando a abordagem de máxima verossimilhança composta e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log de verossimilhança superior. As análises de bootstrap foram conduzidas usando 1000 réplicas para avaliar a confiabilidade das topologias de árvore inferidas.

CAPÍTULO I

Nova espécie e registro de Isospora em Passeriformes

Isospora brasilsatoae n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil.

Resumo

Uma nova espécie de coccídio (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) encontrado parasitando sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818), sabiá-barranco *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 e sabiá-poca *Turdus amaurochalinus* Cabanern, 1850. *Isospora brasilsatoae* n. sp. tem oocistos que são ovóides a piriformes, $26,8 \times 21,1 \mu\text{m}$, com parede lisa e bicamada, com aproximadamente $1,6 \mu\text{m}$ de espessura. Micrópila presente. Resíduo de oocisto ausente, mas um a três grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são ovais alongados, $18,1 \times 10,5 \mu\text{m}$. Corpo Stieda em forma de botão e corpo sub-Stieda trapezoidal. O resíduo de esporocisto é composto por grânulos que parecem estar ligados à membrana. Os esporozoítos são vermiformes com corpos e estrias refratários. Esta é a nona descrição de uma *Isospora* sp. parasitando um sabiá do Novo Mundo.

Palavras-chave: taxonomia, morfologia, coccídios, *Isospora*, oocistos, Passeriformes, Turdidae, Parque Nacional Itatiaia, Parque Nacional Serra dos Órgãos, Guapimirim, Cacaria, Rio de Janeiro, Brasil.

Abstract

A new species of coccidia (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) found parasitizing the yellow-legged thrush *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818), the pale-breasted thrush *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 and the creamy-bellied thrush *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 in Southeastern Brazil is described. *Isospora brasilsatoae* n. sp. has oocysts that are ovoidal to pyriform, $26.8 \times 21.1 \mu\text{m}$, with smooth, bilayered wall, $\sim 1.6 \mu\text{m}$ thick. Micropyle present. Oocyst residuum absent, but one to three polar granules are present. Sporocysts are elongate ovoidal, $18.1 \times 10.5 \mu\text{m}$. Stieda body knob-like and sub-Stieda body trapezoidal. Sporocyst residuum is composed of granules that appear to be membrane-bounded. Sporozoites are vermiform with refractile bodies and striations. This is the ninth description of an *Isospora* sp. parasitizing a New World thrush.

Keywords: taxonomy, morphology, coccidia, *Isospora*, oocysts, Passeriformes, Turdidae, Itatiaia National Park, Serra dos Órgãos National Park, Guapimirim, Caciaia, Rio de Janeiro, Brazil.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui 14% da biodiversidade mundial, a explicação para essa riqueza biológica está no grande número de espécies endêmicas, na enorme cobertura vegetal, na variedade de biomas e na imensa costa (LEWINSOHN & PRADO 2005). O Brasil ocupa 47,8% da região Neotropical, sendo conhecido como o 'país das aves' por possuir cerca de um terço de todas as espécies do planeta, representando quase 57% do total de aves residentes na América do Sul. Nesse sentido, o Brasil se torna um dos países mais importantes em investimentos em conservação de aves do mundo (SICK 1997; LEWINSOHN & PRADO 2005; MARINI & GARCIA 2005).

Entre todas as famílias de Aves no Brasil, a família Turdidae compreende 20 gêneros e 180 espécies, das quais 87 são classificadas no gênero *Turdus* Linnaeus, 1758. *Turdus* spp. são abundantes nas florestas Atlântica e Amazônica, preferencialmente habitando áreas úmidas com árvores mais altas nas encostas, mas também encontradas perto do solo, alimentando-se de pequenos frutos e insetos (SICK 1997; BIRDLIFE INTERNATIONAL 2016).

Aves silvestres são hospedeiras de endo e ectoparasitas; no entanto, entre todos esses, pode-se destacar os protozoários coccidianos. O parasitismo por coccídios não deve afetar a saúde das aves silvestres em ambientes preservados e/ou conservados; no entanto, em ambientes impactados, gerando estresse e conseqüentemente a baixa da imunidade, torna as aves silvestres mais suscetíveis à coccidiose.

Neste contexto, o presente estudo descreve uma nova espécie de *Isospora* recuperada em sabiá-una *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818), sabiá-barranco *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 e sabiá-poca *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 capturados em diferentes localidades no sudeste do Brasil, figura 1.



Figura 1 : Representantes das aves hospedeiras, *Turdus flavipes* (A); *Turdus leucomelas* (B); *Turdus amaurochalinus* (C).

METODOLOGIA

No total, quatro expedições foram realizadas em três localidades diferentes no sudeste do Brasil: (1) Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida localizada na Serra da Mantiqueira, na fronteira dos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO, 2018a); (2) uma área fragmentada da Mata Atlântica no município de Guapimirim, localizada ao redor do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, outra área protegida localizada na serra costeira (Serra do Mar) do Estado do Rio de Janeiro (ICMBIO 2018b); e (3) Cacaria, no município de Piraí, no estado do Rio de Janeiro. Um total de cinco exemplares de *T. flavipes* (quatro do Parque Nacional do Itatiaia e um de Cacaria), quatro exemplares de *T. leucomelas* (dois do Parque Nacional do Itatiaia e dois de Guapimirim) e um indivíduo de *T. amaurochalinus* (Cacaria) foram capturados com redes de neblina.

RESULTADOS

Dois exemplares de *T. flavipes* do Parque Nacional do Itatiaia, um de *T. leucomelas* de Guapimirim e um único de *T. amaurochalinus* de Cacaria, foram positivos para *Isospora* sp. não registrado na literatura científica.

Isospora brasilsatoae Oliveira e Berto n. sp.

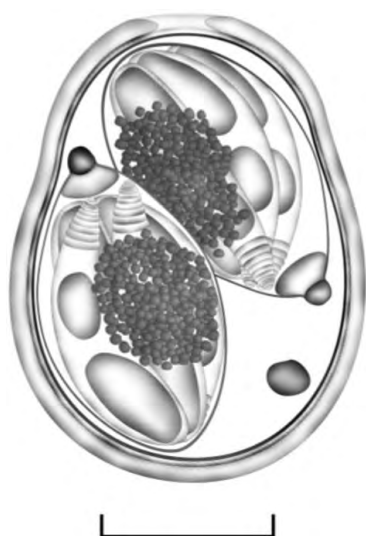


Figura 2. Desenho do oocisto esporulado de *Isospora brasilsatoae* n. sp, novas espécies de coccídio recuperada de *Turdus flavipes*, *Turdus leucomelas* e de *Turdus amaurochalinus*. Barra de escala: 29910µm.

Hospedeiro tipo: Sabiá-una *Turdus flavipes* Vieillot, 1818 (Aves: Passeriformes: Turdidae). Outros hospedeiros: Sabiá-barranco *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 (Aves: Passeriformes: Turdidae); Sabiá-poca *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 (Aves: Passeriformes: Turdidae).

Localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22° 26'57 "S, 44° 36'25" W), sudeste do Brasil.

Outras localidades: Cacaria (22° 42'51 "S, 43 ° 50'38" W) e Guapimirim (22° 31'10 "S, 43° 00'36" W), também do sudeste do Brasil.

Material-tipo: foto-tipo, desenhos de linhas e oocistos recuperados de *T. flavipes* em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (Williams et al. 2010) são depositados no Museu de Zoologia da UFRRJ, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2018007. As fotomicrografias também são depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o repositório número P-90/2018. As fotografias do espécime hospedeiro-tipo (simbiotipo) são depositadas na mesma coleção.

Registro do ZooBank: Para cumprir os regulamentos estabelecidos no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 2012), os detalhes das novas espécies foram submetidos ao ZooBank. O identificador das ciências da vida (LSID) para *Isospora brasilsatoae* é urn: lsid: zoobank.org: ato: ED3F1187-FB31-439E-B5E2-9F3C0A050BE0.

Esporulação: Exógena. Todos os oocistos foram capturados nas fezes sem esporulação e foram esporulados completamente no dia 7 em solução de K₂Cr₂O₇ à temperatura ambiente (20–25 ° C).

Etimologia: O nome específico é derivado do nome da parasitologista brasileira Dra Marília de Carvalho Brasil Sato, dada em sua homenagem por sua contribuição ao estudo da taxonomia e ecologia de parasitas.

Descrição: Oocisto (n = 15) ovoidal a piriforme, 25 a 30 × 19 a 23 (26,8 × 21,1); relação comprimento / largura (L / W) de 1,2-1,4 (1,27). Parede com duas camadas, delicada, 1,4–1,8 (1,6) de espessura, camada externa lisa, c.2 / 3 da espessura total. Micrópila presente, sem capuz polar, rugas ou invaginação da camada interna perceptível. Resíduo de oocisto ausente, mas 1 a 3 grânulos polares arredondados presentes. Esporocisto alongado ovoidal com extremidade anterior cônica (onde é o complexo Stieda / sub-Stieda), 17 × 19 × 10 × 11 (18,1 × 10,5); Razão L / W 1,6-1,9 (1,72). Corpo de Stieda presente, em forma de botão, com 2,0 x 2,0 de largura. Corpo de Sub-Stieda presente, trapezoidal, 1,5 alta × 3,5 de largura. Corpo de Para-Stieda ausente. O resíduo de esporocisto está

presente, como um corpo subsférico distinto, constituído por numerosos pequenos grânulos que parecem estar ligados à membrana, 6-9 (7,5). Esporozoítos vermiformes, com corpos refratários anteriores e posteriores e estrias.

Observações: *Isospora brasilsatoae* é diferente de outras espécies coccidianas de Turdidae do Novo Mundo em vários aspectos (Tabela 1). É o único a ter uma forma piriforme dos oocistos. Possui uma micrópila, característica presente apenas nos oocistos de *Isospora albicollis* Lainson & Shaw, 1989, *Isospora sabiai* Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes & Berto, 2017 e *Isospora machadoae* Pinho, Silva, Rodrigues, Lopes, Oliveira, Luz, Ferreira, Lopes & Berto, 2018 (LAINSON & SHAW 1989; PINHO *et al.*, 2017a; 2017b; 2018).

Desses três, *I. brasilsatoae* pode ser facilmente diferenciado por ter até três grânulos polares arredondados, esporocistos alongados ovoidal (razão L / W > 1,6), corpo trapezoidal do corpo sub-Stieda e resíduo compacto.

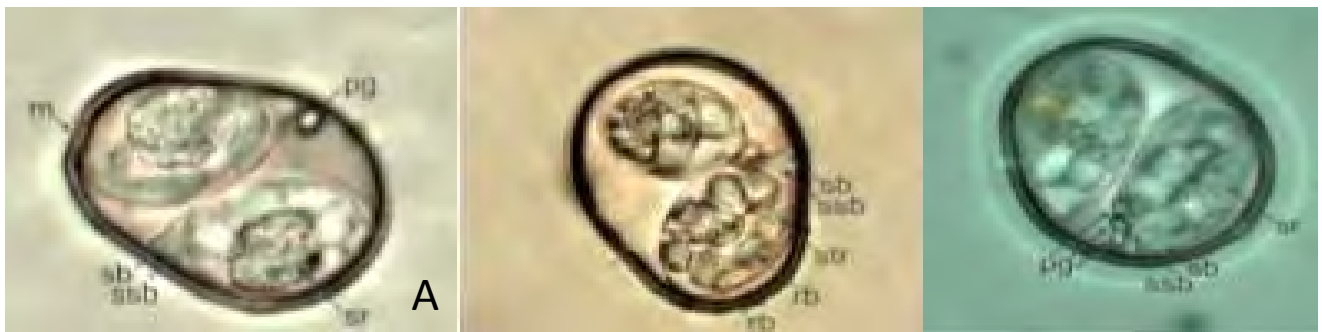


Figura 3. Fotomicrografias (A-C) de oocistos esporulados de *Isospora brasilsatoae* n. sp, nova espécie de coccídio recuperada *Turdus flavipes* (A), *Turdus leucomelas* (B) *Turdus amaurochalinus* (C). Corpo de Stieda (sb), corpo sub-Stieda (ssb), resíduo de esporocisto (sr), estrias (str) e o corpo refrátil (rb). Barra de escala: 10µm.

DISCUSSÃO

Os sabiás capturados no presente estudo pertencem a espécies florestais, apresentam hábitos alimentares semelhantes, como invertebrados em solo úmido e alimentação de frutas e bagas (VOGEL *et al.*, 2014). Assim, os sabiás nos ambientes antropogênicos podem apresentar alterações em seus hábitos, gerando maior gasto energético na adaptação aos diferentes ambientes, predispondo-os a transmissões e infecções (GIRAUDEAU *et al.*, 2014). Além disso, estudos como de Souza *et al.* (1992) enfatizam que os ambientes florestais apresentam aves menores com hábitos de alimentação predominantemente frugívoros, que tendem a ter maior prevalência e densidades de coccídios. Apesar disso, as amostras fecais recuperadas dos sabiás do presente estudo não eram excessivamente densas e as aves estavam aparentemente saudáveis, demonstrando que essas aves não sofriam de coccidiose, mesmo em ambientes antropogênicos.

Os coccídios da família hospedeira Turdidae no Novo Mundo integram um dos poucos grupos de coccídios a serem bem caracterizados e diferenciados no "The coccidia of the world". Desde os trabalhos de McQuiston & Holmes (1988) e Lainson & Shaw (1989) até os trabalhos mais recentes do século XXI, as espécies coccidianas dessa família anfitriã foram descritas com precisão e em grande detalhe, com isso, espécies dificilmente identificadas como *I. sabiai*, que exigem muitas observações e avaliações morfométricas para sua caracterização (PINHO et al., 2017b), conseguem ser identificadas com facilidade, pois mesmo as espécies que apresentam características proeminentes como *I. albicollis* e *I. machadoae* são bem diferenciadas (LAINSON & SHAW 1989; PINHO et al., 2018), como mostrado na Tabela 1.

Isospora brasilsatoae é um exemplo de espécie coccidiana com características muito proeminentes, o que facilita consideravelmente sua identificação. Além do grande tamanho, a forma piriforme observada na grande maioria de seus oocistos, somada ao esporocisto muito alongado com sua extremidade cônica (onde é o complexo Stieda / sub-Stieda), permite a identificação de *I. brasilsatoae* com precisão.

Finalmente, a comparação de *I. brasilsatoae* as demais espécies de *Isospora* descritas da família anfitriã Turdidae no Novo Mundo (Tabela 1) apoia claramente a designação como uma espécie única. Portanto, *I. brasilsatoae* é considerado novo na ciência, sendo a nona descrição de Sabiás do Novo Mundo.

Tabela 1. Morfologia comparada de *Eimeria* spp. recuperados de Columbidae do Novo Mundo

Coccidio	Hospedeiro	Refêrencia	Oocistos							Sporocysts						
			forma	Comp. (µm)	Larg. (µm)	Índice Morfométrico	Parede	Micrópila	grânulo Polar	Forma	Comp. (µm)	Larg. (µm)	Índice Morfo métric	Corpo Stieda	Corpo SubStieda	Resíduo
<i>Eimeria</i>																
<i>labbeana</i>	<i>Columbalivia</i>	Levine et al. (1980)	elipsoidal	25–28 (27)	18–20 (19)	–	suave	ausênte	presente	ovóide	15–18 (16)	10–11 (11)	–	presente	presente	compato
<i>Isospora</i>																
<i>robini</i>	<i>Turdus migratorius</i>	McQuiston & Holmes (1988)	elipsoidal ou ovóide	20–28 (23)	16–22 (20)	(1.2)	suave	ausênte	presente	ovóide	10–17 (13.8)	7–12 (9.0)	(1.5)	semelhan e a mamilo	proeminente	compato
<i>tucuruensis</i>	<i>Turdus albicollis</i>	Lainson & Shaw (1989)	Subsférico	15–19 (17.3)	14–19 (17.1)	–	suave	ausênte	presente, único, ~ 3 × 2	elipsoidal	10–13 (11.8)	7–10 (8.4)	–	semelhan e a mamilo	amplo, 0.5 × 1.5	difuso ou compato
<i>albicollis</i>	<i>T. albicollis</i>	Lainson & Shaw (1989)	ovóide	22–27 (24.5)	19–24 (20.3)	–	suave	presente	presente, único, ~ 2.5 × 2	elipsoidal	12–15 (16.0)	8–10 (11.2)	–	em forma de mamilo para bolha Tipo	amplo, 1.0 × 4	diuso ou compato
<i>I. albicollis</i>	<i>T. albicollis</i> ; <i>Turdus leucomelas</i>	Pinho et al. (2017a)	ovóide	23–26 (24.4)	18–22 (19.7)	1.2–1.4 (1.24)	suave	presente	presente, único	elipsoidal	14–17 (15.4)	9–11 (10.1)	1.5–1.6 (1.52)	botão para arredondado, 1.7 × 1.3	amplo, 1.5 × 3.1	difuso ou compato

<i>Isospora</i>																
<i>zorzali</i>																
Keeler, Yabsley, Gibbs, McGraw and Hernandez, 2012	<i>Catharus aurantiostrius</i> (Hartlaub, 1850)	Keeler et al. (2012)	Redondo, levemente ovóide	16–24 (19.7)	15–21 (18.6)	(1.1)	suave	ausente	presente, 1 to 2	ovóide	11–18 (14.5)	7–11 (8.5)	(1.7)	semelhant e a mamilo	ausente	difuso ou compato
<i>Isospora</i>																
<i>massardi</i>																
Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira and Lopes, 2014	<i>T. albicollis</i>	Lopes et al. (2014)	subsférico	15–21 (18.6)	14–19 (17.7)	1.0–1.1 (1.1)	suave	ausente	presente, 2 grânulos elipsoidais, 1.5 × 0.5	ovóide	13–16 (14.8)	8–11 (9.3)	1.4– 1.8 (1.6)	Tipo botão paraarredondado arredonda , 1.5 × 3.5 do, 1 × 2		difuso
<i>Isospora</i>																
<i>sabiai</i> Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes and Berto, 2017																
	<i>T. albicollis</i> ; <i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818; <i>T.</i> <i>leucomelas</i> ; <i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	Pinho et al. (2017b)	subsférico para elipsoidal	17–27 (20.9)	15–24 (18.6)	1.0–1.4 (1.12)	1.0–1.4 (1.12)	presente, imperceptível	presente, forma de lascas ou vírgulas	alongado para elipsoidal para reniforme	14–22 (16.5)	7–12 (9.2)	1.5– 2.1 (1.8)	presente, presente, tipo arredondado botão, 0.5 para cônico, × 2.0 1.0 × 2.0		compato
<i>Isospora</i>																
<i>machadoae</i>																
Pinho, Silva, Rodrigues, Lopes, Oliveira, Luz, Ferreira,	<i>T. albicollis</i>	Pinho et al. (2018)	subsférico	21–24 (22.2)	20–23 (21.2)	1.0–1.2 (1.1).	rude	presente	presente, 1 a 2 subsféricos e robustos	elipsoidal	12–14 (13.3)	9–11 (9.7)	1.2– 1.5 (1.4)	achatado em forma de meia lua, 0.5 × 1.5	arredondado , 1.5 × 2.5	difuso

Lopes and Berto, 2018																			
<i>Isospora brasilsatoae</i>	<i>T. flavipes</i> ; <i>T. leucomelas</i> ; <i>Turdus amaurochalinus</i>	current work	ovóide a periforme)	25–30 (26.819–23 (21.1)	1.2–1.4 (1.27) suave	presente	presente, 1 a 3, arredondados	alongado	17–19 (18.1)	10–11 (10.5)	1.6–1.9 (1.72)	tipo botão, 2.0 × 2.0	trapezoidal, 1.5 × 3.5	comparto					

BIBLIOGRAFIA

- BERTO, B. P. . M. D. . & L. C. W. G. **Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida).** Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 23, p. 1–15, 2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016). Available from: <http://www.birdlife.org> (accessed 11 june2018).
- DUSZYNSKI, D.W. . & WILBER. P. A **guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae.** Journal of parasitology, v. 83, p. 333-336, 1997.
- GIRAUDEAU M, MOUSEL M, EARL S. MCGRAW K. **Parasitas na cidade: o grau de urbanização prediz infecções por poxvírus e coccídeos em tentilhões (*Haemorrhous mexicanus*).**PLoS One, v. 9 (2): e86747, 2014.
- ICMBIO Parque Nacional do Itatiaia. 2018a. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia> (accessed 20 june 2018). ICMBIO. Parque Nacional Serra dos Órgãos. 2018b. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos> (accessed 20 june 2018).
- ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of **the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication.** Bulletin of Zoological Nomenclature, v. 69, p. 161-169, 2012.
- KEELER, S. P., YABSLEY, M. J., GIBBS, S. E., MCGRAW, S. N. & HERNANDEZ, S. M. A **new *Isospora* species of passerines in the family Turdidae from Costa Rica.** Journal of Parasitology, v. 98, p. 167-169, 2012.
- LAINSON, R., & SHAW, J. J. **Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds.** Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, v. 11, p. 349-365, 1989.
- LOPES, B. B., BERTO, B. P., LUZ, H. R., GALVÃO, G. S., FERREIRA, I. & LOPES, C. W. G. ***Isospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil.** Acta Parasitologica, v. 59, p. 272-275, 2014. LEVINE, N. D., VAN RIPER, S., & VAN RIPER, C. **Five new species of *Isospora* from Hawaiian Birds.** Journal of Protozoology, v. 27, p. 258-259, 1980.
- LEWINSOHN, T. M., & PRADO, P. I. **How many species are there in Brazil?** Conservation Biology, v. 19, p. 619-624, 2005.
- MARINI, M. A., & GARCIA, F. I. **Conservação de aves no Brasil.** Megadiversidade, v.1, p. 95-102, 2005.
- MCQUISTION, T. E., & HOLMES, B. B. ***Isospora robini* sp. n., a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the American robin (*Turdus migratorius*).** Proceedings of the Helminthological Society of Washington, v. 55, p. 324-325, 1988.
- PINHO, I. F. D., SILVA, L. M. D., RODRIGUES, M. B., OLIVEIRA, M. D. S., LOPES, B. B., LUZ, H. R., FERREIRA, I., LOPES, C. W. G. & BERTO, B. P. ***Isospora albicollis* (Apicomplexa: Eimeriidae) in thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae), in southeastern Brazil.** Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 26, p. 231-234, 2017a.
- PINHO, I. F., RODRIGUES, M. B., SILVA, L. M., LOPES, B. B., OLIVEIRA, M. S., FERREIRA, M. A., CARDOZO, S. V., LUZ, H. R., FERREIRA, I., LOPES, C. W. G. & BERTO, B. P. **Characterization and distribution of *Isospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil.** Journal of Parasitology, v. 103, p.285-291, 2017b.
- PINHO, I. F. D., SILVA, L. M. D., RODRIGUES, M. B., LOPES, B. B., OLIVEIRA, M. S., LUZ, H. R., FERREIRA, I., LOPES, C. W. G., & BERTO, B. P. ***Isospora machadoae* sp. nov. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian species from white-necked thrushes *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) of South America.** Zoologia, v. 35, e24570, 2018. Sick, H. **Ornitologia Brasileira.** "Rio de Janeiro", Nova Fronteira, 1997.
- SOUZA, F. D., DE ROMA, J. C., & GUIX, J. C. **Consumption of *Didymopanax pachycarpum* unripe fruits by birds in**

southeastern Brazil. *Miscellanea Zoológica*, v. 16, p. 246-248, 1992. VOGEL, H. F., METRI, R., & ZAWADZKI, C. H. **Comunidade e partilha ecológica de turdídeos (Aves: Passeriformes) em um fragmento urbano de floresta com araucárias em Guarapuava no Sul do Brasil.** *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 17, p. 151-152, 2014.

WILLIAMS, R. B., THEBO, P., MARSHALL, R. N., & MARSHALL, J. A. **Coccidian oöcysts as**

type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, v. 76, p. 69-76, 2010.

CAPÍTULO II

Nova espécie de Eimeria de rolinhas-roxas

*Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and Eimeria columbinae
n. sp. from Columbina talpacoti (Temminck, 1809) from Brazil*

Resumo

Coccídios (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) de aves Columbiformes (Aves: Columbiformes) são descritos desde o final do século XIX; no entanto, algumas dessas descrições eram pouco detalhadas ou inconclusivas, resultando em uma dificuldade atual na identificação de espécies com base nas descrições originais. Nesse sentido, o presente trabalho faz uma revisão taxonômica detalhada, reconsiderando e ajustando 18 *Eimeria spp.* e duas *Isospora spp.* previamente descrita ou relatada de Columbiformes. Junto com isso, uma nova espécie de *Eimeria* é identificada morfológica e molecularmente pelo gene da subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial (COI) e pelo gene do RNA ribossômico da pequena subunidade 18S (18S) da rolinha-roxa *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) na região do Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Eimeria columbinae* n. sp. possui oocistos subsféricos, $14,7 \times 13,2 \mu\text{m}$, com parede lisa de duas camadas, $\sim 1,1 \mu\text{m}$ e razão comprimento / largura de 1,1. Resíduos e micrópila no oocisto estão presentes, e grânulo polar ausente. Os esporocistos são elipsoidais a leve assimetria, $9,0 \times 5,1 \mu\text{m}$, com os corpos de Stieda e sub-Stieda. Resíduo de esporocisto presente e esporozoítos com corpo e núcleo refratários. Esta é a décima nona descrição de uma espécie Eimeriidae de Columbiformes no mundo e a segunda a ter uma identificação molecular dos genes COI e 18S.

Palavras-chave

Taxonomia; morfologia; coccídios; *Eimeria*; oocistos; Columbiformes; Columbidae; Barra Mansa; Santa Rita de Cássia; Pinheiral; IFRJ; Rio de Janeiro; Brasil

Abstract

Coccidia (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) of Columbiform birds (Aves: Columbiformes) have been described since the end of the 19th century; however, some of these descriptions were poorly detailed or inconclusive, resulting in a current difficulty in identifying species based on the original descriptions. In this sense, the current work makes a detailed taxonomic revision reconsidering and adjusting 18 *Eimeria* spp. and two *Isospora* spp. previously described or reported of Columbiformes. Along with this, a new species of *Eimeria* is morphologically and molecularly identified by the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene and by the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene from the ruddy ground-dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) in the Médio Paraíba region of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Eimeria columbinae* n. sp. has sub-spherical oocysts, $14.7 \times 13.2 \mu\text{m}$, with smooth, bi-layered wall, $\sim 1.1 \mu\text{m}$ and length/width ratio of 1.1. Micropyle and oocyst residuum are present, but polar granule is absent. Sporocysts are ellipsoidal to slight asymmetry, $9.0 \times 5.1 \mu\text{m}$, with both Stieda and sub-Stieda bodies. Sporocyst residuum present and sporozoites with refractile body and nucleus. This is the nineteenth description of an eimerian species of Columbiformes in the World, and the second to have a molecular identification of the COI and 18S genes.

Keywords

Taxonomy; morphology; coccidia; *Eimeria*; oocysts; Columbiformes; Columbidae; Barra Mansa; Santa Rita de Cássia; Pinheiral; IFRJ; Rio de Janeiro; Brazil

INTRODUÇÃO

A ordem Columbiformes reúne um total de 367 espécies em apenas uma família: a família Columbidae (IUCN, 2019). Essas espécies têm distribuição mundial, com 23 espécies em território brasileiro (PIACENTINI et al., 2015). Considerada uma espécie sinantrópica, a Rolinha-roxa *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) é bastante abundante em centros urbanos ou regiões antropizadas. É completamente adaptada às áreas urbanas, semelhante ao pombo comum *Columba livia* Gmelin, 1789, sendo encontrado em grandes edifícios verticais, praças e em casas à procura de comida. Foi uma das primeiras espécies de aves brasileiras a se adaptar ao ambiente urbano e, curiosamente, atualmente é observada em maior quantidade nas áreas urbanas do que em seu habitat original (SICK, 1997).

Às vezes, as aves Columbiformes são relatadas por uma alta taxa de parasitismo dos mais diversos tipos, tomando como exemplo o parasitismo por coccídio. Os coccídios são protozoários parasitos intracelulares obrigatórios relacionados ao parasitismo intestinal dos mais diversos grupos de animais (BERTO et al., 2014). A identificação específica dos coccídios é baseada na morfologia do oocisto esporulado e complementada por abordagens que incluem a quantificação de oocistos (oocistos por grama de fezes ou gota fecal), locais de infecção, especificidade do hospedeiro, aspectos ecológicos, genotipagem de genes específicos (DUSZYNSKI & WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2011).

O gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) é frequentemente encontrado em Columbiformes; embora duas espécies de *Isospora* spp. também tenham sido relatados a partir dessa ordem (VARGHESE 1978a; JAMRISKA & MODRÝ, 2012; MATSUBARA et al., 2017). Essas descrições datam do final do século XIX; no entanto, alguns deles eram pouco detalhados ou inconclusivos, resultando em uma dificuldade atual na identificação de espécies com base nas descrições originais. Nesse sentido, o trabalho atual aborda uma revisão taxonômica detalhada, reconsiderando e ajustando as espécies Eimeriidae descritas anteriormente para os Columbiformes. Junto com isso, uma nova espécie de *Eimeria* é identificada morfológicamente e molecularmente pelo gene da subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial 1 (COI) e pelo gene do RNA ribossômico da subunidade 18S pequena (18S) da rolinha – roxa *C. talpacoti* na Região do Médio Paraíbado Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil.



Figura 1: Representante da *Columbina talpacoti*, ave hospedeira.

METODOLOGIA

As expedições foram realizadas em seis momentos em duas localidades diferentes na região do Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. A primeira expedição ocorreu em julho de 2018 em uma área rural no Distrito de Santa Rita de Cássia, no município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro (27° 29'48"S, 44° 09'45"W), que é uma comunidade ecológica do clímax, caracterizado por compreender espécies que são as melhores competidoras da comunidade local. As últimas cinco expedições foram realizadas em agosto, setembro, outubro e novembro de 2018 e janeiro de 2019, no campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro (22° 31'37"S, 43° 59'45"W), que é uma comunidade em sucessão secundária em processo de reflorestamento. Redes de neblina foram usadas para a captura das aves. Um total de quatro rolinhas - roxas, *C. talpacoti*, foram capturadas (um de Barra Mansa e três de Pinheiral).

RESULTADOS

Descrição das novas espécies

Quatro espécimes de *C. talpacoti* foram capturados, mas apenas um foi positivo para coccídios. Os oocistos observados eram característicos de *Eimeria*; no entanto, eles não tinham as mesmas características com nenhuma espécie de *Eimeria sp.* relatado anteriormente em Columbiformes. Portanto, esta nova espécie é descrita da seguinte forma:

Eimeria columbinae n. sp. Ortúzar-Ferreira e Berto n. sp.

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981
Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987
Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970
Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901
Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879
Família: Eimeriidae Minchin, 1903
Gênero: *Eimeria* Schneider, 1875

Oocisto (n = 20) subsférico a elipsoidal, 13-16 × 12-14 (14,7 × 13,2); (L / W) de 1,0 a 1,2 (1,11). Parede com duas camadas, espessura de 1,0–1,2 (1,1 μm), camada externa lisa, c.2 / 3 da espessura total. Micrúpila discreta, mas perceptível quando há uma invaginação da camada interna, com 3,0 a 4,5 (3,8) de largura. Resíduo de oocisto presente, constituído por grânulos parcialmente ligados e / ou difundidos entre os esporocistos, que parecem estar ligados à membrana. Grânulo polar ausente. Esporocisto elipsoidal a ligeiramente assimétrico, 8-10 × 5–6 (9,0 × 5,1); Razão L / W 1,6-2,0 (1,77). Corpo de Stieda presente, achatado em forma de meia-lua, 0,2 alta × 1,0 de largura. Corpo de Sub-Stieda presente, arredondado, 0,6 de altura × 1,3 de largura. Corpo de Para-Stieda ausente. Resíduo de esporocisto presente, constituído por numerosas esférulas de diferentes tamanhos. Esporozoítos vermiformes, com corpo refratário posterior e núcleo central.

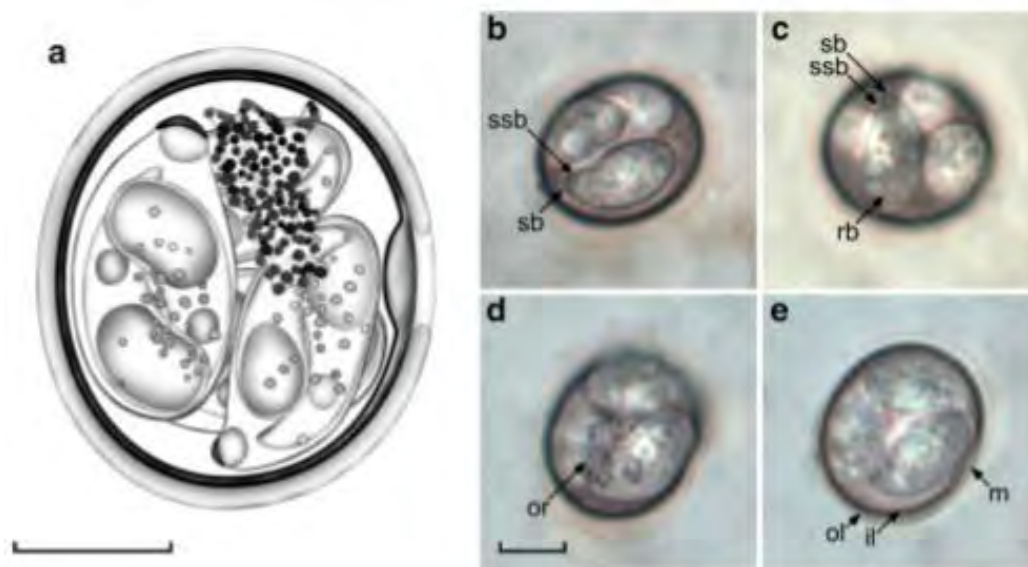


Figura 2. Desenho (A) e fotomicrografias (B – E) de oocistos esporulados de *Eimeria columbinae* n. sp. recuperado da Rolinha-roxa *Columbina talpacoti*. Observe a camada interna (il) e externa (ol) da parede da micrúpila do oocisto (m), resíduo do oocisto (ou), corpo refrátio (rb), corpo de Stieda (sb) e subStieda (ssb). 5 μm.

Hospedeiro tipo: *Columbina talpacoti* Temminck, 1809 (Aves: Columbiformes: Columbidae), rolinha-roxa. Localidade tipo: Distrito de Santa Rita de Cássia (27° 29'48"S, 44° 09'45"W), município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil.

Material-tipo: fotosintipos, desenhos de linhas e oocistos recuperados de *C. talpacoti* em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (WILLIAMS *et al.*, 2010) são depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2019015. As fotomicrografias também são depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o número de repositório P-93/2019. As fotografias da amostra do tipo hospedeiro (simbiotipo) são depositadas na mesma coleção.

Sequência de DNA representativa: a amplificação de DNA do gene COI e 18S mostrou uma faixa clara em torno de ~ 250 pb e ~ 400 pb, respectivamente. As seqüências representativas de COI e 18S foram depositadas no banco de dados GenBank sob os respectivos números de acesso MN088854 e MN082528. Registro do ZooBank: Para cumprir os regulamentos estabelecidos no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 2012), os detalhes das novas espécies foram enviados ao ZooBank. O Identificador de Ciências da Vida (LSID) para *Eimeria columbinae n. sp.* is urn: lsid: zoobank.org: act: D861188CD367-444E-87E7-64586EB5F2CA.

Esporulação Exógena: Todos os oocistos foram capturados nas fezes sem esporulação e foram esporulados completamente no quarto dia em solução de K₂Cr₂O₇ à temperatura ambiente (20–25 °C). Etimologia: O epíteto específico é derivado do nome genérico do hospedeiro-tipo.

Análise filogenética

A análise filogenética incluiu seqüências de coccídios disponíveis no GenBank (Figs. 5 e 6). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) foi usado como grupo externo. Dentre a análise filogenética baseada no gene COI, *E. columbinae n. sp.* ficou em um clado com a similaridade de 98,5% com um *Isospora sp.* recuperados de *Plectrophenax nivalis* Linnaeus, 1758 na República Tcheca (TREFANCOVÁ ET AL., 2019).

Outras espécies de *Isospora spp.* de aves do Velho Mundo, mas também do Novo Mundo, como *Isospora sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro, Lopes, 2005, de *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Rodrigues *et al.*, 2019), representou em cladogramas vizinhos. A semelhança em comparação com *Eimeria sp.* de Yang *et al.* (2016) foi de 95%. Este isolado é a única espécie de

Columbiformes com sequência COI depositada no GenBank; no entanto, essa espécie estava em um clado distante de *E. columbinae* n. sp nesta análise filogenética. Na análise filogenética baseada em 18S, *E. columbinae* n. sp estava presente em um clado composto por todos os coccídios de Columbiformes depositados no GenBank, com a similaridade de 100% com *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016). Os cladogramas vizinhos eram compostos por espécies de *Eimeria* de aves não Columbiformes, como papagaios, perus e galinhas, com uma similaridade de ~ 99,5%; e por *Cyclospora* spp. e *Eimeria* spp. de mamíferos, como primatas, morcegos, roedores e ruminantes, com uma similaridade de ~ 99,3%.

DISCUSSÃO

Revisão taxonômica de espécies eimerioides de Columbiformes e suas comparações com E. columbinae n. sp.

Como evidenciado em estudos sobre taxonomia de coccídios, parece haver uma especificidade em nível familiar nos coccídios parasitos da classe Aves, principalmente na ordem Passeriformes (DUSZYNSKI & WILBER 1997; BERTO et al., 2011). De fato, isso não é problemático no presente estudo, uma vez que a ordem Columbiformes tem apenas uma família: Columbidae. Portanto, seria altamente improvável que houvesse uma transmissão cruzada de coccídios entre aves de diferentes ordens; nesse caso, um coccídio de um não Columbiforme não infecta uma ave Columbiforme. Nesse contexto, a espécie *Eimeria columbina* foi comparada em detalhes com espécies de coccídios que foram encontradas em aves pertencentes a Ordem Columbiformes. Até o momento, são relatadas 20 espécies de Eimeriidae da família Columbidae, sendo 18 *Eimeria* spp. e duas *Isospora* spp.

Isospora gallicolumbae Varghese, foi descrita a partir da pomba de bronze ocidental *Alopecoenas beccarii* (Salvadori, 1876) em Papua, Nova Guiné (VARGHESE, 1978a). Surgem dúvidas quanto à validade dessa espécie devido ao parasitismo atípico de *Isospora* spp. fora dos Passeriformes. Essas dúvidas são favorecidas após os últimos relatos de pseudoparasitismo de *Isospora* spp. em roedores e outros animais que apresentam as fezes dos Passeriformes como pseudoparasitas em suas fezes (TREFANCOVÁ et al., 2019). Além disso, Varghese (1978a) não detalhou a morfologia dessas espécies, apesar de apresentar fotografias, embora este autor tenha observado e medido 50 oocistos. Nesse sentido, seria importante que essa espécie fosse reexaminada

para validação e morfologia, e que outras características biológicas, ecológicas e moleculares sejam complementadas.

Recentemente, Matsubara et al. (2017) descreveram espécies de *Isospora sp.* de pombos domésticos *C. livia* no Japão, tornando-se o segundo relatório de um *Isospora sp.* de Columbiformes na literatura científica. Matsubara et al. (2017) apresentaram uma fotomicrografia, um desenho, uma descrição morfológica razoável dos oocistos, bem como a identificação molecular dos genes do RNA ribossômico da grande subunidade (S) de 18S e 28S (28S). O baixo número de oocistos observados e uma morfologia detalhada inadequada podem ter evitado o nome de uma nova espécie, uma vez que *Isospora sp.* não foi nomeada taxonomicamente neste trabalho. Vale ressaltar que a fotomicrografia apresentada em Matsubara et al. (2017) mostra claramente, mesmo que com foco específico, uma inclusão no corpo de sub-stieda, característica comum em espécies de *Isospora* de pardais, mas incomum em outros grupos (GRULET et al., 1982). Essa característica foi incluída no desenho desta espécie no trabalho atual.

Eimeria labbeana (Labbe, 1896) Pinto, 1928 foi o primeiro parasito Eimeriidae descrito a partir de Columbiformes. Labbe (1896) descreveu originalmente esta espécie como *Coccidium pfeifferi* Labbe, 1896, até Pinto (1928) corrigir sua nomenclatura passando a espécie para o gênero *Eimeria*; no entanto, como o nome *Eimeria pfeifferi* Labbe, 1896, já era pre ocupado por um parasito de uma centopéia do gênero *Geophilus* Leach, 1814, pela lei de prioridade, a espécie foi renomeada para *E. labbeana*. Várias espécies Columbiformes são registradas como hospedeiras para esta espécie: o pombo comum *Columba livia* Gmelin, 1789; a pomba de coleira *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838; a rola oriental *Streptopelia orientalis* Latham, 1790; e a Rola do senegal *Spilopelia senegalensis* Linnaeus, 1766 9Labbe 1896; Nieschulz 1935; Hunt e O'Grady 1976; Abdel-Ghaffar et al. 1986). Bhatia et al. (1972) descreveram *Eimeria choudari* Bhatia et al. 1972, em um estudo com aves e mamíferos do zoológico de Delhi, na Índia; no entanto, essa espécie foi registrada como sinônimo de *E. labbeana* devido às equivalências taxonômicas entre suas descrições (DUSZYNSKI et al., 2000). *Eimeria columbinae* n. sp. possui medidas menores que *E. labbeana*, além de divergência em relação à presença de um resíduo de esporocisto e de um corpo sub-Stieda (Figs. 1, 2 e 3; Tabela1).

Eimeria columbarum Nieschulz, 1935 (Fig. 3D) foi a segunda *Eimeria sp.* descrita a partir de pombos comuns *C. livia*, também na Índia. O trabalho de Nieschulz (1935) foram descritas as novas espécies e as distinguindo-as de *E. labbeana*, que era a única espécie relatada anteriormente de Columbiformes. Décadas depois, Malhotra e Ray (1961) descreveram *Eimeria tropicalis* Malhotra & Ray, 1961, a partir dessa mesma espécie na Índia; no entanto, os oocistos eram morfológicamente equivalentes a *E. columbarum*, sendo, portanto, considerados sinônimos (DUSZYNSKI et al., 2000). Como em comparação a *E. labbeana*, *E. columbinae* n. sp. também possui dimensões ainda menores de oocistos e esporocistos do que *E. columbarum* (Figs. 3, 4 e 5; Tabela 1).

Em *Eimeria columbae*, Mitra e Das-Gupta, 1937, não obtiveram a mesma descrição morfológica detalhada do desenho observado no trabalho de Nieschulz (1935). Embora o ciclo biológico e as formas endógenas tenham sido caracterizados, os oocistos não foram priorizados na descrição morfológica que permite uma identificação mais prospectiva dessa espécie (MITRA & DAS-GUPTA, 1937). Os esporocistos foram extraídos sem um corpo de Stieda e com um tamanho desproporcional em relação ao oocisto, estabelecendo essa espécie morfológicamente incomum ou extraídos da observação de esporocistos em uma posição não longitudinal, o que é potencialmente possível (BERTO et al., 2014). Além disso, fotomicrografias não foram apresentadas para análise, sendo assim, a espécie foi redesenhada a partir do desenho de linha original, incluindo apenas um pequeno corpo de stieda achatado; caso contrário, essa espécie não pode ser encontrada em *Eimeria* sp. (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014). Seria importante que novos estudos dessa mesma espécie hospedeira na Índia fossem realizados para validar essa espécie. Assim, essa espécie é diferente de *E. columbinae* n. sp. pelo tamanho e proporção de oocistos e esporocistos (figuras 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria sphenocercae Ray, 1952 (Fig. 3F), foi descrita a partir do pombo verde *Treron sphenurus* (Vigors, 1832) em Mukteshwar, no distrito de Uttarakhand, na Índia (Ray 1952). Essa é a espécie mais distinguível entre Eimeriidae de Columbiformes. A forma riniforme a elipsoidal com um dente lateral é um padrão morfológico muito atípico dentro dos coccídios do mundo, como pode ser observado nas comparações morfológicas mostradas nas Figs. 3, 4 e 5. Nesse sentido, essa espécie é diferente de *E. columbinae* n. sp., principalmente devido à sua forma única (figuras 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria kapotei Chatterjee & Ray, 1969 (Fig. 3G), foi outro exemplo de uma espécie minimamente descrita, o que prejudicou significativamente a possibilidade de sua identificação posterior, especialmente nos dias atuais. Além disso, Duszynski et al. (2000) consideraram essa espécie um provável sinônimo de *E. labbeana*; no entanto, o tamanho dos oocistos de *E. kapotei* é nitidamente maior e foi descrito com uma micrópila discernível. Portanto, no presente trabalho, essa espécie foi desenhada com base na descrição original, com a esperança de que possa ser identificada novamente, validada e possivelmente descrita. Em comparação com *E. columbinae* n. sp. *E. kapotei* possui oocistos maiores, além de possuir uma micrópila discernível e grânulos polares (Figs. 3, 4 e 5; Tabela 1).

Eimeria turturi Golemansky, 1976 (Fig. 4A) era uma espécie de *Eimeria* descrita de pombas selvagens da Bulgária, especificamente a pomba-europeia *Streptopelia turtur* (Linnaeus, 1758), que é uma espécie classificada como “vulnerável” pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais - IUCN. (IUCN, 2019). Essas informações tornam sua variável em Eimeriidae importante para a conservação da vida selvagem; no entanto, essa coccídio não foi

relatado desde a descrição original de Golemansky (1976). *Eimeria columbinae* n. sp. possui oocistos menores que *E. turturi*, além de possuir micrópila e resíduo de oocisto, o que não é observado em *E. turturi* (figs. 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria waiganiensis Varghese (Fig. 4B) também foi descrita a partir de pombos selvagens, desta vez na Papua Nova Guiné (Varghese, 1978b). Seus hospedeiros eram a pomba esmeralda *Chalcophaps indica* (Linnaeus, 1758) e o pombo-faisão *Otidiphaps nobilis* Gould 1870.

Eimeria duculai Varghese, 1980 (Fig. 4C), e *Eimeria gourai* Varghese, 1980 (Fig. 4D), foram outros dois Eimeriidae descritos a partir de pombos em Papua Nova Guiné, 2 anos após a primeira descrição desse mesmo autor Varghese (1980). O pombo imperial torresiano *Ducula spilorrhhoa* (Gray, 1858) e o pombo-coroadado *Goura victoria* (Fraser, 1844) foram seus hospedeiros-tipo, respectivamente. Entre esses três Eimeriidae relatados na Papua Nova Guiné, *E. gourai* deve ser considerado o mais relevante, porque *G. victoria* é categorizada como "Quase ameaçada" pela IUCN. Suspeita-se que esse pombo selvagem esteja em taxa de declínio moderadamente rápida, dado seu longo tempo de geração e as taxas de perda e degradação de seu habitat no litoral norte da Papua-Nova Guiné (IUCN, 2019).

Parasitas de aves endêmicas em ambientes isolados, como ambientes insulares, tendem a permanecer isolados nesses ambientes junto com seus hospedeiros (BERTO & LOPES, 2013). É o caso dessas três espécies Eimeriidae de pombos na Papua Nova Guiné. Seria altamente improvável que estes fossem transmitidos a pombos na América do Sul. De qualquer forma, *E. columbinae* n. sp. é diferente de todas essas três espécies porque seus oocistos são consideravelmente menores e não possuem grânulos polares (Figs. 3, 4 e 5; Tabela1).

Eimeria palumbi McQuiston, 1991 (Fig. 4E), foi descrita a partir das pombas de Galápagos *Zenaida galapagoensis* Gould, 1841, nas Ilhas Galápagos, que faz parte da República do Equador (MCQUISTION, 1991). Foi a primeira descrição de uma espécie Eimeriidae de uma ave Columbiforme da América do Sul. Essas espécies devem ser isoladas das Ilhas Galápagos, semelhante à amostra anterior; mas, em qualquer caso, os oocistos de *E. columbinae* n. sp. são muito menores que os de *E. palumbi* (Figs. 3, 4, e 5; Tabela1).

Columbina talpacoti foi registrada como o primeiro hospedeiro de uma nova espécie de *Eimeria* somente na década de 2000. Adriano et al. (2000), *Eimeria curvata* Adriano et al. 2000 (Fig. 4F), foi descrita a partir de *C. talpacoti*, bem como da rolinha-pedrês *Columbina squammata* (Lesson, 1831) no município de Junqueirópolis, no oeste do estado de São Paulo, Brasil. Recentemente, essa espécie foi relatada a partir desta mesma espécie hospedeira, *C. talpacoti*, no município de Guapimirim, na região montanhosa do Estado do Rio de Janeiro, demonstrando assim a ampla distribuição desse Eimeriidae, pelo menos no sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2017). Apesar de ser o mesmo hospedeiro do trabalho atual, as diferenças morfológicas de *E. curvata* com *E.*

columbinae n. sp. são evidentes. *Eimeria curvata* possui um corpo Stieda protuberante e ausência de um corpo sub-Stieda, enquanto *E. columbinae n. sp.* tem um corpo Stieda presente delicado e achatado e sub-Stieda. Além disso, o resíduo de esporocisto em *E. curvata* é compacto, enquanto em *E. columbinae n. sp.*, é difusa (Figs. 3, 4 e 5; Tabela 1).

Eimeria zenaidae Adriano et al., 2003 (Fig. 4G), foi a segunda espécie descrita por Adriano et al. (2003), também em Junqueirópolis, São Paulo, Brasil. Esta espécie parasitou a Avoante *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847). Esta espécie é diferenciada por possuir uma parede áspera de oocistos, um corpo Stieda largo e projetado e nenhum corpo sub-Stieda, enquanto *E. columbinae n. sp.* possui um corpo Stieda delicado e achatado e um corpo sub-Stieda (Figs.3,4 e 5; Tabela1).

Eimeria janovyi Bandyopadhyay et al., 2006 (Fig. 5A), é outra espécie descrita de pombos comuns *C. livia* na Índia, desta vez na área de Kalyani, Bengala Ocidental (BANDYOPADHYAY et al., 2006). Essa espécie não possuía descrição detalhada, além de não possuir equivalências entre o desenho e a fotomicrografia. Portanto, no presente trabalho, essa espécie foi redesenhada com base na fotomicrografia apresentada, desconsiderando o desenho antigo. As características apresentadas diferiram de *E. labbeana*, *E. columbarum* e *E. columbae*, que são as três espécies tradicionalmente registradas na Índia. A ausência de uma micrópila, a ausência de resíduo de oocisto, a presença de um grânulo polar e a ausência de um corpo sub-Stieda são características contrárias às encontradas em *E. columbinae n. sp.* (Figuras 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria livialis Alyousif et al. 2009 (Fig. 5B), é outra espécie descrita do pombo comum *C. livia*; desta vez na Arábia Saudita (ALYOUSIF et al., 2009). Essa espécie possui algumas características que a distinguem das demais espécies e *Eimeria* descritas a partir de *C. livia*, como os oocistos elipsoidais alongados e o resíduo do oocisto composto por quatro a sete glóbulos compactados. Esse resíduo globular é a principal característica que diferencia *E. livialis* de outras *Eimeria spp.* de *C. livia*; no entanto, esse recurso característico não é claramente observado nas fotomicrografias originais, apesar de ter sido descrito e desenhado (ALYOUSIF et al., 2009). A forma elipsoidal alongada, oocistos maiores e a ausência de um corpo sub-Stieda distinguem *E. livialis* de *E. columbinae n. sp.* (Figuras 3, 4 e 5; Tabela 1).

Eimeria columbapalumbi Jamriška & Modrý, 2012 (Fig. 5C), foi descrita a partir de pombos-comuns *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, de ambientes urbanos nas Repúblicas Tcheca e Eslovaca (JAMRIŠKA & MODRÝ 2012). O tamanho, a forma e os grânulos polares são as principais características que distinguem essa espécie dos outros parasitos Eimeriidae de seu hospedeiro congênico *C. livia* (figuras 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria mauritiensis Ball et al. 2012 (Fig. 5D), foi descrita a partir do vulnerável pombo-de-rosa *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) em outro ambiente insular: a ilha Maurícia, que fica a cerca de 870 km a leste de Madagascar no Oceano Índico (BALL et al., 2012; IUCN, 2019).

Eimeria columbinae n. sp. é semelhante a *E. columbapalumbi* e *E. mauritiensis* em alguns aspectos morfológicos, mas pode ser facilmente distinguido de outros. Essas espécies não possuem resíduo de oocisto, sendo uma das principais características de *E. columbinae n. sp.* Além disso, os esporocistos de *E. mauritiensis* não são assimétricos como em *E. columbinae n. sp.* *Eimeria columbapalumbi* também possui esporocistos simétricos; no entanto, possui oocistos elipsoidais e não possui corpo sub-Stieda, em comparação com oocistos subesferóides e corpo sub-Stieda de *E. columbinae n. sp.* (Figuras 3, 4 e 5; tabela 1).

Eimeria lyoni Yabsley et al. 2015 (Fig. 5E), foi descrita a partir de Rola-carpideira *Zenaida macroura* (Linnaeus, 1758) em Kentucky, EUA (YABSLEY ET AL., 2015). Essa foi a primeira descrição de uma espécie de *Eimeria* em Columbiformes na América do Norte. *Zenaida macroura* é amplamente distribuída nas Américas do Norte e Central, sendo cercada pela Cordilheira dos Andes no Panamá. Do hemisfério oposto, a rolinha-roxa *C. talpacoti* é amplamente distribuída nas Américas do Sul e Central, chegando ao norte do México na América do Norte, onde é compatível com *Z. macroura* (IUCN, 2019).

Finalmente, uma espécie de *Eimeria* identificada como *E. labbeana-like* (Fig. 5F) foi recentemente descrita a partir de pombos comuns *C. livia* na Austrália (YANG et al., 2016). A distribuição mundial de *C. livia*, nativa ou introduzida, permitiria a identificação de *E. labbeana* na Austrália. No entanto, Yang et al. (2016) não foram capazes de identificar com precisão essa *Eimeria* como a de *E. labbeana*, principalmente porque há descrições para *E. labbeana* com diferenças morfológicas e morfométricas significativas (PINTO, 1928; NIESCHULZ, 1935) (Figs. 3, 4 e 5; Tabela 1). Além disso, a descrição da presença de grânulos polares e resíduo de oocisto não é óbvia nas fotomicrografias. Pode ser que a descrição pertença aos esporocistos e não ao oocisto, ou se refira a alguns detritos aderidos externamente à parede do oocisto.

Assim, no presente trabalho, esse coccídio semelhante a *E. labbeana* é citado como *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016), porque não é exatamente como *E. labbeana*, pelo menos não morfológicamente nem ecologicamente, uma vez que foi descrito em hospedeiros da Austrália que é bastante distante da localidade-tipo de *E. labbeana*. Nesse sentido, essa *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) foi redesenhada (Fig. 5F) com base nas fotomicrografias apresentadas, uma vez que *Eimeria sp.* pode ser identificada novamente, potencialmente descrita, validando como uma nova espécie ou como uma das espécies de *Eimeria* preexistentes de *C. livia*. De fato, todas as *Eimeria spp.* descritas a partir de *C. livia* da Índia precisariam ser reavaliadas a partir de novas amostras da mesma espécie hospedeira e localidade, através de estudos morfológicos e moleculares detalhados, validando e caracterizando essas espécies. Em conclusão, *Eimeria columbinae n. sp.* pode ser distinguido desta *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) porque não possui micrópila, contém grânulos polares e não possui corpo sub-Stieda (figs. 3, 4 e 5; tabela 1).

Embora o trabalho de Yang et al. (2016) tenha sido inconclusivo na identificação específica de *Eimeria* sp., foi pioneira em estudos moleculares de Eimeriidae de Columbiformes. Essa espécie de *Eimeria* recuperada de *C. livia* na Austrália foi sequenciada pelos genes 18S, 28S e COI, sendo a única *Eimeria* sp. de Columbiformes submetidos a identificação molecular.

Análise filogenética

Os primers para amplificação de produtos PCR mais longos foram planejados inicialmente; no entanto, apenas as versões curtas foram amplificadas, 18S e COI. A falha na amplificação de seqüências mais longas pode estar relacionada a problemas com a extração de DNA de um oocisto individual, o que já foi observado por Dolnik *et al.* (2009). Nesta metodologia, o DNA é extraído de oito células (oito esporozoítos / um oocisto), o que garante a identidade molecular da espécie / morfotipo, mas resulta em uma quantidade menor de DNA extraído, principalmente para o DNA nuclear, que está presente em quantidades ainda menores que o DNA mitocondrial. Amostras de DNA extraídas são sujeitas a variações de temperatura durante a manipulação de laboratório, que eram inevitáveis e podem ter causado rupturas de fita de DNA (MARTINEZ et al., 2018). Assim, essas quebras no DNA combinadas com a baixa concentração de DNA podem ter impedido a amplificação de fragmentos mais longos.

A análise filogenética baseada no gene COI (Fig. 6) revelou que a espécie *E. columbinae* está mais próxima de uma *Isospora* sp. de escrevedeira-das-neves *Plectrophenax nivalis* da República Tcheca (TREFANCOVÁ et al., 2019). Neste trabalho de Trefancová et al. (2019), que incluiu a seqüência MH698551 de *P. nivalis* no banco de dados GenBank, várias amostras de *Isospora* spp. de roedores, e outras espécies, foram derivadas e analisadas para identificar o pseudoparasitismo de *Isospora* spp. em roedores. Nesse pseudoparasitismo, os oocistos de *Isospora* passam apenas pelo trato digestivo dos roedores que ingeriram fezes de Passeriformes, o que pode ser confuso para o pesquisador que identifica esses oocistos nas fezes do roedor e sente que é o verdadeiro hospedeiro. *Eimeria columbinae* n. sp. foi comparada também a uma série de *Isospora* spp. que foram considerados pseudoparasitos de ratazanas do banco *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) no trabalho de Trefancová et al. (2019).

Os resultados filogenéticos baseados em COI foram inesperados, já que *E. columbinae* n. sp. estava mais perto de *Isospora* spp. do que para *Eimeria* spp., além desses isolados mais próximos, foram obtidos da República Tcheca, com exceção de *I. sporophilae*, parasita de aves granívoras no sudeste do Brasil (RODRIGUES et al., 2019). No entanto, os gêneros *Isospora* e *Eimeria* são filogeneticamente próximos na família Eimeriidae, principalmente quando são parasitas de aves (YANG et al., 2016).

Inicialmente, foi aceita a hipótese ecológica de que os parasitas coevoluíram com seus hospedeiros (ODUM, 1983); portanto, para *E.columbinae n. sp.* era esperado que estivesse mais próximo da *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016), uma vez que essas duas espécies são parasitas congêneros de Columbiformes. Outra possibilidade seria uma origem filogenética associada às suas localidades geográficas; no entanto, como mencionado anteriormente, *E. columbinae n. sp.* estava mais próximo dos isolados Eimeriidae da Europa do que dos isolados do sudeste do Brasil. Da mesma forma, *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) ficou em um clado longe de *E.columbinae n. sp.* e perto de espécies parasitárias de perus e papagaios. Assim, apenas essas duas *Eimeria spp.* sequenciadas pelo COI de aves Columbiformes impede uma melhor compreensão da filogenia de Eimeriidae de Columbiformes.

Por outro lado, a análise filogenética baseada no gene 18S apresentou resultados consistentes com o pressuposto de coevolução de parasitos e hospedeiros (Fig.6). Observam-se grupos monofiléticos que reúnem espécies de coccídios relacionados a determinadas ordens e classes de hospedeiros. De fato, o gene 18S é amplamente reconhecido como adequado para resolver relações profundas filogenéticas dentro de Apicomplexa (OGEDENGBEETAL, 2015; XAVIER et al., 2018). No entanto, a similaridade observada de 100% entre *E. columbinae n. sp.* e *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) enfatiza que o gene 18S é excessivamente conservado, pelo menos na parte amplificada no presente trabalho. Assim, esse fragmento 18S amplificado é potencialmente adequado para estudos filogenéticos de táxons mais altos, mas inadequado para diferenciação e identificação em nível de espécie. Em outras palavras, as diferenças morfológicas dos oocistos e as diferenças ecológicas associadas aos diferentes hospedeiros e às localidades distantes de *E. columbinae n. sp.* e *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) são incompatíveis com a similaridade genética de 100%. Além disso, uma diferença de apenas duas substituições de nucleotídeos foi observada na comparação de *E. columbinae n. sp.* e *Eimeria spp.* de perus e papagaios, que são espécies filogeneticamente muito distantes.

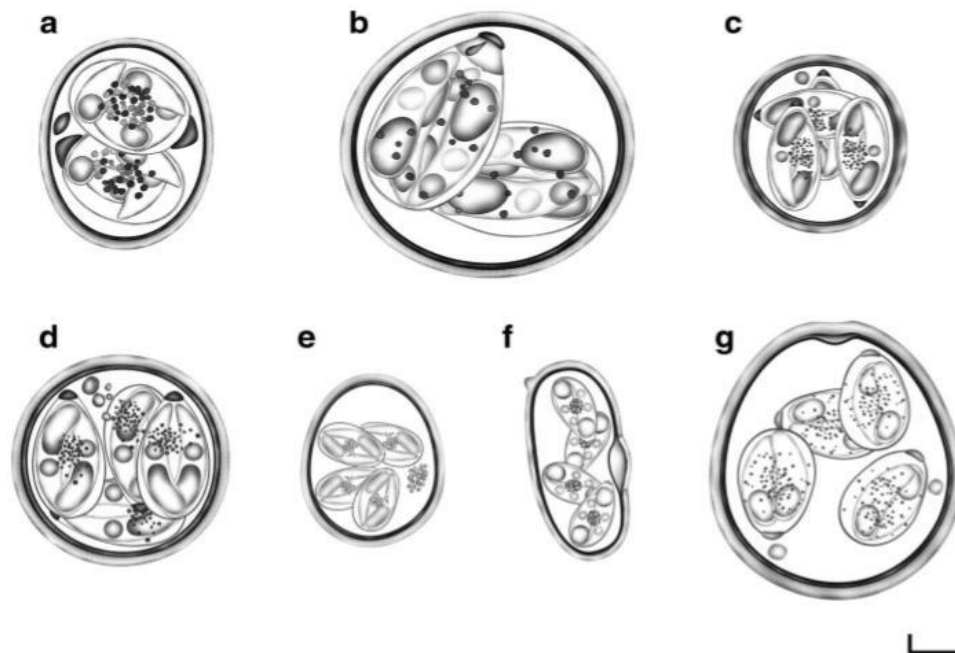


Figura 3. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados em Columbiformes. *Isospora gallicolumbae* (A). *Isospora sp.* De Matsubara et al. (2017) (B). *Eimeria labbeana* (C). *Eimeria columbarum* (D). *Eimeria columbae* (E). *Eimeria sphenocercae* (F). *Eimeria kapotei* (G). Tudo na mesma escala. Barra de escala 10 μ m.

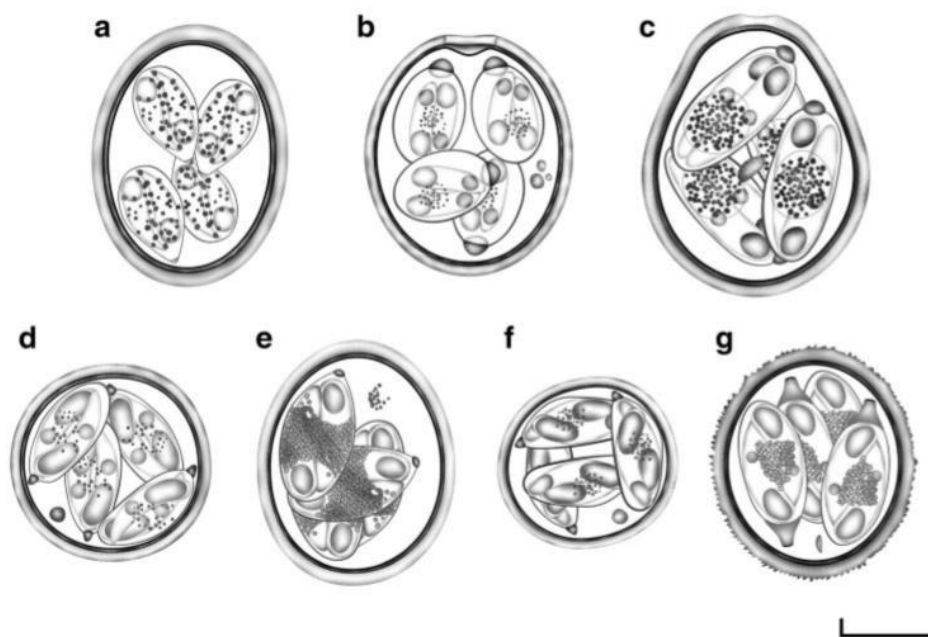


Figura 4. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados em Columbiformes. *Eimeria turturi* (A). *Eimeria waiganiensis* (B). *Eimeria duculai* (C). *Eimeria gourai* (D). *Eimeria palumbi* (E). *Eimeria curvata* (F). *Eimeria zenaidae* (G). Tudo na mesma escala. Barrade escala 10 μ m

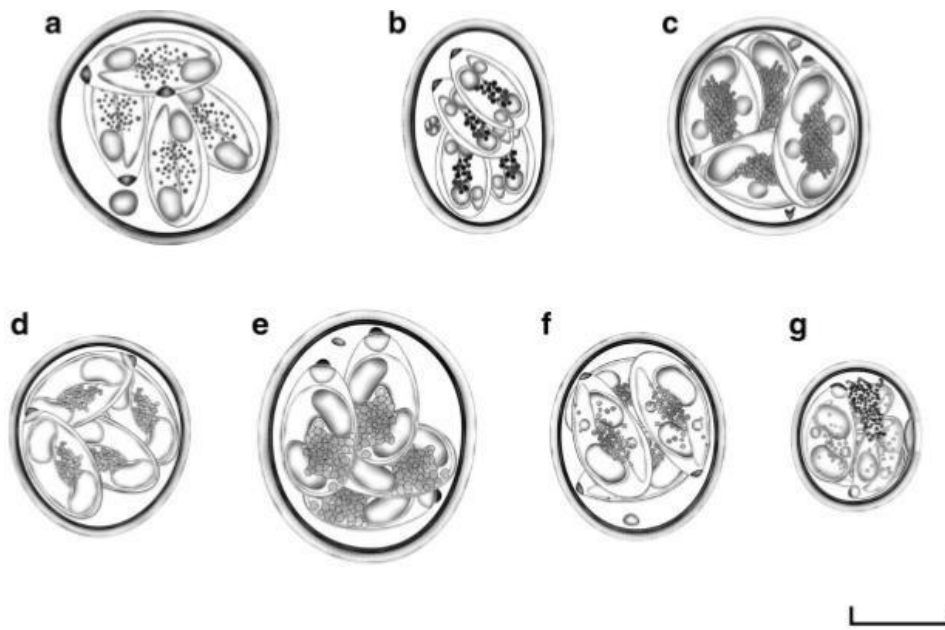


Figura 5. Desenhos de oocistos esporulados de espécies de Eimeriidae registrados em Columbiformes. *Eimeria janovyi* (A). *Eimeria livialis* (B). *Eimeria columbapalumbi* (C). *Eimeria mauritiensis* (D). *Eimeria lyoni* (E). *Eimeria sp.* (F) *Eimeria columbinae* (G). Tudo na mesma escala. Barra de escala

Tabela 1. Morfologia comparada de espécies de Eimeriidae registradas em Columbiformes do mundo.

Coccidio	Hospedeiros	Localidade	Referência	Oocistos						Esporocistos									
				Forma	Comp. (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Parede	Resíduo	Micrópia	Grânulo polar	Forma	Comp. (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Corpo de Stieda	Corpo Substieda	Resíduo	
<i>Isospora gallicolumbae</i>	<i>Alopecoenas beccarii</i> (Salvadori, 1876)	Papua Nova Guinéa, Oceania	Varghese (1978)	elipsoidal	18–21 (20.0)	15–17 (16.0)	1.1–1.2 (1.2)	Lisa, ~0.8	ausente	ausente	ausente	presente, 1 ovóide, ~2.5	ovóide	10–13 (12.0)	7–9 (8.0)	1.6–2.0	presente, cônico	ausente	presente, compactado
<i>Isospora</i> sp. of Matsubara et al. (2017)	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Japão, Ásia	Matsubara et al. (2017)	subsférico a	24–27 (25.6)	23–26 (24.7)	1.0–1.1	Lisa	ausente	ausente	ausente	ovóide	18–21 (19.5)	10–12 (11.2)	1.6–2.0	presente, semelhante a mamilo	presente	presente, espalhado	
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896)	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Pinto (1928)	ovóide	17–21 (16.7)	16–18 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	Lisa	ausente	presente	presente	ovóide	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	presente, compactado	
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Nieschulz (1935)	Subsférico a elipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.07)	Lisa	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente	
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Mitra and Das Gupta (1937)	Subsférico a ovóide	19–21 (16.4)	17–20 (14.4)	1.0–1.1	Lisa	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	–	–	presente	
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Índia, Ásia	Ray (1952)	Riniforme a elipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	Lisa com dente lateral	ausente	present, assimétrico com capuz polae	–	amplamente ovóide	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	presente	
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Chatterjee and Ray (1969)	Subsférico	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	presente, anterior	presente, 1–2	ovóide	8–10	–	–	presente	–	presente, espalhado	

<i>Eimeria turturi</i>	<i>Streptopelia turtur</i>	Bulgária, Europa	Golemansky (1976)	elipsoidal ou amplamente ovóide	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	Lisa, ~1.5	ausênte	ausênte	ausênte	elipsoidal alongado	11–13 6–8	–	ausente	–	presente, espalhado	
Golemansky, 1976	(Linnaeus, 1758)																	
<i>Eimeria waiganiensis</i>	<i>Chalcophaps indica</i>	Papua Nova Guinéa, Oceania	Varghese (1978)	Amplamente ovóide	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	Lisa, ~1.5	ausênte	presente, 4–6 (5)	presente, 2–4	ovóide	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	presente, proeminete	presente, pequeno	presente, espalhado
Varghese, 1978	(Linnaeus, 1758);																	
	<i>Otidiphaps nobilis</i>																	
	(Gould, 1870)																	
<i>Eimeria duculai</i>	<i>Ducula spilorrhoea</i>	Papua Nova Guinéa, Oceania	Varghese (1980)	amplamente ovóide	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	Lisa, 1.5–2.5 (2.0)	ausênte	imperceptível	presente, 1, ~2.0	alongado	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	presente, proeminente, cônico	ausênte	presente, compactado, delimitado por membrana
Varghese, 1980	(Gray, 1858)																	
<i>Eimeria gourai</i>	<i>Goura victoria</i>	Papua Nova Guinéa, Oceania	Varghese (1980)	subsférico	19–22 (20)	18–21 (20)	(1.0)	Lisa, ~1.0	ausênte	Ausênte,	presente, 1, ~2.0	alongado	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	presente	ausênte	presente, compactado
Varghese, 1980	(Fraser, 1844)																	
<i>Eimeria palumbi</i>	<i>Zenaida galapagoensis</i>	Equador, Ilhas Galapágos, América do Sul	McQuiston (1991)	ovóide a elipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0–1.2 (1.16)	Lisa, ~2.0	presente, grânulos redondos a lascados	Ausênte,	ausênte	elipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	2.1 (1.9)	presente, semelhante a mamilo	ausênte	presente, espalhado
McQuiston, 1991	(Gould, 1841)																	
<i>Eimeria curvata</i>	<i>Columbina talpacoti</i>	Brasil, América do Sul	Adriano <i>et al.</i> (2000)	ovóide a elipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1–1.3 (1.2)	Lisa, ~1.3	ausênte	Ausênte,	presente	alongado	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0–2.2 (2.1)	presente, protuberante, semelhante a mamilo	ausênte	presente, compactado
Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	(Temminck, 1809);																	
	<i>Columbina squammata</i>																	
	(Lesson, 1831)																	
<i>Eimeria zenaidae</i>	<i>Zenaida auriculata</i>	Brasil, América do Sul	Adriano <i>et al.</i> (2003)	subsférico	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	(1.2)	Rude, ~1.7	ausênte	Ausênte,	presente, l	alongado	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7–1.9 (1.8)	presente, amplo	ausênte	presente, espalhado
Adriano,	(Murs, 1847)																	

Thyssen and Cordeiro, 2003															
<i>Eimeria janovyi</i>															
Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Bandyopadhyay et al. (2006)	elipsoidal	(24.3) (19.8) (1.2)	Lisa, ~1.1	Ausênte, Ausênte,	presente, 1, subsférico	piriforme	(12.1) (10.1) (1.2)	presente, amplo, proeminete	ausênte	presente, espalhado		
<i>Eimeria livialis</i>															
Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Arábia Saudita, Ásia	Alyousif et al. (2009)	elipsoidal alongado	19–23 (21) 14–17 (15) (1.2)	Lisa, 1–1.3 (1.2)	presente, grânulos irregulares	Ausênte,	ausênte elipsoidal	9–12 (10.6) 6–8 (6.7) (1.6)	presente, pequeno, semelhante a mamilo	ausênte	presente, espalhado		
<i>Eimeria columbapalumbipalumbus</i>															
Jamriška and Modrý, 2012	<i>Columba</i> (Linnaeus, 1758)	Repúblicas Theca e Eslováquia, Europa	Jamriška and Modrý (2012)	elipsoidal	17–24 (21.3) 15–18 (16.9) (1.26)	Lisa, 0.6–1.5 (0.9)	ausênte Ausênte,	presente, 2 irregular, ~2.0 ovóide ligeiramente assimétrico		11–16 (13.5) 6–7 (6.5) (1.9)	1.7–2.2 presente (1.9)	ausênte	present, scattered		
<i>Eimeria mauritiensis</i>															
Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Madagascar, Africa	Ball et al. (2012)	subsférico	18–22 (19.7) 16–19 (17.8) (1.1)	1.0–1.2 (1.1) Lisa, ~0.8	ausênte Ausênte,	ausênte –		8–14 (12.0) 6–7 (6.6) –	presente	presente	presente		
<i>Eimeria lyoni</i>															
Yabsley, Bailey and Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	EUA, América do Norte	Yabsley et al. (2015)	subférico a ovóide	23–26 (24.2) 20–22 (20.7) (1.2)	1.1–1.3 (1.2) Lisa, ~1.0	ausênte Ausênte,	presente, 1–2	ovóide	12–14 (12.4) 7–8 (7.3) (1.7)	1.5–1.9 tipo botão (1.7)	presente, arredondado	presente, grânulos of ~1.0		
<i>Eimeria sp. of</i>															
Yang et al. (2016)	<i>C. livia</i>	Austrália, Oceania	Yang et al. (2016)	subsférico	19–22 (20.2) 16–19 (16.1) (1.38)	Lisa, ~1.0	presente Ausênte,	presente	ovóide alongado	12–15 (13.0) 5–7 (6.1) (2.1)	2.0–2.2 presente (2.1)	ausênte	presente, compactado		
<i>Eimeria columbinae</i>															
Ortúzar-Ferreira and Berto n. sp.	<i>C. talpacoti</i>	Brasil, América do Sul	presente trabalho	subsférico a elipsoidal	13–16 (14.7) 12–14 (13.2) (1.11)	1.0–1.2 (1.1) Lisa, 1.0–1.2 (1.1)	presente, grânulos ligados e / ou difusos	Ausênte,	ausênte	elipsoidal a ligeiramente assimétrico	8–10 (9.0) 5–6 (5.1) (1.77)	1.6–2.0 forma de meia lua	presente, arredondado	presente, espalhado	

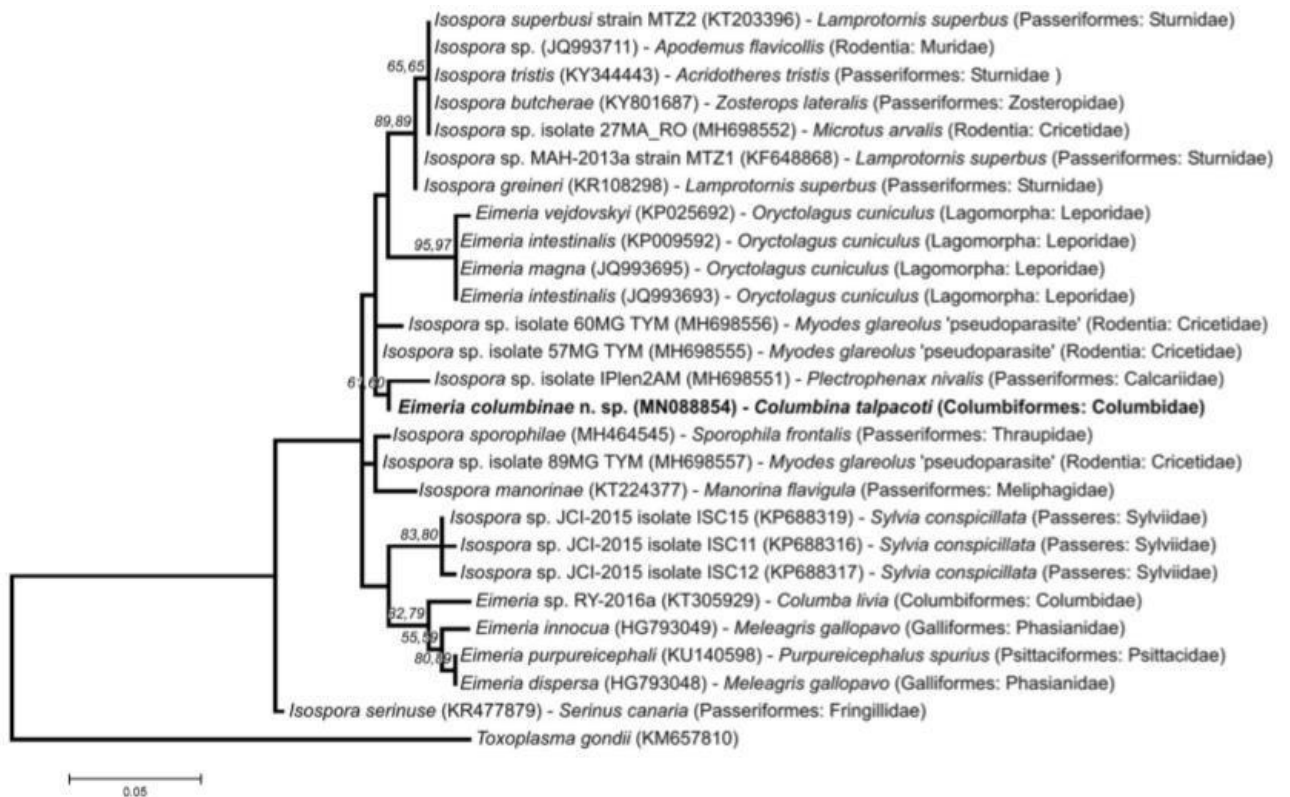


Figura 6. Arvore com probabilidade máxima estimada a partir das seqüências do gene COI de espécies Eimeriides. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%)

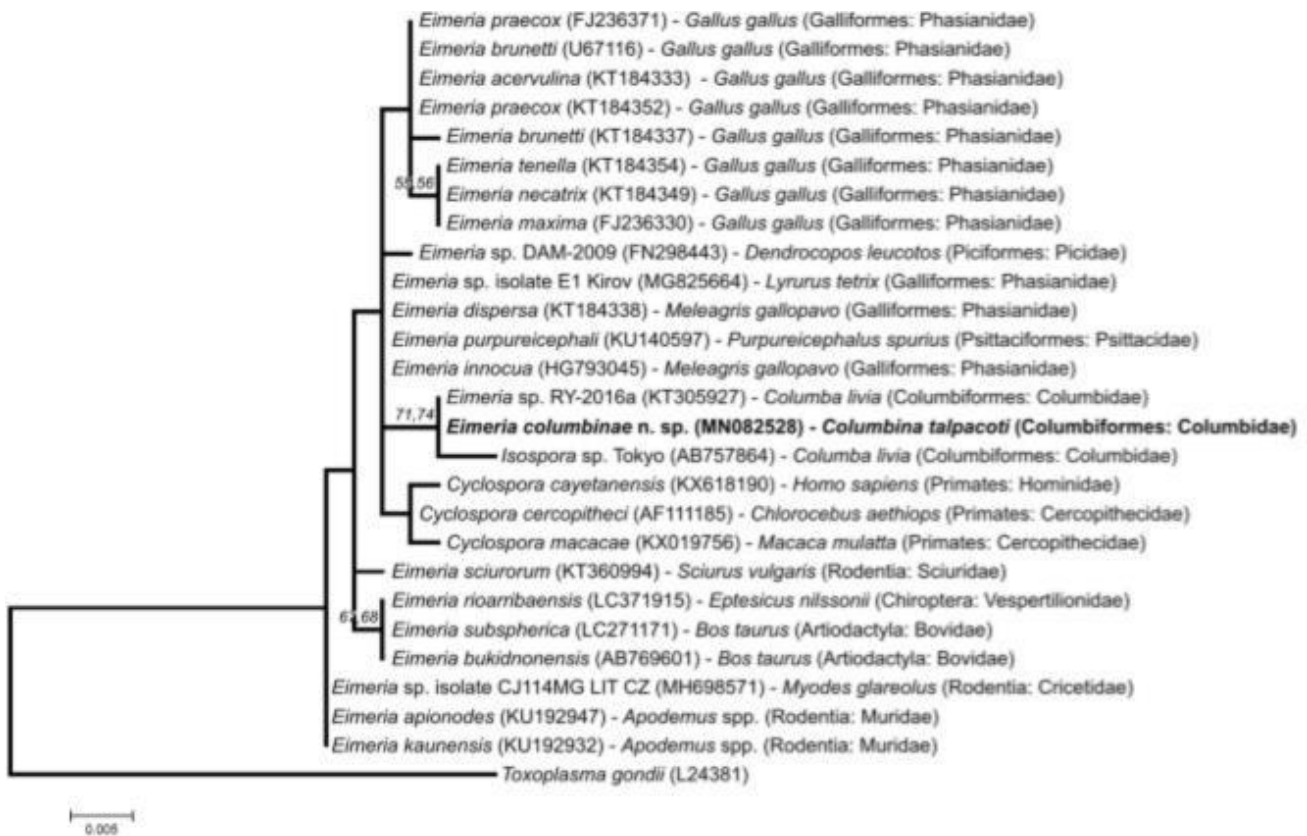


Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das seqüências do gene 18S de espécies Eimeriídes. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 réplicas (> 50%) para junção de vizinhos (NJ) e probabilidade máxima (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

CONCLUSÕES

A revisão taxonômica detalhada feita no trabalho atual de todas as *Eimeria spp.* descritas em Columbiformes do mundo, e suas comparações com *E. columbinaen.sp.* claramente apoiam sua designação como espécie única. Portanto, *E. columbinae* n. sp. é considerada nova para a ciência, sendo a 19ª descrição em um Columbiforme. Além disso, esse é a segunda espécie de *Eimeria* de Columbiformes submetidos à identificação molecular dos genes COI e 18S.

BIBLIOGRAFIA

- ADRIANO, EA, THYSSEN, PJ, CORDEIRO, NS. **A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil.** Acta Protozoologica, v. 42, p. 71–73, 2003.
- ALYOUSIF, SM, AL-SHAWA, RY, AL-ASIRI, SS. *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. **J. Egypt. Soc. Parasitol**, v. 39, p. 383-388, 2009. PMID: 19795745
- BALL, SJ, DASZAK, P, SWINNERTON, KR, JONES, CG, SNOW, KR. **A new species of *Eimeria* (Apicomplexa:Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Pre´vost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius.** African Zoology 47, 369–372, 2012.
- BANDYOPADHYAY, PK, BHAKTA, JN, SHUKLA, R, (2006) **A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves Columbidae).** Zoos' Print J. v. 21, p. 2386-2387, 2006.
- Bhatia et al. (1973)**
- BERTO, BP, FLAUSINO, W, MCINTOSH, D, TEIXEIRA-FILHO, WL, LOPES, CWG. **Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae).** Systematic Parasitology, v.80, p. 159–204,2011.
- BERTO, BP AND LOPES, CWG. **Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In: Ruiz L and Iglesias L (eds). *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease.* New York, NY: Nova Science Publishers, p. 47-66, 2013.**
- BERTO, BP, MCINTOSH, D, LOPES, CWG. **Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, p. 1-15,2014.
- DOLNIK OV, PALINAUSKAS, V, BENSCH, S. **Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence.** Journal of Parasitology, v. 95, p. 169-175, 2009.
- DUSZYNSKI, D AND WILBER, P. **A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae.** Journal of Parasitology, v. 83, p. 333-336, 1997.

DUSZYNSKI, DW, COUCH, L, UPTON, SJ. *The Coccidia of the World*, 2000. Retrieved from: <https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia> (accessed 12 Feb 2019).

GOLEMANSKY, V. **Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria.** Acta Protozool, v.15, p. 399-404, 1976.

GRULET, O, LANDAU, I, BACCAM, D. **Les *Isospora* du Moineau domestique; multiplicite des especes.** Annales de Parasitologie humaine et Comparee, v. 57, p. 209-235, 1982.

Hunt and O'Grady, 1976

ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys* **219**, 1-10., 2012.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2019.** Retrieved from: <http://www.iucnredlist.org> (accessed 29 May 2019).

JAMRIŠKA, J, MODRÝ, D. **A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae).** Acta Protozoologica, v.51, p. 329–333, 2012.

JIRKŮ M, MODRÝ D, ŠLAPETA JR, KOUDELA B, LUKEŠ J. **The phylogeny of *Goussia* and *Choleoecimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the evolution of excystation structures in coccidia.** Protist 153:379–390, 2002.

LABBÉ A. **Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur less coccidies.** Arch Zool Exp Gen 24:517–654, 1896.

MALHOTRA MN, RAY HN. **On a few coccidium, *Eimeria tropicalis* n. sp. from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*.** Proc 48th Indian Sci Cong 48:412, 1961.

MATSUBARA, R, FUKUDA Y, MURAKOSHI, F, NOMURA, O, SUZUKI, T, TADA, C, NAKAI, Y. **Detection and molecular status of *Isospora* sp. from the domestic pigeon (*Columba livia domestica*).** Parasitology international, v. 66, p. 588-592, 2017.

MCQUISTION, TE. ***Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida galapagoensis*).** Transactions of the American Microscopical Society, v.110, p. 178–181, 1991.

MITRA, AN, DAS-GUPTA, M. **On a species of *Eimeria* (Coccidia-Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*.** Proc. Ind. Sci. Cong. Assoc, v. 24, p. 291, 1937.

NIESCHULZ, O. **Ueber Kokziedien der Haustauben.** Zentralbl. Bakteriol. I Abt. Orig, v. 134, p.390-393, 1935.

ODUM, EP. **Ecologia.** Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1998.

OGEDENGBE, ME, QVARNSTROM, Y, DA SILVA, AJ, ARROWOOD, MJ., BARTA, JR. **A linear mitochondrial genome of *Cyclospora cayetanensis* (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina,**

Apicomplexa) suggests the ancestral start position within mitochondrial genomes of eimeriid coccidia. International Journal for Parasitology, v.45, p. 361-365, 2015.

OLIVEIRA, PSD, FERREIRA, MA, SILVA, LMD, RODRIGUES, MB, CARDOZO, SV AND BERTO, BP. **Diversity and distribution of coccidia of wild birds in an Atlantic forest fragment area in southeastern Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 26, p. 457-464, 2017.

PIACENTINI, VDO, ALEIXO, A, AGNE, CE, MAURÍCIO, GN, PACHECO, JF, BRAVO, GA, BRITO, GRR, NAKA, LN, OLMOS, F, POSSO, S, SILVEIRA, LF, BETINI, GS, CARRANO, E, FRANZ, I, LEES, AC, LIMA, LM, PIOLI, D, SCHUNCK, F, AMARAL, FR, BENCKE, GA, COHN-HAFT, M, FIGUEIREDO, LFA, STRAUBE, FC, CESARI, E. **Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee.** Revista Brasileira deOrnitologia, v. 23 (2), p. 91–298, 2015.

PINTO, C. **Synonymie de quelques especes du genre Eimeria (Eimeridia, Sporozoa).** Comptes Rendus de la Societe de Biologie, v. 98, p. 1564–1565, 1928.

RODRIGUES, MB, OLIVEIRA, JLG, SILVA-CARVALHO, LM, PASTURA, DGN, GOMES, JV, OLIVEIRA, MS, SIQUEIRA, PB, OLIVEIRA, AA, LIMA, VM, FERREIRA, I, BERTO, BP. **The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro & Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil.** Systematic Parasitology, v. 96, p. 423-431, 2019.

RAY, DK. **On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae* n. sp., from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon).** J. Parasitol. v. 38, p. 546-547, 1952.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro, RJ: Nova Fronteira, 1997.

SIGRIST, T. **Guia de Campo: Avifauna Brasileira. Avis Brasilis,** São Paulo, 608 pp, 2014.

TAMURA, K, DUDLEY, J, NEI, M, KUMAR, S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution, v.24, p. 1596-1599, 2007.

TENTER AM, BARTA JR, BEVERIDGE I, DUSZYNSKI, DW, MEHLHORN, H, MORRISON DA, ET AL. **The conceptual basis for a new classification of the coccidia.** Int J Parasitol, v. 32(5):p. 595-616, 2002.

TREFANCOVÁ, A, MÁCOVÁ, A, KVIČEROVÁ, J. **Isosporan Oocysts in the Faeces of Bank Voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): Real Parasites, or Pseudoparasites?** Protist, v.170, p. 104-120, 2019.

VARGHESE, T. ***Isospora gallicolumbae* sp. n. from Beccari's ground dove (*Gallicolumba beccarii* Salvadori) in Papua New Guinea.** Journal of protozoology, v. 25, p. 425-426, 1978a.

VARGHESE, T. ***Eimeria waiganiensis* sp. n. from the Greenwinged Ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea.** J. Parasitol. v. 64, p. 312-314, 1978b.

VARGHESE, T. **Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new**

species of *Eimeria*. Parasitology, v. 80, p. 183-187, 1980.

XAVIER, R, SANTOS, JL, VERISSIMO, A. **Phylogenetic evidence for an ancestral coevolution between a major clade of coccidian parasites and elasmobranch hosts**. Systematic parasitology, v. 95(4), p. 367-371, 2018.

WILLIAMS, RB, THEBO, P, MARSHALL, RN AND MARSHALL, JA. **Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA**. Systematic Parasitology, v. 76, p. 69-76, 2010.

YABSLEY, MJ, BAILEY, K, ADAMS, HC. **A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, *Zenaida macroura* (Columbiformes: Columbidae)** Comp.Parasitol, v. 82(2), p. 231–234, 2015.

YANG, R, BRICE, B, ELLOIT, A, RYAN, U. **Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia**. Experimental Parasitology, v.166, p.124-130, 2016.

YANG, R, BRICE, B, ELLIOT, A, RYAN, U. ***Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia**. Experimental Parasitology, v.159, p. 59-66, 2015.

CAPÍTULO III

Nova espécie de *Eimeria* de juritis

Eimeria ferreirai n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp.
(Columbiformes: Columbidae) from Brazil

Resumo

As pombas constituem um grupo taxonômico (Columbiformes: Columbidae) de aves granívoras e frugívoras com distribuição mundial. O presente trabalho tem o objetivo descrever morfológica e molecularmente um novo protozoário de Juriti-pupu, *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855, e Juriti-gemeadeira, *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) no sudeste do Brasil. *Eimeria ferreirai* n. sp. possui oocistos subsféricos a elipsóides, $21,4 \times 18,8 \mu\text{m}$, com parede lisa e bicamada, com aproximadamente $1,6 \mu\text{m}$ de espessura. Presença de micrópila, res duo de oocisto ausente, mas um a dois grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são alongados de forma ovalada a bumerangue, $13,4 \times 6,9 \mu\text{m}$. corpo Stieda triangular a losango. O res duo de esporocisto é composto por grânulos de diferentes tamanhos. Os esporozoítos são vermiformes com corpo refrátil e núcleo. O sequenciamento do gene da subunidade 1 do citocromo c oxidase 1 mitocondrial (COI) e as comparações moleculares filogenéticas subsequentes apoiaram a descrição da nova espécie, uma vez que a semelhança máxima foi de 90 a 95% com as espécies Eimeriidae de Columbiformes, Anseriformes, Galliformes e Passeriformes. Assim, esta é a primeira espécie de coccídio relatada em *Leptotila spp.* e a vigésima descrição de um *Eimeria. sp* em Columbiformes no mundo.

Palavras-chave: Taxonomia, morfologia, coccídios, Eimeria, oocistos, Columbiformes, Columbidae, Parque Nacional do Itatiaia, Parque Nacional Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil.

Abstract

The doves and pigeons constitute a taxonomic group (Columbiformes: Columbidae) of granivorous and frugivorous birds with a worldwide distribution. The current work aimed describes morphologically and molecularly a new protozoan from white-tipped doves *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 and grey-fronted doves *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) in Southeastern Brazil. *Eimeria ferreirai* n. sp. has oocysts that are sub-spherical to ellipsoidal, $21.4 \times 18.8 \mu\text{m}$, with smooth, bilayered wall, $\sim 1.6 \mu\text{m}$ thick. Micropyle present. Oocyst residuum absent, but one to two polar granules are present. Sporocysts are elongate ovoidal to boomerang-shaped, $13.4 \times 6.9 \mu\text{m}$. Stieda body triangular to lozengal. Sporocyst residuum is composed of granules of different sizes. Sporozoites are vermiform with refractile body and nucleous. Sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene and the subsequent phylogenetic molecular comparisons supported the description of the new species, since the maximum similarity was 90-95% with eimeriid species of Columbiformes, Anseriformes, Galliformes and Passeriformes. Thus, this is the first coccidian species reported from *Leptotila spp.* and the twentieth description of an eimerian from Columbiformes in the World.

Key words: Taxonomy, morphology, coccidia, *Eimeria*, oocysts, Columbiformes, Columbidae, Itatiaia National Park, Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro, Brazil.

INTRODUÇÃO

A família Columbidae (Columbiformes) reúne 367 espécies de pombas, com distribuição mundial. Estima-se que nas regiões neotropicais existam cerca de 68 espécies, das quais 23 foram registradas no Brasil (BENNETT & PEIRCE 1990; IUCN 2019).

As pombas Juriti-pupu *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 e as pombas Juriti-gemeadeira *Leptotila rufaxilla* (RICHARD & BERNARD, 1792) são encontradas em áreas arborizadas, frequentando o solo para alimentar; vivem sozinho ou em pares (SICK 1997). Esse comportamento e hábitos alimentares como granívoros e frugívoros favorecem a transmissão fecal-oral de parasitas intestinais, como protozoários do tipo coccídios (DOLNIK et al., 2010; BERTO & LOPES 2013).

Estudos parasitológicos em Columbidae registraram 19 espécies de *Eimeria* e duas espécies de *Isospora* usando a taxonomia morfológica tradicional, embora recentemente alguns desses coccídios tenham sido identificados molecularmente por sequências de genes específicos, como o gene da subunidade 1 do citocromo mitocondrial c oxidase 1 (COI) e o gene do RNA ribossômico da subunidade 18S pequena (18S) (ORTUZAR-FERREIRA et al., 2019).

Neste contexto, o presente estudo descreve uma nova espécie de *Eimeria* de Juriti-pupu *L. verreauxi* e Juriti-gemeadeira *L. rufaxilla* por métodos morfológicos e moleculares. Esses espécimes de aves foram capturados no Parque Nacional do Itatiaia, no Parque Nacional Serra dos Órgãos e em uma área em reflorestamento no Município de Pinheiral, sudeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

No total, foram realizadas quatro expedições em três localidades diferentes no sudeste do Brasil: (1) Parque Nacional do Itatiaia (22° 27'40 "S, 44 ° 35'31" W), uma área protegida localizada na Serra da Mantiqueira, na fronteira dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO 2018a); (2) uma área fragmentada da Mata Atlântica no município de Guapimirim (22° 31'10 "S, 43° 00'36" W), localizada na área de borda do Parque Nacional Serra dos Órgãos, outra área protegida localizada na serra costeira (Serra do Mar) do Estado do Rio de Janeiro (ICMBIO 2018b); e (3) uma área de Mata Atlântica em reflorestamento no campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, no município de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro (22° 31'37"S, 43° 59'45 " W). Um total de nove exemplares de *L. verreauxi* (um do Parque Nacional Itatiaia, seis do Parque Nacional Serra dos Órgãos e dois do Pinheiral) e um exemplar de *L. rufaxilla* (de Pinheiral) foram capturados com redes de neblina.



Figura 1: Representante das aves hospedeiras Juriti-pupu *L. verreauxi* (A) e Juriti-gemeadeira *L. rufaxilla* (B).

RESULTADOS

Uma Juriti-pupu *L. verreauxi* do Parque Nacional Itatiaia, cinco das seis *L. verreauxi* do Parque Nacional Serra dos Órgãos, uma das duas *L. verreauxi* de Pinheiral e a única Juriti-gemeadeira *L. rufaxilla* de Pinheiral foram positivas para *Eimeria sp.* não registrada na literatura científica.

Eimeria ferreirai Oliveira e Berto n. sp.

Hospedeiro tipo: Juriti-pupu *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 (Aves: Columbiformes: Columbidae). Outro hospedeiro: Juriti-gemeadeira *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) (Aves: Columbiformes: Columbidae).

Tipo localidade: Parque Nacional do Itatiaia (22° 27'40 "S, 44° 35'31" W), Sudeste do Brasil. Outras localidades: Parque Nacional Serra dos Órgãos (22° 31'10 "S, 43° 00'36" W) e Pinheiral (22° 31'37"S, 43° 59'45"W), também do sudeste Brasil.

Material-tipo: fotosintipos, desenhos e oocistos recuperados de *L. verreauxi* em solução de K₂Cr₂O₇ a 2,5% (WILLIAMS et al., 2010) são depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número de acesso MZURPTZ2019016. As fotomicrografias também são depositadas e disponibilizadas (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, na UFRRJ, sob o número de repositório P-99/2019. As fotografias da amostra do tipo hospedeiro (simbiotipo) são depositadas na mesma coleção. Sequência de DNA representativa: Uma sequência representativa de COI foi depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso MN326301.

Registro do ZooBank: Para cumprir os regulamentos estabelecidos no artigo 8.5 da versão alterada de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 2012), os detalhes das novas espécies foram enviados ao ZooBank.

Esporulação exógena: Oocistos recuperados nas fezes, sem esporulação, e foram esporulados completamente ao final de sete dias após a coleta, em solução de K₂Cr₂O₇ à temperatura ambiente (20–25 °C).

Etimologia: O nome específico é derivado do sobrenome do ornitólogo brasileiro Dr. Ildemar Ferreira, dado em sua homenagem por sua contribuição ao estudo da ecologia e parasitologia de aves.

Descrição: Oocistos encontrados (n = 22) subsférico a elipsoidal, 19-25 × 16-21 (21,4 × 18,8); razão comprimento / largura (L / W) 1,0-1,4 (1,15). Parede com duas camadas, delicada, espessura de 1,3-1,9 (1,6), camada externa lisa, c.2 / 3 da espessura total. Presença de micrôpila, mas quase imperceptível em alguns oocistos, com 3,0-4,0 (3,5) de largura. Um delicado capuz polar foi observado em poucos oocistos. Resíduo de oocisto ausente, mas 1 ou 2 grânulos polares arredondados estão presentes. Esporocisto alongado ovoidal a forma de bumerangue, 12-15 × 6-8 (13,4 × 6,9); Razão L / W 1,8-2,2 (1,95). Corpo de Stieda presente, triangular a losango, 1,0 alta × 1,5 de largura. Corpos de Sub-Stieda e Para-Stieda ausentes. Resíduo de esporocisto presente, constituído por grânulos de diferentes tamanhos. Esporozóitos vermiformes, com corpo refratário posterior e núcleo central.

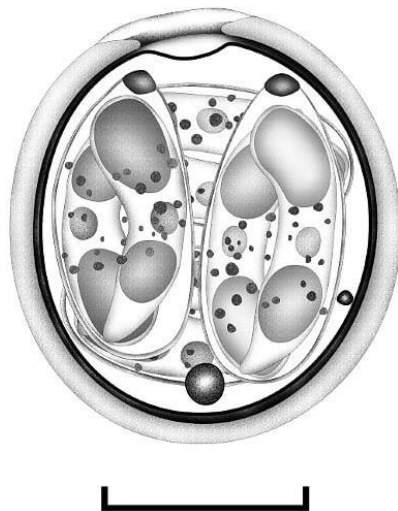


Figura 2. Desenho do oocisto esporulado de *Eimeria ferreirai* n. sp., uma nova espécie de coccídio recuperada de pombas *Leptotila* spp. Barra de escala: 10µm.

Eimeria ferreirai é diferente de outras espécies de coccídios em Columbidae em alguns aspectos (Tabela 1). De fato, existem poucas características, muitas vezes pouco detalhadas, que diferenciam algumas *Eimeria* spp. de Columbiformes (ORTUZAR-FERREIRA *et al.*, 2019), como *Eimeria labbeana* (Labbe, 1896) Pinto, 1928, *Eimeria columbarum* Nieschulz, 1935, *Eimeria columbae* Mitra & Das Gupta, 1937, *Eimeria curvata* Adriano, Thyssen & Cordeiro, 2000, *Eimeria janovyi* Bandyopadhyay, Bhakta & Shukla, 2006, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška & Modrý, 2012 e *Eimeria* sp. de Yang *et al.* (2016), que são muito semelhantes morfológicamente e morfometricamente e têm compatibilidade ecológica. A presença de micrópila e capuz polar diferencia *E. ferreirai* de todas as outras espécies de *Eimeria*, no entanto, a não observação dessa característica aproxima *E. ferreirai* de *Eimeria* sp. de Yang *et al.* (2016). Nesse sentido, foi realizado o sequenciamento do gene COI para complementar a identificação de *E. ferreirai* e diferenciá-lo da espécie de *Eimeria* de Yang *et al.* (2016), que também foi identificado molecularmente pelo gene COI.

A amplificação do DNA dos oocistos de *E. ferreirai* recuperados de um exemplar de *L. verreauxi* do Parque Nacional do Itatiaia mostrou uma faixa clara de ~ 250 pb. A análise filogenética incluiu 20 sequências para espécies de Eimeriidae disponíveis no GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) foi usado como grupo externo. *Eimeria ferreirai* teve a máxima similaridade de apenas 94,9% com *Eimeria purpureicephali* Yang, Brice & Ryan (2016) (KU140598), que é um coccídio de papagaios de cabeça vermelha *Purpureicephalus spurius* (Kuhl, 1820) (YANG *et al.*, 2016). Assim, *E. ferreirai* ficou isolado no cladograma, entre os clados com *Eimeria* spp. de Psittaciformes e Galliformes, além de uma *Eimeria* sp. de camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (MH777502), que deve ser um pseudoparasito (TREFANCOVÁ *et al.*,

2019). Semelhança com outras *Eimeria spp.* de Columbiformes foi baixo, de 93,5% com *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) (KT305929), de 90,9% com *Eimeria columbinae* Ortúzar-Ferreira e Berto, 2019 (MN082528) (Ortizzar-Ferreira et al. 2019) e 93,5% com *Eimeria sp.* de pombos (MF496271) depositados no GenBank, mas ainda não publicados.

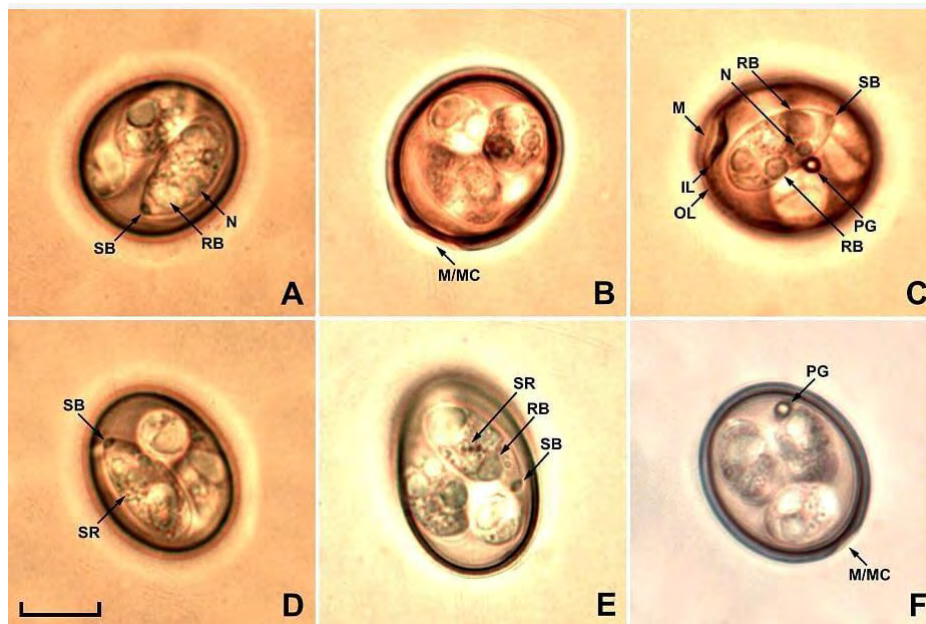


Figura 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria ferreirai n. sp.*, uma nova espécie de coccídio recuperada de *Leptotila spp.* Observe a camada interna (IL) e externa (OL) da parede do oocisto, micrópila (M), capuz polar (MC), núcleo (N), grânulo polar (PG), corpo refrátil (RB), corpo de Stieda (SB) e o resíduo de esporocisto (SR). Barra de escala: 10 μ .

DISCUSSÃO

Os Columbiformes reúnem 23 espécies, no Brasil, distribuídas em todos os biomas brasileiros, como Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pampas (IUCN 2019). São granívoros e frugívoros, comendo principalmente sementes e pequenos frutos no solo (SICK, 1997). Essa ampla distribuição e diversidade, além dos hábitos alimentares que favorecem a transmissão e dispersão dos coccídios, são incompatíveis com as três espécies de coccídios descritas até o momento (DOLNIK et al., 2010; BERTO & LOPES, 2013). Nesse sentido, a continuidade e regularidade dos trabalhos taxonômicos que pesquisam a diversidade de *Eimeria spp.* no Brasil poderia potencialmente revelar novas espécies.

Algumas variações morfológicas foram observadas nos oocistos de *E. ferreirai*: a micrópila era quase imperceptível em alguns oocistos, enquanto em outros oocistos era proeminente e facilmente observado; O capuz polar foi observado como uma cobertura fina e delicada em apenas dois oocistos; e os esporocistos foram observados em forma de bumerangue ou ovoide alongado, mesmo dentro do

mesmo oocisto. Todas essas variações não seguiram um padrão nos oocistos e amostras para serem identificados como espécies diferentes; portanto, essas variações são consideradas intraespecíficas.

Entre as espécies de *Eimeria* de Columbiformes que foram sequenciados pelo gene COI, *Eimeria sp.* de Yang et al. (2016) é o único que compartilha características morfológicas e morfométricas próximas a *E. ferreirai* (Tabela 1); no entanto, esses coccídios eram genotipicamente diferentes e filogeneticamente distantes (Fig. 4). *Eimeria ferreirai* estava mais próxima de *Eimeria spp.* de Galiformes e Psittaciformes do que a *Eimeria spp.* de Columbiformes; portanto, esses resultados reforçam as observações de Ortúzar-Ferreira et al. (2019), que *Eimeria spp.* dos Columbiformes não formam um grupo monofilético, pelo menos não pelo gene COI.

Finalmente, a comparação de *E. ferreirai* com *Eimeria spp.* registrada em aves Columbiformes do mundo (Tabela 1) apoia a designação como uma espécie única. Portanto, *E. ferreirai* é considerado nova na ciência, sendo a vigésima descrição de Columbiformes.

Tabela 1. Morfologia comparada de *Eimeria* spp. recuperados de Columbiformes do mundo.

Coccídeo	Hospedeiros	Localidade	Referência	Oocistos					Esporocistos									
				Forma	comp largura (µm)	Largura (µm)	C/L razão	parede	Resíduo	Micrôpila	Grânulo polar	Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Corpo Stieda	Corpo Substieda	Resíduo
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896)	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Pinto (1928)	subsférico a ovóide	17–21	16–18	1.0–1.1	Lisa	ausente	presente	presente	ovóide	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4) –	–	–	presente, compactado
			Pinto, 1928	subsférico a elipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	Lisa	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Nieschulz (1935)	subsférico a ovóide	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	Lisa	ausente	ausente	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausente	presente
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Mitra and Das Gupta (1937)	subsférico a ovóide	16.4 (14.4)	–	–	–	presente	ausente	–	elipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	presente
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Índia, Ásia	Ray (1952)	riniforme a elipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	Lisa com dente na lateral	ausente	presente, assimétrica com capuz polar	–	amplamente ovóide	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	presente
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Chatterjee and Ray (1969)	subsférico	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	presente, anterior	presente, 1–2	ovóide	8–10	–	–	presente	–	presente, espalhado
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i>	Bulgária, Europa	Golemansky (1976)	elipsoidal ou	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	Lisa, ~1.5	ausente	ausente	ausente	elipsoidal alongado	11–13	6–8	–	ausente	–	presente, espalhado

	(Linnaeus, 1758)			amplament e ovóide														
	<i>Chalcophaps indica</i>																	
<i>Eimeria waiganiensis</i>	(Linnaeus, 1758); Varghese, 1978	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese (1978)	amplament e ovóide	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	Lisa ~1.5	ausênte	presente, 4–6 (5)	presente, 2–4	ovóide	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	presente, proeminente	presen, pequeno	presente, espalhado
	<i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)																	presente, compactado, delimitado por membrana
<i>Eimeria duculai</i>	<i>Ducula spilorrhhoa</i> (Gray, 1858)	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese (1980)	amplament e ovóide	26–31 (28)	23–27 (25)	1.1–1.5 (2.0)	Lisa, 2.5 (2.0)	ausênte	imperceptível	presente, 1, ~2.0	alongado	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	presente, proeminente, e, cônico	ausênte	presente, compactado, delimitado por membrana
<i>Eimeria gourai</i>	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese (1980)	subsférico	19–22 (20)	18–21 (20)	1.0–1.0	Lisa, ~1.0	ausênte	ausênte	presente, 1, ~2.0	alongado	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	presente	ausente	presente espalhado
<i>Eimeria palumbi</i>	<i>Zenaida galapagoensis</i> (Gould, 1841)	Equador, Ilhas Galápagos, América do sul	McQuiston (1991)	ovóide a elipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0–1.2 (1.16)	Lisa, ~2.0	presente, grânulos redondos e lascados	ausênte	ausênte	elipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	1.8–2.1 (1.9)	presente, semelhante a mamilo	ausênte	presente espalhado
<i>Eimeria curvata</i>	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); Thysen and Cordeiro, 2000	Brasil, América do sul	Adriano et al. (2000)	ovóide a elipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1–1.3 (1.2)	Lisa, ~1.3	ausênte	ausênte	presente	alongado	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0–2.2 (2.1)	present, protuberânt e, semelhante a mamilo	ausênte	presente compactado
<i>Eimeria zenaidae</i>	<i>Zenaida auriculata</i> (Lesson, 1831)	Brasil, América do sul	Adriano et al. (2003)	subsfé	22–26	19–22 (20.3)	1.2–1.7	Rude, ~1.7	ausente	ausênte	presente, 1	alongado	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7–1.9 (1.8)	presente, amplo	ausênte	presente, espalhado

Thyssen and Cordeiro, 2003	(Des Murs, 1847)			(23.8)															
<i>Eimeria janovyi</i>																			
Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Bandyopadhyay et al. (2006)	elipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	Lisa, ~1.1	ausente	ausente	presente, 1, subsférico	piriforme (12.1)	(10.1)	(1.2)	presente, amplo, proeminente	ausente	presente, espalhado		
<i>Eimeria livialis</i>																			
Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Arábia Saudita, Ásia	Alyousif et al. (2009)	elipsoidal alongado	19–23 (21)	14–17 (15)	(1.2)	Lisa, 1–1.3 (1.2)	presente, Grânulos irregulares	ausente	ausente	elipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	presente, pequeno, semelhante a mamilo	ausente	presente, espalhado	
<i>Eimeria columba columbapalumbus bi</i> Jamriška and Modrý, 2012																			
Modrý, 2012	(Linnaeus, 1758)	República Tcheca e Eslováquia, Europa	Jamriška and Modrý (2012)	elipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.4 (1.26)	0.6–1.5 (0.9)	Lisa, 0.6–1.5 (0.9)	ausente	absent	presente, 2 irregular, ~2.0	ovóide alongado, ligeiramente	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7–2.2 (1.9)	presente	ausente	presente, espalhado
<i>Eimeria mauritiensis</i>																			
Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i>	Madagascar, África	Ball et al. (2012)	subsférico	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0–1.2 (1.1)	Lisa, ~0.8 (1.1)	ausente	ausente	ausente	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	presente	presente	presente	
<i>Eimeria lyoni</i>																			
Yabsley, Bailey and Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i>	EUA, América do Norte	Yabsley et al. (2015)	subsférico a ovóide	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1–1.3 (1.2)	Lisa, ~1.0 (1.2)	ausente	ausente	presente, 1–2	ovóide	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5–1.9 (1.7)	presente, tipo botão	presente, arredondado	presente, espalhado, grânulos of ~1.0	
<i>Eimeria sp. of</i>																			
Yang et al. (2016)	<i>C. livia</i>	Austrália, Oceania	Yang et al. (2016)	subsférico	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	Lisa, ~1.0 (1.2)	presente	ausente	presente	ovóide alongado	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0–2.2 (2.1)	presente	ausente	presente, compactado	
<i>Eimeria columbinae</i>																			
Ortúzar-	<i>C. talpacoti</i>	Brasil, América do sul	Ortúzar-Ferreira et al. (2019)	Subsférico a elipsoidal	13–16 (13.2)	12–14 (12)	1.0–1.2 (1.0)	Lisa, 1.0–1.0	presente, grânulos ligados	imperceptível	ausente	elipsoidal a ligeiramente	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6–2.0 (1.8)	presente, achatado	presente, arredondado	presente, espalhado	

Ferreira and Berto, 2019				(14.7)	(1.11)	1.2 (1.1)	e/ou difusos		e assimétrico	(1.77 em forma de meia lua			
	<i>Leptotila verreauxi</i>												
<i>Eimeria ferreirai</i>	Bonaparte, 1855;	Brasil, América do sul	Presente trabalho	Subsférico a	19-25	1.0-1.4	Lisa, 1.3-	ausente	presente, com capuz polar quase imperceptível	ovóide alongado em forma de bumerangue	1.8-2.2 presente, triangular a losango	ausente	presente, espalhado
Oliveira and Berto n. sp.	<i>Leptotila rufaxilla</i>			elipsoidal	(21.4)	(18.8)	(1.15)	1.9 (1.6)	1-2	12-15 (13.4)	6-8 (6.9)	(1.95)	
	(Richard & Bernard, 1792)												

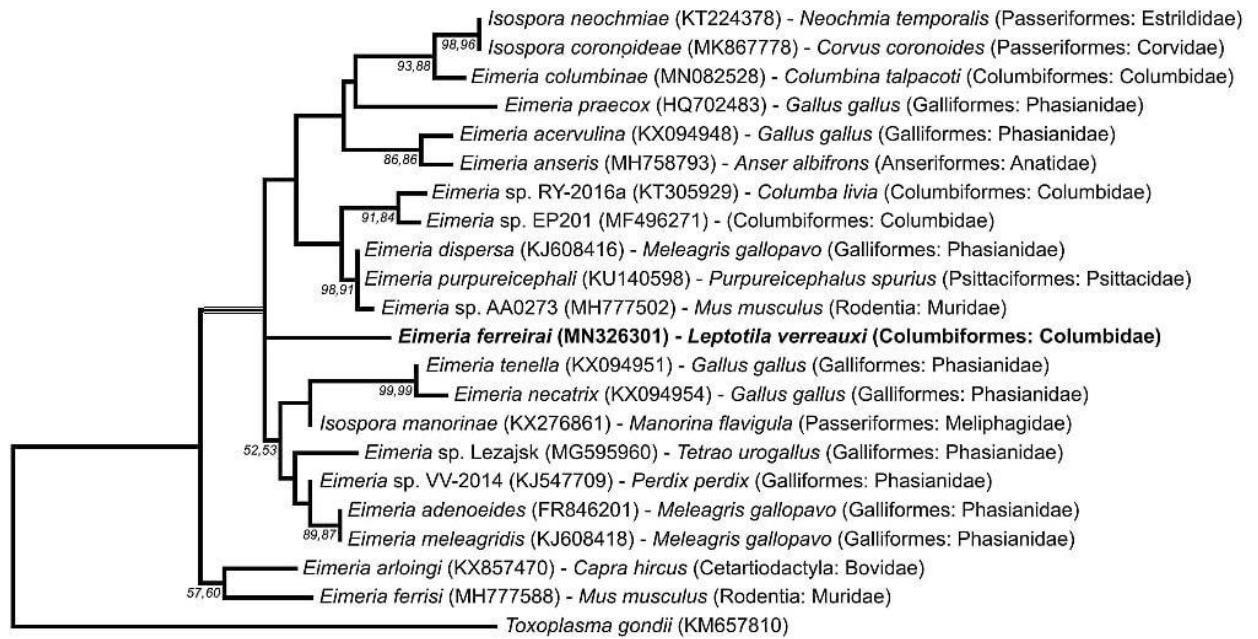


Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das seqüências do gene COI de espécies Eimeriíde. Os números representam o suporte de autoinicialização 1000 repetições (> 50%) para Vizinhança (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. Barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

BIBLIOGRAFIA

- ADRIANO, E.A., THYSSEN, P.J. & CORDEIRO, N.S. *Eimeria curvata n. sp.* (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95 (1), p. 53–55, 2000.
- ADRIANO, E.A., THYSSEN, P.J. & CORDEIRO, N.S. A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. Acta Protozoologica, v. 42 (1), p. 71–73, 2003.
- ALYOUSIF, S.M., AL-SHAWA, R.Y. & AL-ASIRI, S.S. *Eimeria livialis sp. n.* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, v. 39 (2), p. 383–388, 2009.
- BALL, S.J., DASZAK, P., SWINNERTON, K.R., JONES, C.G. & SNOW, K.R. A new species of *Eimeria* (Apicomplexa:Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri*

- (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. *African Zoology*, v. 47 (2), p. 369–372, 2012.
- BANDYOPADHYAY, P. K., BHAKTA, J. N. & SHUKLA R. A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). *Zoos' Print Journal*, v. 21 (9), p. 2386–2387, 2006.
- BENNETT, G.F. & PEIRCE, M.A. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). *Journal of Natural History*, v. 24 (2), p. 311–325, 1990.
- BERTO, B.P. & LOPES, C.W.G. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: Ruiz, L. & Iglesias, F. (Eds.), *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, p. 47–66, 2013.
- BERTO, B.P., MCINTOSH, D. & LOPES, C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23 (1), p. 1–15, 2014.
- CHATTERJEE, D.K. & RAY, H.N. On *Eimeria kapotei* n. sp., from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. *Proceedings of the 56th Indian Science Congress*, v. 56, p. 512, 1969.
- DOLNIK, O.V., PALINAUSKAS, V. & BENSCH S. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, v. 95, p.169-174, 2009.
- DOLNIK, O.V., DOLNIK, V.R. & BAIRLEIN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, v. 98 (1), p. 97– 103, 2010.
- DUSZYNSKI, D.W. & WILBER, P. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, v. 83 (2), p. 333–336, 1997.
- GOLEMANSKY, V. Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. *Acta Protozoologica*, v.15 (4), p. 399–404, 1976.
- ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia, 2018^a. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia> (accessed 21 Aug 2019).
- ICMBIO. Parque Nacional Serra dos Órgãos, 2018^b. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos> (accessed 21 Aug 2019).
- ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys*, v. 219, p. 1–10, 2012.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2019. Available from: <http://www.iucnredlist.org> (accessed 21 Aug 2019).
- JAMRIŠKA, J. & MODRÝ, D. A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae) *Acta Protozoologica*, v. 51 (4), p. 329–333, 2012.
- MCQUISTION, T.E. *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida galapagoensis*). *Transactions of the American Microscopical Society*, v. 110 (2), p. 78–181, 1991.
- MITRA, A.N. & DAS-GUPTA, M. On a species of *Eimeria* (Coccidia-Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. *Proceedings of the 24th Indian Science Congress Association*, v. 24, p. 291, 1937.
- NIESCHULZ, O. Ueber Kokzidien der Haustauben. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitologie, Infektionskrankheiten, und Hygiene*, v.134, p.390–393, 1935.
- ORTÚZAR-FERREIRA, C.N., OLIVEIRA, M.S., GENOVEZ-OLIVEIRA, J. L., FRANCO, H.A., THODE-FILHO, S., OLIVEIRA, A.A., LIMA, V.M., FERREIRA, I. & BERTO. B.P. Coccidia of

- Columbiformes of the World: A taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil.** Parasitology Research, 2019.
- PINTO, C. **Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa).** Comptes Rendus de la Societe de Biologie, v. 98, p. 1564–1565, 1928.
- RAY, D.K. **On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae* n. sp., from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon).** Journal of Parasitology, v.38 (6), p. 546–547, 1952.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp, 1997.
- SIGRIST, T. **Guia de Campo: Avifauna Brasileira. Avis Brasilis,** São Paulo, 608 pp, 2014. TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution, v.24 (8), p.1596–1599,2007.
- TREFANCOVÁ, A., MÁCOVÁ, A. & KVIČEROVÁ, J. **Isosporan Oocysts in the Faeces of Bank Voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): Real Parasites, or Pseudoparasites?.** Protist v.170 (1), p. 104–120, 2019.
- VARGHESE, T. ***Eimeria waiganiensis* sp. n. from the Greenwinged Ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea.** Journal of Parasitology, v.64 (2), p. 312–314, 1978.
- VARGHESE, T. **Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*.** Parasitology, v. 80, p. 183-187, 1980.
- WILLIAMS, R.B., THEBO, P., MARSHALL, R.N. & MARSHALL, J.A. **Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA.** Systematic Parasitology, v. 76 (1), p. 69–76, 2010.
- YABSLEY, M.J., BAILEY, K. & ADAMS, H.C. **A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, *Zenaida macroura* (Columbiformes: Columbidae).** Comparative Parasitology, v. 82 (2), p. 231–234, 2015.
- YANG, R., BRICE, B., ELLIOT, A. & RYAN, U. ***Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia.** Experimental Parasitology, v.159, p. 59–66, 2015.
- Yang, R, Brice, B, Elloit, A and Ryan, U. **Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia* domestica, Gmelin, 1789) in Australia.** Experimental Parasitology, v. 166, p. 124–130, 2016.
- YANG, R, BRICE, B, ELLOIT, A AND RYAN, U. **Morphological and molecular characterization of *Eimeria purpureicephali* n. sp. (Apicomplexa:Eimeriidae) in a red-capped parrot (*Purpureicephalus spurius*, Kuhl, 1820) in Western Australia.** International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 5 (1), p. 34–39, 2016.

CAPÍTULO IV

Redescrição de *Isospora striata* de arapaçus

Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuistion et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America.

Resumo

Arapaços são passeriformes da família Dendrocolaptidae, que possuem uma alta dependência florestal. O presente trabalho teve como objetivo redescrever *Isospora striata* McQuiston et al. 1997, de dois novos hospedeiros em áreas protegidas no Brasil, revelando novas localidades de parasitismo, além de fornecer identificações genotípicas preliminares via sequenciamento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) de ambas as espécies hospedeiras. *Isospora striata* possui oocistos que são subesferoidais a ovais, $19,4 \times 16,8 \mu\text{m}$ com parede lisa. O resíduo de oocisto está ausente, mas micrópila e grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são ovóides, $13,6 \times 8,3 \mu\text{m}$, com corpos de Stieda e sub-Stieda. Resíduo de esporocisto está presente e esporozoítos com corpo refrátil, núcleo e estriações. O estudo morfológico e a similaridade de 100% no sequenciamento do gene COI entre amostras de diferentes espécies de Dendrocolaptidae confirmaram a identificação de uma única espécie, apoiando a identificação de *I. striata* na Mata Atlântica brasileira e consequentemente a ampla distribuição desta espécie coccidiana em Região Neotropical.

Palavras-chave: Taxonomia, Morfologia, Sequenciamento, Coccidia, Oocistos, Passeriformes, Parque Nacional do Itatiaia, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Brasil.

Abstract

Woodcreepers are passerines of the family Dendrocolaptidae, which have a high forest dependency. The current work aimed to redescribe *Isospora striata* McQuiston et al. 1997, from two new hosts in protected areas in Brazil, revealing new localities of parasitism, in addition to providing preliminary genotypic identifications via sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene from both host species. *Isospora striata* has oocysts that are subspheroidal to ovoidal, $19.4 \times 16.8 \mu\text{m}$ with smooth wall. Oocyst residuum is absent, but micropyle and polar granules are present. Sporocysts are ovoidal, $13.6 \times 8.3 \mu\text{m}$, with both Stieda and sub-Stieda bodies. Sporocyst residuum is present and sporozoites with refractile body, nucleus, and striations. The morphological study and the 100% similarity in sequencing of the COI gene between samples of different dendrocolaptid species confirmed the identification of a single species, supporting the identification of *I. striata* in the Brazilian Atlantic forest and consequently the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical Region.

Keywords Taxonomy · Morphology · Sequencing · Coccidia · Oocysts · Passeriformes · Parque Nacional do Itatiaia · Parque Nacional da Serra dos Órgãos · Brazil

INTRODUÇÃO

Os arapaçus são Passeriformes da família Dendrocolaptidae, que reúnem 52 espécies distribuídas predominantemente em ambientes florestais na Região Neotropical (Marantz et al. 2003). A dependência de ambientes florestais faz com que as espécies sofram declínio populacional e até extinção local em florestas alteradas e em fragmentos florestais (Marantz et al. 2003; IUCN 2020). Na Mata Atlântica do Sudeste e Sul do Brasil, diversos estudos confirmam essa vulnerabilidade dos arborícolas às mudanças antrópicas, notadamente a fragmentação florestal (Aleixo e Vielliard 1995; Christiansen e Pitter 1997; Bornschein e Reinert 2000).

Essas aves alimentam-se predominantemente de insetos grandes, pequenos vertebrados, caramujos e ovos de pássaros que nidificam nas cavidades das árvores. Eles também seguem regularmente bandos mistos e formigas de correição, forrageando em todos os estratos como espécies dominantes (Sick 1997; Piacentini et al. 2015). Esse hábito alimentar predominantemente insetívoro reduz potencialmente essas aves a transmissão fecal-oral de parasitos, ao contrário das aves frugívoras (Dolnik et al. 2010). Dentre os diversos parasitos neste contexto, destacam-se os protozoários coccídios, devido à sua grande importância para a biodiversidade e conservação das aves.

Até o momento, seis espécies de coccídios foram registradas em arapaçus neotropicais, mas nenhuma delas no Brasil. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo redescrever *Isoospora striata* McQuiston et al. 1997, de dois novos hospedeiros em áreas protegidas no Brasil, revelando novas localidades e a ampla distribuição desta espécie coccidiana na Região Neotropical. Além disso, o presente estudo irá fornecer identificações genotípicas preliminares via sequenciamento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) de ambas as espécies hospedeiras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Oito expedições foram realizadas em duas unidades de conservação federais brasileiras no sudeste do Brasil: (1) Parque Nacional do Itatiaia, uma área protegida com alto grau de vulnerabilidade, localizada na Serra da Mantiqueira, na divisa com os Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (ICMBIO 2020a); e (2) Parque Nacional da Serra dos Órgãos, outra área protegida criada para a conservação da biodiversidade da Serra do Mar na região montanhosa do Estado do Rio de Janeiro (ICMBIO 2020b). As primeiras seis expedições foram realizadas em março (22 ° 27 ' 40,3 S, 44 ° 35 31,9 O) abril (22 ° 27 52,0 S, 44 ° 36 26,0 ' ' O) 2015, Outubro (22 ° 27'40,3"S, 44 ° 35'31,9"W) de 2016, abril (22 ° 27'20,6"S, 44 ° 36'28,6"W) 2017 maio (22 ° 27 '40,3"S, 44 ° 35'31,9"W) agosto (22° 26'57,0"S, 44 ° 36'25,0"W) de 2018 no Parque Nacional do Itatiaia, sendo as duas últimas expedições realizadas em fevereiro (22 ° 27'23,8"S, 42 ° 59'58,7"W) e agosto (22 ° 27'29,0"S, 43 ° 00'08,8"W) de 2019 no Parque Nacional da Serra dos

Órgãos. Foram capturados dezesseis arborícolas *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) no Parque Nacional do Itatiaia e dois exemplares de arapaçus de garganta branca *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos.



Figura 1: Exemplares das aves hospedeiras *Dendrocincla turdina*(A); *Xiphocolaptes albicollis* (B).

RESULTADOS

Prevalência e identificação

Foram examinadas dezesseis exemplares de *D. turdina* do Parque Nacional do Itatiaia e nove foram positivas para coccidiose. Os dois exemplares de *X. albicollis* capturados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos também foram positivos. Esses oocistos de ambas as espécies hospedeiras, após esporulação, foram morfológicamente identificados como *I. striata*, descrita da seguinte forma:

Isospora striata McQuiston et al. 1997 (Figs. 1 e 2a-j)

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: *Isospora* Schneider, 1881

Oocisto (n = 88) subsférico a ovóide, 16–23 × 13–21 (19,4 × 16,8); relação comprimento / largura (L / W) 1,0-1,4 (1,16). Parede com duas camadas, 1,1-1,5 (1,3) de espessura, camada externa lisa, c.2 /

3 da espessura total. Micrópila delicada ou imperceptível, 2,8–7,1 (4,2) de largura. O resíduo de oocisto está ausente, mas 1–3 grânulos polares estão presentes. Esporocisto ovóide, 11–16 × 6–10 (13,6 × 8,3); Relação L / W 1,5–2,0 (1,64). O corpo de Stieda está presente, protuberante, arredondado para o formato de botão, 1,1–2,1 de altura × 1,2–1,6 de largura (1,3 × 1,4). O corpo de Sub-Stieda está presente, retangular a arredondado, e situado diretamente abaixo do corpo de Stieda, 1,0–1,4 de altura × 1,4–2,2 de largura (1,2 × 1,9). O corpo de Para-Stieda está ausente. O resíduo do esporocisto está presente, consistindo de grânulos parcialmente ligados e / ou difusos. Esporozoítos vermiformes, com corpo refrátil posterior, núcleo central e estriações.

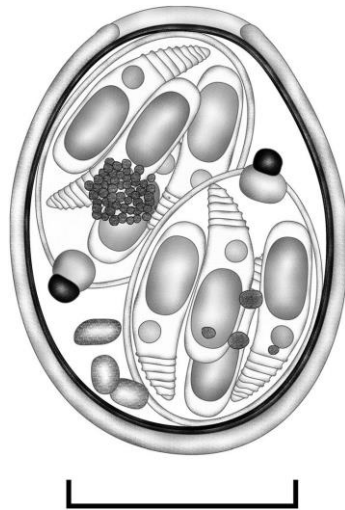


Figura 2: Desenho de composição do coocisto esporulado para a descrição de *Isospora striata* de arapaçus da Mata Atlântica brasileira. Barra de escala: 10 µm

Resumo taxonômico

Hospedeiro: *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Sittasominae), arapaçu-liso; *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Dendrocolaptinae), arapaçu-de-garganta-branca.

Localidades: Parque Nacional do Itatiaia (22 ° 27'S, 44 ° 35'W) e Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22 ° 27'S, 43 ° 00'W), ambos do Sudeste do Brasil.

Espécimes: Fotomicrografias, desenho de linha e oocistos em solução K₂Cr₂O₇ 2,5% (Williams et al. 2010) são depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob os números de acesso MZURPTZ2020026 (*D. turdina*) e MZURPTZ2020027 (*X. albicollis*). Fotomicrografias também estão depositadas e disponíveis (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob os números de repositório 110/2020 (*D. turdina*) e 111/2020 (*X. albicollis*). Os fotografias dos

espécimes hospedeiros são depositados na mesma coleção.

Sequência de DNA representativa: a amplificação de DNA do gene COI mostrou bandas claras em torno de 250 pb. As sequências representativas foram depositadas na base de dados GenBank sob os números de acesso MW582619 (*D. turdina*) e MW582620 (*X. albicollis*).

Local de infecção: Desconhecido.

Prevalência: 61% (11/18) no total; 56% (9/16) para *D. turdina*; e 100% (2/2) para *X. albicollis*.

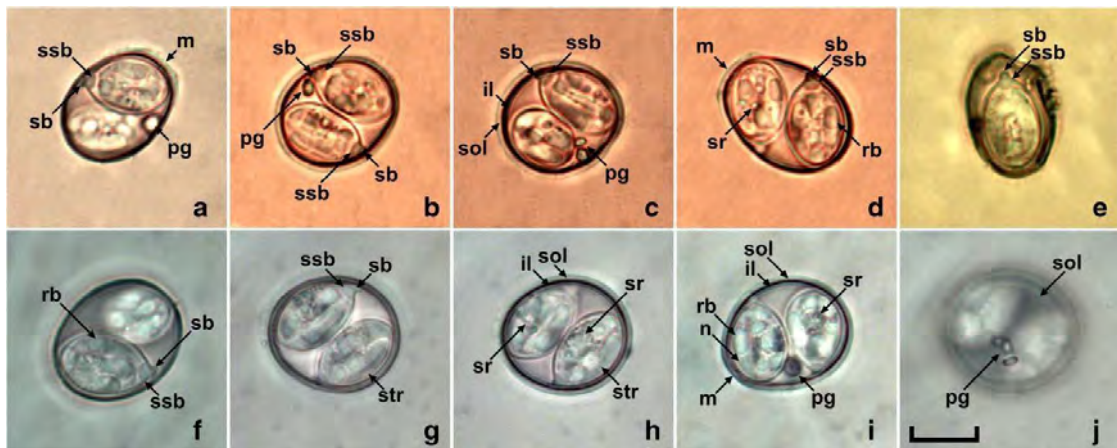


Figura 3: Fotomicrografias de *Isospora striata* recuperadas de Arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (a – e) e de Arapaçu-de-garganta-branca *Xiphocolaptes albicollis* (f – j). Observe a camada interna (il) e a camada externa lisa (sol) da parede do oocisto, micrópila (m), núcleo (n).

Análise filogenética

A análise filogenética baseada no gene COI incluiu sequências de coccidianos disponíveis no GenBank (Fig. 4). *Eimeria tenella* (Railliet e Lucet, 1891) foi usada como grupo externo. *Isospora striata* de *D. turdina* e *X. albicollis* eram 100% idênticos e estavam em um clado com semelhança de 99% com *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira e Lopes, 2009, que é um parasita de *Tyrant-flycatchers* (Tyranni: Tyrannoidea) no Brasil (Ortúzar-Ferreira et al. 2021). *Isospora striata* estava também perto de outra espécie de *Isospora* de passeriformes neotropicais suboscines (Tyranni), como *Isospora saggitulae* McQuiston e Capparella, 1992, Thamnophilidae com 96% de similaridade (Silva-Carvalho et al. 2018), mas também com passeriformes oscines neotropicais (Passeri), como *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira e Lopes, 2014, de sabiás (Turdidae) com 97% de similaridade (Genovez-Oliveira et al. 2020), além de outra espécie de *Isospora* de outras regiões zoogeográficas distantes, como *Isospora coronoideae* Liu et al. 2019, dos corvos-australianos *Corvus coronoideae* Vigors e Horsfield, 1827 (Passeri: Corvidae) da Austrália com 95% de similaridade (Liu et al. 2019).

DISCUSSÃO

No Brasil, os Passeriformes reúnem cerca de 37 famílias distribuídas em todos os biomas brasileiros (Mata Atlântica, Amazônia, Pantanal, Caatinga, Cerrado e Pampa), compreendendo mais da metade de todas as aves. Dencrocolaptidae compreende 14 gêneros e 43 espécies conhecidas como “arapaçus” no Brasil (Piacentini et al. 2015). Apesar dessa grande diversidade, o trabalho atual relata pela primeira vez uma espécie de *Isospora* arapaçus brasileiros. A baixa densidade e prevalência esperadas de aves insetívoras (Dolnik et al. 2010) poderiam justificar esse primeiro relato em arapaçu apenas em 2020; no entanto, ao contrário do que era esperado, a prevalência foi razoavelmente alta no atual estudo (61%), mesmo com o baixo número de exemplares analisados.

Isospora striata foi originalmente descrita a partir de arapaçus ocelados *Xiphorhynchus ocellatus* (Spix, 1824) na província de Morona-Santiago, cerca de 5 km a sudoeste de Taisha, no Equador (McQuiston et al. 1997). Os oocistos identificados no presente estudo eram morfológicamente compatíveis com esta descrição original de McQuiston et al. (1997); com exceção da presença da micrópila e outras pequenas diferenças no tamanho e forma de alguns aspectos característicos (Tabela 1). A micrópila identificada nos oocistos do presente trabalho é delicada e imperceptível, sendo difícil de observar na maioria dos oocistos; portanto, deve ter sido não observado por McQuiston et al. (1997). As diferenças na morfometria podem ser justificadas pelo maior número de oocistos medidos no presente estudo, além do maior número de espécies e espécimes hospedeiros (Sampaio 2002; Berto e Lopes 2020). A comparação morfométrica entre os oocistos dos dois hospedeiros do presente trabalho foi suprimida, devido ao baixo número de oocistos e hospedeiros *X. albicollis* em relação a *D. turdina*, o que fragilizaria qualquer análise estatística. Em qualquer caso, as diferenças morfométricas entre o trabalho atual e o original de McQuiston et al. (1997) estiveram principalmente associados aos intervalos medidos, enquanto as médias foram mais próximas. De fato, os principais traços característicos que orientaram a identificação como *I. striata* no presente trabalho foram as estriações nos esporozoítos e o corpo retangular sub-Stieda, que foram excepcionalmente destacados por McQuiston et al. (1997) por serem os principais traços distintivos de *I. striata* em comparação as demais espécies de *Isospora* registradas de Dencrocolaptidae (Tabela 1).

Os hospedeiros do presente estudo, *D. turdina* e *X. albicollis*, e o hospedeiro da descrição original de *I. striata*, *X. ocellatus*, não são simpátricos. Na verdade, o hospedeiro original identificado por McQuiston et al. (1997) é potencialmente o atual *Xiphorhynchus chunchotambo* de Tschudi (von Tschudi, 1844), que foi previamente classificado como uma subespécie de *X. ocellatus*. No entanto, atualmente, apenas *X. chunchotambo* tem distribuição no Equador, enquanto *X. ocellatus* está restrito à Amazônia brasileira e peruana, sendo ligeiramente simpátrico a *X. chunchotambo* nos estados

brasileiros do Acre e Rondônia (Fig. 5). No extremo oposto, na América do Sul, *D. turdina* e *X. albicollis* estão distribuídos estritamente na Mata Atlântica.

Assim, a não simpatria desses hospedeiros poderia ser incompatível com a identificação de *I. striata* no presente estudo, uma vez que a transmissão de *Isospora* spp. é fecal-oral e, portanto, depende da simpatria mínima para que haja transmissão / dispersão de seus oocistos; no entanto, conforme assumido nos estudos de Berto et al. (2014b), Silva et al. (2017), e Silva-Carvalho et al. (2018), hospedeiros suscetíveis com ampla distribuição geográfica na América do Sul poderiam transmitir *I. striata* a uma ampla gama de hospedeiros simpátricos suscetíveis. Desta forma, o arapaçu-verde *Sittasomus griseicapillus* (Vieillot, 1818) e o arapaçu-de-bico-branco *Dendroplex picus* (Gmelin, 1788) podem ser potenciais transmissores / dispersores de *I. striata* na América do Sul, uma vez que possuem ampla distribuição geográfica e são simpátricos com *X. ocellatus* / *X. chunchotambo*, *D. turdina* e *X. albicollis* (Fig. 5). Vale ressaltar que essa suposição se baseia no conceito de especificidade a nível da família hospedeira, que tem sido amplamente aceito em inúmeros estudos de taxonomia coccidiana (Duszynski e Wilber 1997; Berto et al. 2011).

A similaridade genotípica de 100% no gene COI entre as amostras de *D. turdina* e *X. albicollis* confirma a identificação de uma única espécie desses hospedeiros e reforça a identificação de *I. striata* na Mata Atlântica brasileira, pois se essa espécie pode parasitar arapaçus de diferentes espécies, potencialmente esta espécie deve estar amplamente distribuída nas áreas geográficas dos arapaçus neotropicais (Fig. 5) (Berto e Lopes 2020).

A análise filogenética da Fig. 4 não permite maiores conclusões sobre a origem ou aspectos dos grupos monofiléticos, uma vez que espécies de *Isospora* de Passeriformes em diferentes famílias e subordens, de diferentes e distantes regiões zoogeográficas e com diferentes características sentavam-se nos mesmos clados. Na verdade, o uso de um único gene para a identificação genotípica de *Isospora* spp. não permite uma caracterização filogenética mais detalhada (Yang et al. 2021); em qualquer caso, o gene COI tem sido o mais indicado para confirmação de espécies (Ogedengbe et al. 2011, Yang et al. 2015, Silva-Carvalho et al. 2018) e o mais utilizado para estudos genotípicos e filogenéticos de *Isospora* spp., possivelmente devido à extração e amplificação favorável de genes mitocondriais, que estão em maior número de cópias, de oocistos individuais (Dolnik et al. 2009).

Finalmente, com base nas características morfológicas e moleculares descritas acima, *I. striata* é redescrita no presente trabalho, documentando dois novos hospedeiros, *D. turdina* e *X. albicollis*, e novas localidades na Mata Atlântica brasileira, o Parque Nacional do Itatiaia e o Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

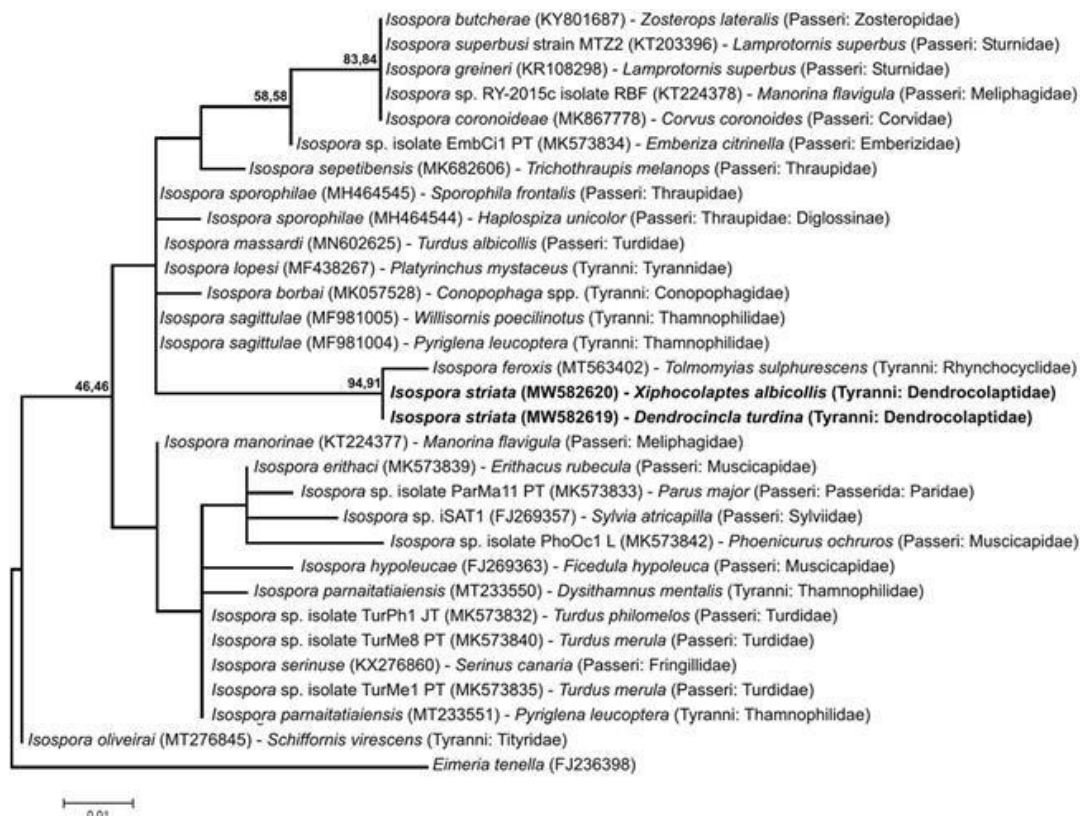


Figura 4: Árvore de verossimilhança máxima estimada a partir das sequências do gene COI de espécies de *Isospora*. Os números representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para junção de vizinho (NJ) e máxima verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

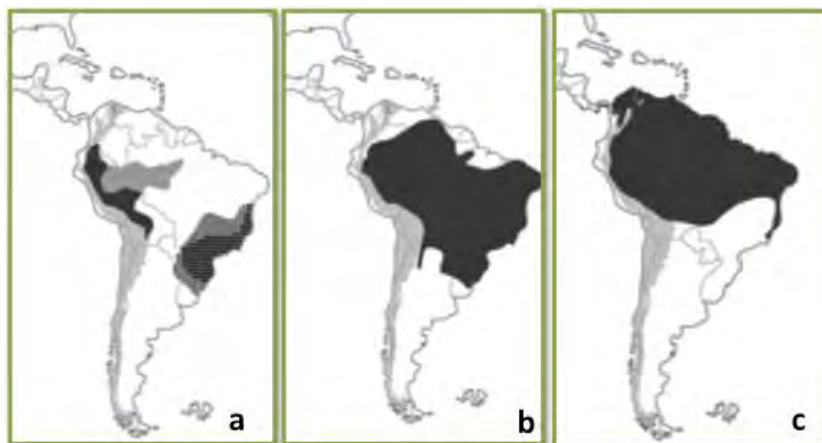


Figura 5: Distribuição geográfica dos dendrocolaptídeos hospedeiros de *Isospora striata* na região Neotropical (com base em dados da IUCN 2020). *Xiphorhynchus chunchotambo* e *Xiphorhynchus ocellatus* estão distribuídos na Amazônia. Os hospedeiros relatados neste trabalho, *Xiphocolaptes albicollis* e *Dendrocincla turdina* distribuídos nas áreas geográficas na Mata Atlântica no sudeste do Brasil (a). *Sittasomus griseicapillus* (b) e *Dendroplex picus* (c) são exemplos de arapaçus com ampla distribuição geográfica neotropical que são simpátricas com *X. chunchotambo*, *X. ocellatus*, *X. albicollis* e *D. turdina*.

Table 1. Morfologia comparativa de espécies de *Isospora* registrados em arapaços (Dendrocolaptidae).

Coccídeo	Hospedeiro	Localidade	Referência	Oocistos					Esporocistos					Esporozoíto							
				Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Parede	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar	Forma	Comprimento (µm)	Largura (µm)	C/L razão	Corpo Stieda	Corpo Substieda	Resíduo	Corpo refrátil	Núcleo	Estriação
<i>Isospora</i>																					
<i>concentrica</i>	<i>Dendrocolapt</i>	Equador,	McQuiston	ovóide	24–30 (26.9)	21–25 (22.7)	1.04	–	Lisa ausente	ausente	presente	ovóide a elipsoidal	15.0–18.0 (17.2)	9.0–12.0 (11.0)	1.42–1.70 (1.56)	em forma de bloco	ovóide ou em forma de bolha	ppresente, compacto	presente, posterior	presente	presente
McQuiston and Caparella, 1995	(Boddaert, 1783)	América do Sul	and Caparella (1995)																		
<i>Isospora</i>																					
<i>magna</i>	<i>D. certhia</i>	Equador,	McQuiston	ovóide	26.0–31.0 (29.7)	23.0–26.0 (24.9)	1.08	–	Lisa ausente	ausente	subsférico l a ovóide	ovóide	15.0–20.0 (15.8)	11.0–14.0 (12.6)	1.07–1.82 (1.28)	amplo, semelhante a uma cúpula	imperceptível	composto uniforme	present, 2	presente	ausên te
McQuiston and Caparella, 1995		América do Sul	and Caparella (1995)																		
<i>Isospora</i>																					
<i>ocellati</i>	<i>Xiphorhynchus ocellatus</i>	Equador,	McQuiston	ovóide	18–21 (20.0)	15–19 (17)	1–1.3 (1.2)	–	Lisa ausente	ausente	ovóide a subsférico	ovóide	11–13 (12)	7–9 (8)	1.2–1.7 (1.5)	cúpula ou bolha	elipsoidal	composto	presente, posterior	presente	ausên te
McQuiston, Walden and Caparella, 1997	(Spix, 1824)	América do Sul	et al. (1997)																		
<i>Isospora</i>																					
<i>striata</i>	<i>X. ocellatus</i>	Equador,	McQuiston	ovóide	16–20 (18)	15–17 (16)	1.1–1.2 (1.2)	–	Lisa ausente	ausente	subsférico	ovoidal	11–12 (11)	7–8 (8)	1.4–1.5 (1.4)	protuberante e semelhante a mamilo	retangular	compato, esférico	presente, posterior	presente	presente
McQuiston, Walden and	(Spix, 1824)	América do Sul	et al. (1997)																		

Caparella, 1997	<i>Xiphocolaptes albicollis</i>	Brasil, América do Sul	Presente trabalho	Subsférico a ovóide	16–23 (19.4)	13–21 (16.8)	1.0–1.4 (1.2)	Lisa ausente	presente, subsférico a imperceptível	elipsoidal, ovóide	11–16 (13.6)	6–10 (8.3)	1.5–2.0 (1.6)	protuberante, arredondado e em forma de botão	rectangular arredondado	comparto ou difundido	presente, 1 posterior	presente	ausente
McQuiston and Caparella, 1997	<i>Isospora ubiqua</i>	Equador, América do Sul	McQuiston and Caparella (1997)	subsférico a ovóide	21–27 (23.4)	19–24 (21.8)	1.00–1.23 (1.07)	Lisa ausente	ausente	ovóide	14–16 (14.8)	9–11 (10.1)	1.36–1.67 (1.46)	tipo mamilo	absent	composed	presente, 1 posterior	presente	ausente
McQuiston and Galewsky, 2010	<i>Isospora dendrocinclae</i>	Guiana, América do Sul	McQuiston et al. (2010)	Subsférico a ovóide	15–23	14.5–19	1.1–1.3 (1.2)	Lisa ausente	ausente	subsférico ovóide	12–14	7–10	1.6–1.8 (1.7)	pequeno e em forma de botão	slightly larger and subglobular	subspherical	presente, 1 posterior	presente	ausente

REFERÊNCIAS

- ALEIXO A, VIELLIARD J. **Composição e dinâmica da avifauna da mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo, Brasil.** Rev Bras Zool 12: 493–511, 1995.
- BERTO BP, LOPES CWG. **Coccidia of wild birds as ecological bio- markers: some approaches on parasite-host-environment interaction.** J Parasitol 106:707–713, 2020. BERTO BP, FLAUSINO W, MCINTOSH D, TEIXEIRA-FILHO WL, CWG L **Coccidia of new world passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of Eimeria Schneider, 1875 and Isospora Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae).** Syst Parasitol 80:159–204, 2011.
- BERTO BP, MCINTOSH D, LOPES CWG. **Studies on coccidian oo- cysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida).** Rev Bras Parasitol Vet 23:1– 15, 2014a.
- BERTO BP, LOPES BB, MELINSKI RD, SOUZA A, RIBAS C, ABREU F, FERREIRA I, LOPES CWG. **Coccidial dispersion across trans- and cis- Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): Isospora sagittulae McQuiston and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts.** Can J Zool 92:383–388, 2014b.
- BORNSCHEIN MR, REINERT BL. **Aves de três remanescentes florestais do norte do Estado do Paraná.** Rev Bras Zool 17:615–636, 2000.
- CHRISTIANSEN B, PITTER E. **Species loss in a forest bird community near Lagoa Santa in southeastern Brazil.** Biol Conserv 80:23–32, 1997.
- DOLNIK OV, PALINAUSKAS V, BENSCH S **Individual oocysts of Isospora (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence.** J Parasitol 95:169–174, 2009. DOLNIK OV, DOLNIK VR, BAIRLEIN F. **The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds.** Ardea 98:97–103, 2010.
- DUSZYNSKI D, WILBER P. **A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae.** J Parasitol 83:333–336, 1997.
- GENOVEZ-OLIVEIRA JL, OLIVEIRA MS, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, FERREIRA I, BERTO BP. **Morphological and molecular identification of Isospora massardi Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes Turdus spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America.** Parasitol Int 75:102040, 2020.
- ICMBIO (2020a) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>>. Accessed 02 Jul 2020
- ICMBIO (2020b) Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>>. Accessed 02 Jul 2020

IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Available from:

<<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 02 Aug 2020

LIU D, BRICE B, ELLIOT A, RYAN U, YANG R. **Isospora coronoides n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Australian raven (Corvus coronoides) (Passeriformes: Corvidae) (Linnaeus, 1758) in Western Australia.** Parasitol Res 118:2399–2408, 2019.

MARANTZ CA, ALEIXO A, BEVIER LR, PATTEN MA DEL HOYO J, ELLIOTT A, CHRISTIE D (EDS). **Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). Handbook of the birds of the world.** Lynx Edicions, Barcelona, pp 358–447, 2003.

MCQUISTION TE, CAPPARELLA A. **Two new isosporan parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from the South American woodcreeper Dendrocolaptes certhia.** Acta Protozool 34:299–302, 1995.

MCQUISTION TE, CAPPARELLA A. **Isospora ubiquis: a new coccidian parasite from the wedge-billed woodcreeper (Glyphorhynchus spirurus) from South America.** Acta Protozool 36:75–78, 1997.

MCQUISTION TE, WALDEN KKO, CAPPARELLA AP. **Two new species of Isospora (Apicomplexa: Eimeriidae) from the ocellated woodcreeper, Xiphorhynchus ocellatus (Passeriformes: Dendrocolaptidae).** Arch Protistenkd 147:401–404, 1997.

MCQUISTION TE, GALEWSKY S, CAPPARELLA AP, REBLING F. **Isospora dendrocinclae n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the whitechinned woodcreeper (Dendrocincla merula) from South America.** Acta Protozool 49:121–124, 2010.

OGEDENGBE JD, HANNER RH, BARTA JR. **DNA barcoding identifies Eimeria species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata).** Int J Parasitol 41: 843–850, 2011.

ORTÚZAR-FERREIRA CN, MELLO ER, MELO JO, OLIVEIRA MS, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, FERREIRA I, BERTO BP. **Redescription and molecular identification of Isospora ferox Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America.** Syst Parasitol [in press], 2021.

PIACENTINI VDQ, ALEIXO A, AGNE CE, MAURÍCIO GN, PACHECO JF, BRAVO GA, BRITO GRR, NAKA LN, OLMOS F, POSSO S, SILVEIRA LF, BETINI GS, CARRANO E, FRANZ I, LEES AC, LIMA LM, PIOLI D, SCHUNCK F, AMARAL FR, BENCKE GA,

COHN-HAFT M, LFA F, STRAUBE FC, CESARI. **E Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee.** Rev Brasil Ornitol 23:91–298, 2015.

SAMPAIO IBM. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte, FEP MVZ. Editora, 265pp, 2002.

SICK H. **Ornitologia Brasileira.** Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp, 1997.

SIGRIST T. **Guia de Campo: Avifauna Brasileira.** São Paulo, Avis Brasilis, 608 pp, 2014. SILVA LM, RODRIGUES MB, PINHO IF, LOPES BB, LUZ HR, FERREIRA I, LOPES CWG,

BERTO BP. **Some remarks on the distribution and dispersion of coccidia from icterid birds in South America: Isospora guaxi n. sp. and Isospora bellicosa Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique Cacicus haemorrhous (L.) (Passeriformes: Icteridae) in Southeastern Brazil.** Syst Parasitol 94:151–157, 2017.

SILVA-CARVALHO LM, PASTURA DG, RODRIGUES MB, GOMES JV, OLIVEIRA. MS, SIQUEIRA PB, GENOVEZ-OLIVEIRA JL, SOARES SS, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM,

- FERREIRA I, BERTO BP. ***Isoospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region.** Parasitol Res 117:2635–2641, 2018.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol Biol Evol 24:1596–1599, 2007.
- WILLIAMS RB, THEBO P, MARSHALL RN, MARSHALL JA. **Coccidian oocysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA.** Syst Parasitol 76:69–76, 2010.
- YANG R, BRICE B, ELLIOT A, RYAN U. ***Isoospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria forma domestica*) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia.** Exp Parasitol 159:59–66, 2015.
- YANG R, BRICE B, LIU Q, BERTO BP, AUSTEN J, RYAN U **Morphological and genetic characterization of the first *Isoospora* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*).** Parasitol Res 120:1037–1047, 2021.

CAPÍTULO V

Redescricao de *Eimeria labbeana* de columbiformes de Portugal

Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896)

Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal

Resumo

Columbiformes apresentam uma ampla distribuição mundial, das quais 166 espécies ocorrem na Eurásia. Eles foram relatados sendo parasitados por coccídios recorrentemente nos últimos anos; no entanto, *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928, que é a primeira espécie de *Eimeria* de Columbiformes descrita no final do século XIX, não é taxonomicamente identificado por seus oocistos desde os anos 1930. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo complementar a morfologia de *E. labbeana* de rola-turca *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838 e de um pombo-toraz *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 em Portugal, proporcionando uma caracterização genotípica preliminar. Três dos quatro exemplares de columbiformes foram positivos para oocistos identificados como *E. labbeana*, que foram revisados morfologicamente como possuindo micrópila, além de outras pequenas características. Os oocistos de *S. decaocto* e *C. palumbus* foram morfologicamente idênticos e equivalentes em todos os aspectos morfométricos, além de apresentarem similaridade genotípica de 99,5%. A análise filogenética baseada no gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase resultou em um grande clado com *Eimeria* spp. e *Isospora* spp. de diferentes vertebrados e baixa similaridade entre *Eimeria* spp. de Columbiformes; ao passo que a análise filogenética baseada na pequena subunidade do gene do RNA ribossômico resultou em grupos monofiléticos bem sustentados, incluindo um com os coccídios de aves columbiformes.

Palavras-chave: oocistos; coccidia; taxonomia; morfologia; genotipagem; filogenia; pombos; pombas; Eurásia

Abstract

Columbiformes have a worldwide distribution, of which 166 species occur in Eurasia. They have been reported parasitized by coccidians recurrently in recent years; however, *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928, which is first *Eimeria* sp. from Columbiformes described in the late 19th century, is not taxonomically identified by its oocysts since the 1930s. In this context, the current study aimed to supplement the morphology of *E. labbeana* from Eurasian collared-doves *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838 and from a common woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 in Portugal, providing a preliminary genotypic characterization. Three of the four columbiforms were positive for oocysts identified as *E. labbeana*, which were morphologically revised as having micropyles, in addition to other minor adjustments. Oocysts from *S. decaocto* and *C. palumbus* were morphologically identical and equivalent in all morphometric aspects, besides having genotypic similarity of 99.5%. Phylogenetic analysis based on the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene resulted in a large clade with *Eimeria* spp. and *Isospora* spp. from different vertebrates and low similarity between *Eimeria* spp. from Columbiformes; whereas, the phylogenetic analysis based on the small subunit ribosomal RNA gene resulted in well-supported monophyletic groups, including one with the coccidians of columbiform birds.

Keywords: oocysts; coccidia; taxonomy; morphology; genotyping; phylogeny; pigeons; doves; Eurasia

INTRODUÇÃO

As aves classificadas na ordem Columbiformes são representados por 369 espécies em todo o mundo, sendo 166 distribuídas na Eurásia (IUCN 2020). São aves com um sentido de orientação excepcional que permitem voos de longa distância. Esse fato permite que tenham distribuições geográficas quase sempre continentais, cruzando dois ou três continentes (IUCN 2020; Sick 1997). A pomba ou pombo comum *Columba livia* Gmelin, 1789 exemplifica uma distribuição geográfica extrema, visto que é nativa da Eurásia e do Norte da África e introduzida em todos os outros continentes do planeta, onde se adaptou amplamente, principalmente em áreas urbanas (IUCN 2020)

A maioria das aves Columbiformes se alimentam do solo em busca de grãos e sementes (Sick 1997). Esse hábito favorece a transmissão de parasitos pela via fecal-oral, como os coccídios, amplamente relatados por columbiformes nos últimos anos (Dolnik et al. 2021). Entre as espécies de coccídios registradas em Columbiformes, *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928 pode ser

destacada como a primeira espécie a ser descrita no século XIX pelo Dr. Alphonse Labbé (Labbé 1896; Ortúzar-Ferreira et al. 2020). Nas décadas seguintes, *E. labbeana* foi frequentemente utilizado em estudos de ensaios experimentais, ultraestrutura ou biologia coccidiana em geral (Duncan 1957; Quevedo e Arcay-de-Peraza 1980; Coussement et al. 1988; Marzouk et al. 1989; Vercruyse et al. 1990); embora tenha sido estudado taxonomicamente pela última vez na década de 1930, por Nieschulz (1935).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo redescrever *E. labbeana* a partir de *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838 e de *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 que estavam sendo mantidos para reabilitação e reintrodução na natureza no Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa (Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa), no Parque Florestal de Monsanto, Lisboa, Portugal, fornecendo uma caracterização genotípica preliminar via sequenciamento do mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e subunidade pequena 18S RNA ribossômico (18S) genes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras

Amostras fecais foram coletadas de três exemplares de *S. decaocto* e um exemplar de *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 que foram mantidos individualmente em gaiolas para reabilitação e reintrodução na natureza no Centro da Natureza de Lisboa Recuperação Animal, no Parque Florestal de Monsanto, Lisboa, Portugal. As amostras foram coletadas imediatamente após a defecação e foram

colocados em tubo de ensaio contendo 2,5% de Solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) a 1: 6 (v / v). Seguindo todas as diretrizes aplicáveis, nacionais e internacionais para o cuidado e uso de animais. A manipulação dos animais no Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa foi realizada por profissionais qualificados, de acordo com a diretriz 86/609 / CEE.

Análises morfológicas

No Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, as amostras foram incubadas em sala climatizada por 7 dias para posterior recuperação dos oocistos esporulados por meio de flotação Sheather, em Solução de açúcar (gravidade específica: 1,20). Oocistos esporulados das amostras positivas foram lavadas e diluídas em solução de K₂Cr₂O₇ e encaminhadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para identificação usando a técnica descrita por Duszynski e Wilber (Duszynski & Wilber, 1997) e Berto et al (Berto et al, 2014).

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar as medidas do comprimento, relação largura e comprimento / largura (L / W) dos oocistos e esporocistos recuperados de *S. decaocto* e *C. palumbus*. O teste de normalidade de D'Agostino foi empregado anteriormente para avaliação dos dados. O pacote estatístico Bioestat 5.0 (Ayres et al, 2002) foi usado para calcular a média, variância, grau de liberdade e valor de p (Sampaio, 2002; Berto et al, 2014).



Figura 1: Exemplos das aves hospedeira *Streptopelia decaocto* (A); *Columba palumbus* (B).

RESULTADOS

Prevalência e identificação

Quatro aves columbiformes (3 *S. decaocto* e 1 *C. palumbus*) foram examinadas. Dois exemplares de *S. decaocto* e um exemplar de *C. palumbus* foram positivos para uma espécie coccidiana, que foi morfológicamente identificada como *E. labbeana* (Fig. 2, 3a-h). Dados morfológicos suplementares e análises moleculares são fornecidos abaixo.

Eimeria labbeana (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Figs. 2, 3a-h)

Reino: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Filo: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Família: Eimeriidae Minchin, 1903

Gênero: Eimeria Schneider, 1875

Oocisto (n = 73) subsféricos a elipsoidal, 16–21 μm \times 14–18 μm (18,7 \times 15,7 μm); Razão L / W 1,0-1,4 (1,2). Parede com duas camadas, 1,0–1,5 μm (1,2 μm) de espessura, camada externa lisa. Micrópilas estão frequentemente presentes, de forma mais perceptível um na extremidade

longitudinal e outra na lateral. Resíduo de oocisto ausente, mas um a três grânulos polares estão presentes. Esporocistos (n = 73) 4, ovóides ou ligeiramente reniforme, 10–14 μm \times 5–7 μm (12,2 \times 6,4 μm); Razão L / W 1,8–2,4 (2,1). Corpo de Stieda presente, triangular proeminente, 1,0–1,3 μm \times 1,2–1,4 μm (1,2 \times 1,3 μm); corpos sub-Stieda e para-Stieda ausentes; Resíduo de esporocisto presente, composto de esférulas dispersas. Dois esporozoítos, vermiformes, com corpos refráteis anteriore posterior e um núcleo.

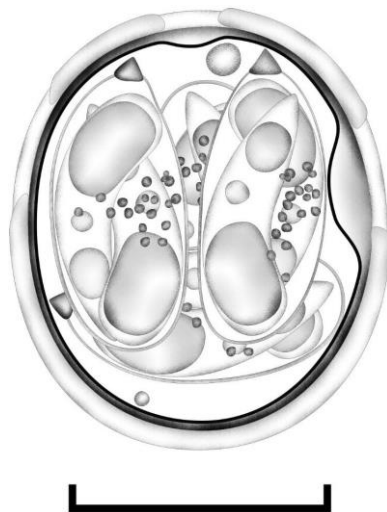


Figura 2: Desenho de linha de *Eimeria labbeana*, uma espécie de coccídio recuperada de pássaros columbiformes. Barra de escala: 10 μm .

Resumo Taxonômico

Hospedeiros: rola-roxa *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838; e o pombo-torcaz *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbiformes: Columbidae).

Localidade: Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa (Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa), Parque Florestal de Monsanto, Lisboa, Portugal (38 ° 44'22.9"N, 9 ° 11'02.3"W).

Espécimes: Fotomicrografias, desenho de linha e oocistos em solução de K₂Cr₂O₇ 2,5%, de acordo com as diretrizes de Williams et al. (2010), estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, sob os números de acesso MZURPTZ2020023 (*S. decaocto*) e MZURPTZ2020024 (*C. palumbus*). Fotomicrografias também estão depositadas e disponíveis (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) na Coleção de Parasitologia do Laboratório de Biologia de Coccídios, da UFRRJ, sob os números do repositório 106/2020 (*S. decaocto*) e 107/2020 (*C. palumbus*). As fotografias dos espécimes hospedeiros são depositados na mesma coleção.

Sequência de DNA representativa: a amplificação de DNA dos genes COI e ssrRNA mostrou bandas claras em torno de ~ 250 bp e ~ 400 bp, respectivamente. As sequências representativas foram

depositadas na base de dados GenBank com os números de acesso: MT475825 (COI, *S. decaocto*); MT475826 (COI, *C. palumbus*); e MT472289 (18S, *S. decaocto*).

Local de infecção: Desconhecido.

Prevalência: 75% (3/4) no total; 67% (2/3) para *S. decaocto*; e 100% (1/1) para *C. palumbus*

Observações

A morfologia comparativa entre espécies de *Eimeria* registradas de Columbiformes e os oocistos identificados no presente estudo são mostrados na Tabela 1. Oocistos de *S. decaocto* e *C. palumbus* eram morfologicamente idênticos entre si e equivalentes em todos os aspectos morfométricos por ANOVA (Tabela 1). A identificação como *E. labbeana* baseou-se na característica típica do corpo triangular proeminente de Stieda, presença de micrópila segundo a descrição de Pinto (1928), além dos tamanhos e formas semelhantes de oocistos e esporocistos. Além de *E. labbeana*, as espécies *Eimeria columbarum* Nieschulz, 1935, *Eimeria curvata* Adriano, Thyssen e Cordeiro, 2000, *Eimeria livialis* Alyousif, Al-Shawa e Al-Asiri, 2009, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška e Modrý, 2012, *Eimeria mauritiensis*, Daszak, Swinnerton, Jones e Snow, 2012, *Eimeria* sp. de Yang et al. 2016, e *Eimeria ferreirai* Oliveira e Berto, 2020, eram semelhantes em tamanho aos oocistos do presente estudo. Dessas espécies, *E. curvata*, *E. livialis*, *E. mauritiensis* e *Eimeria* sp. de Yang et al. 2016, tem apenas um ou nenhum grânulo polar; e todos, exceto *E. ferreirai*, não possuem micrópila. *Eimeria ferreirai* diferencia-se pelo corpo de Stieda menos proeminente, além de possuir um capuz polar delicada na micrópila e oocistos ligeiramente maiores.

Análise filogenética

Sequências de *Eimeria* spp., *Isospora* spp. e *Cyclospora* spp. disponíveis no GenBank foram usados para a análise filogenética (Figs. 4, 5). O coccídio formador de cisto *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) foi o grupo externo. Na análise filogenética baseada no gene COI (Fig. 4), *E. labbeana* de *S. decaocto* e *C. palumbus* teve similaridade de 99,5% e foram recuperados em um grande clado entre espécies de *Isospora* de Passeriformes e espécies de *Eimeria* de Columbiformes, Anseriformes, Galliformes, Strigiformes e Picittaciformes, além de mamíferos, principalmente roedores. Na análise filogenética baseada em *ssrRNA* (Fig. 5), *E. labbeana* se posicionou em um clado com similaridade de 100% com *Eimeria columbinae* Ortúzar-Ferreira e Berto, 2020 e *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016) e de 99,7% com uma espécie de *Isospora* de pombos domésticos *C. livia* no Japão (Matsubara et al. 2017).

DISCUSSÃO

Eimeria labbeana foi o primeiro Eimeridae descrito de Columbiformes na década de 1920 do século passado (Pinto 1928), corrigindo e renomeando as descrições anteriores de *Coccidium pfeifferi* Labbe, 1896 e *Eimeria pfeifferi* Labbe, 1896, que se tornaram sinônimas (Ortúzar-Ferreira et al. . 2020). Essa descrição de Pinto (1928), embora não muito detalhada, registrou a presença de micrópila nos oocistos. Nos anos 1930 seguintes, Nieschulz (1935) destacou em seus desenhos de linha uma característica distinta principal para *E. labbeana*, um corpo de Stieda triangular proeminente, que seria a principal diferença para a segunda *Eimeria* sp. descrito de Columbiformes, *E. columbarum*. Nesse sentido, os oocistos foram identificados como *E. labbeana* no presente estudo combinando as descrições de Pinto (1928), que observou uma micrópila nos oocistos, e Nieschulz (1935), que destacou o proeminente corpo triangular de Stieda.

Conforme mostrado na Tabela 1, várias espécies de *Eimeria* apresentam morfologia básica e tamanhos semelhantes a *E. labbeana*. Entre eles, *E. curvata*, *E. livialis*, *E. columbapalumbi*, *E. mauritiensis* e *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016) não foram detalhados sobre a morfologia do corpo de Stieda para distingui-los de *E. labbeana*, embora algumas fotomicrografias mostrem corpos de Stieda triangulares, que foram minimamente redesenhados na revisão de Ortuzar-Ferreira et al. (2020). De qualquer forma, nenhuma dessas espécies foi descrita com micrópila, o que deve ser facilmente observado através dos recursos microscópicos disponíveis neste século. Em contrapartida, Nieschulz (1935), ao contrário de Pinto (1928), não deveria ter sido capaz de observar micrópila nos oocistos identificados como *E. labbeana* por meio dos recursos microscópicos disponíveis no início do século passado (Tabela 1).

A descrição de mais de uma micrópila no oocisto é muito incomum na taxonomia de Coccidia. De acordo com Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014), a micrópila consiste em uma descontinuidade na camada externa da parede do oocisto. Nesse sentido, foram observadas até três descontinuidades, ou micrópilas, na camada externa dos oocistos, conforme destacado na Figura 3e; entretanto, duas micrópilas foram observados mais claramente, um na extremidade longitudinal e outro na lateral, conforme mostrado nas Figuras 3a e 3f. Nesse sentido, os oocistos do presente estudo foram identificados como *E. labbeana*, tendo sua descrição morfológica complementada com a presença de micrópilas, além de outras pequenas características.

Além dessa base morfológica, a identificação do presente estudo também é baseada nos relatórios anteriores de *E. labbeana* de *Streptopelia orientalis* Latham, 1790, *Spilopelia senegalensis* Linnaeus, 1766, e *S. decaocto*, na Eurásia e no Norte da África (Coussement et al. 1988; Marzouk et al. 1989; Vercruyssen 1990). Embora esses relatos não sejam de estudos de taxonomia, ou apresentem detalhes

morfológicos dos oocistos, esses relatos estão no banco de dados de coccídios "Coccidia of the World" de Duszinski et al. (2000). Por sua vez, *C. palumbus* apesar de ser um novo hospedeiro no presente estudo, eliminou oocistos com características morfológicas idênticas aos de *S. decaocto*, além de médias equivalentes em todos os aspectos morfométricos (Tabela 1, Fig. 3).

A análise filogenética baseada nas sequências COI (Figs. 4, 5) resultou em um grande clado, com baixo suporte de bootstrap, com *Eimeria* spp. e *Isospora* spp. de diferentes grupos de aves e mamíferos. Até o momento, existem três sequências COI de *Eimeria* spp. de Columbiformes depositados no GenBank, além de *E. labbeana* do estudo atual. Esperava-se que essas espécies fossem genotipicamente semelhantes; no entanto, eles diferiram em 5 a 10%, ou 10 a 20 substituições de nucleotídeos. Uma suposição para essas grandes diferenças pode estar associada às localidades distintas e distantes desses coccídios: *E. columbinae* e *E. ferreirai* são da América do Sul; e *Eimeria* sp. de Yang et al. (2016) é da Oceania (Tabela 1). Em contraste, a distribuição mundial de *C. livia*, como nativa ou introduzida, poderia igualmente distribuir seus coccídios em todo o mundo (IUCN

2020; Berto e Lopes 2020). De qualquer forma, quando mais sequências COI de coccídios de Columbiformes fossem depositadas no GenBank, melhores conclusões seriam possíveis.

No outro extremo, a análise filogenética baseada no gene *ssrRNA* mostrou claramente os grupos monofiléticos de coccídios de acordo com seus grupos de hospedeiros, formando clados com coccídios de bovinos, primatas, galiformes, roedores e, por fim, columbiformes. O clado com os coccídios de Columbiformes apresentou uma similaridade muito alta entre as sequências, o que confirma a adequação do gene *ssrRNA* para o posicionamento filogenético em grupos taxonômicos; no entanto, mostra-se inadequada para diferenciação ou genotipagem específica, pelo menos na região ampliada no presente estudo.

Sendo assim, um novo hospedeiro foi registrado para *E. labbeana*, o pombo-torcaz *C. palumbus* e dados morfológicos suplementares e análises moleculares e filogenéticas pelo COI e *ssrRNA* foram fornecidos para as primeiras espécies de *Eimeria* descritas em Columbiformes.

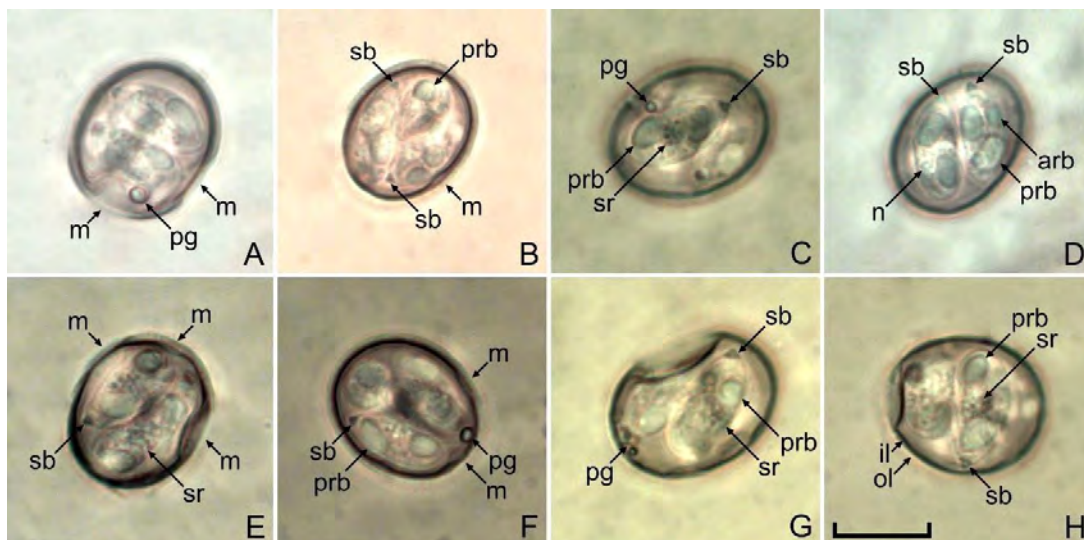


Figura: 3. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria labbeana*, uma espécie de coccídio recuperada de (A-D) *Streptopelia decaocto*, e (E-H) *Columba palumbus* de Portugal. Observe os corpos refráteis anterior (arb) e posterior (prb), camada interna (il) e externa (ol) da parede do oocisto, micrúpila (m), núcleo (n), grânulo polar (pg), resíduo de esporocisto (sr) e o corpo Stieda (sb). Barra de escala: 10 μ m.

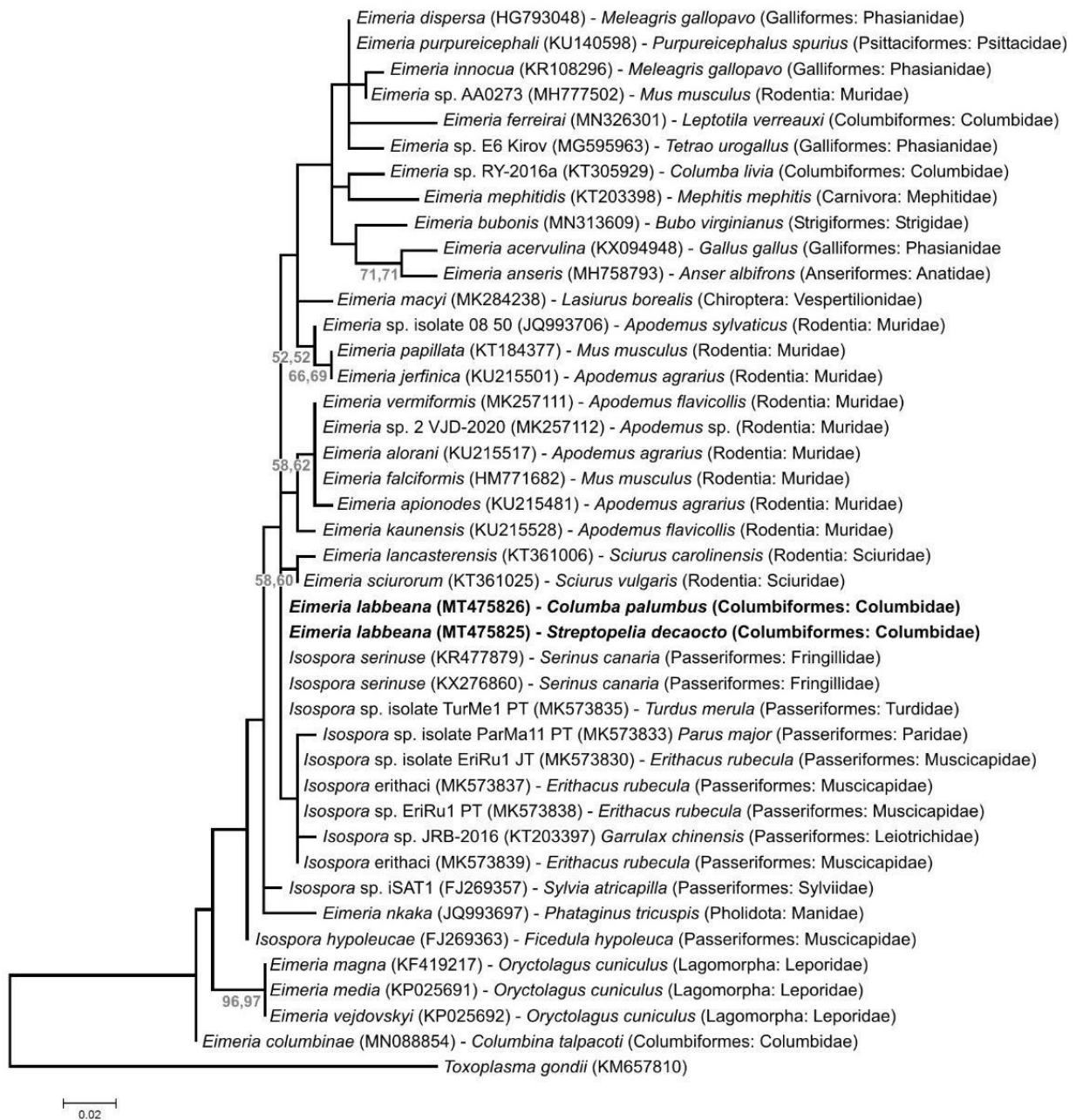


Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene COI de espécies de coccídios. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para Neighbour-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

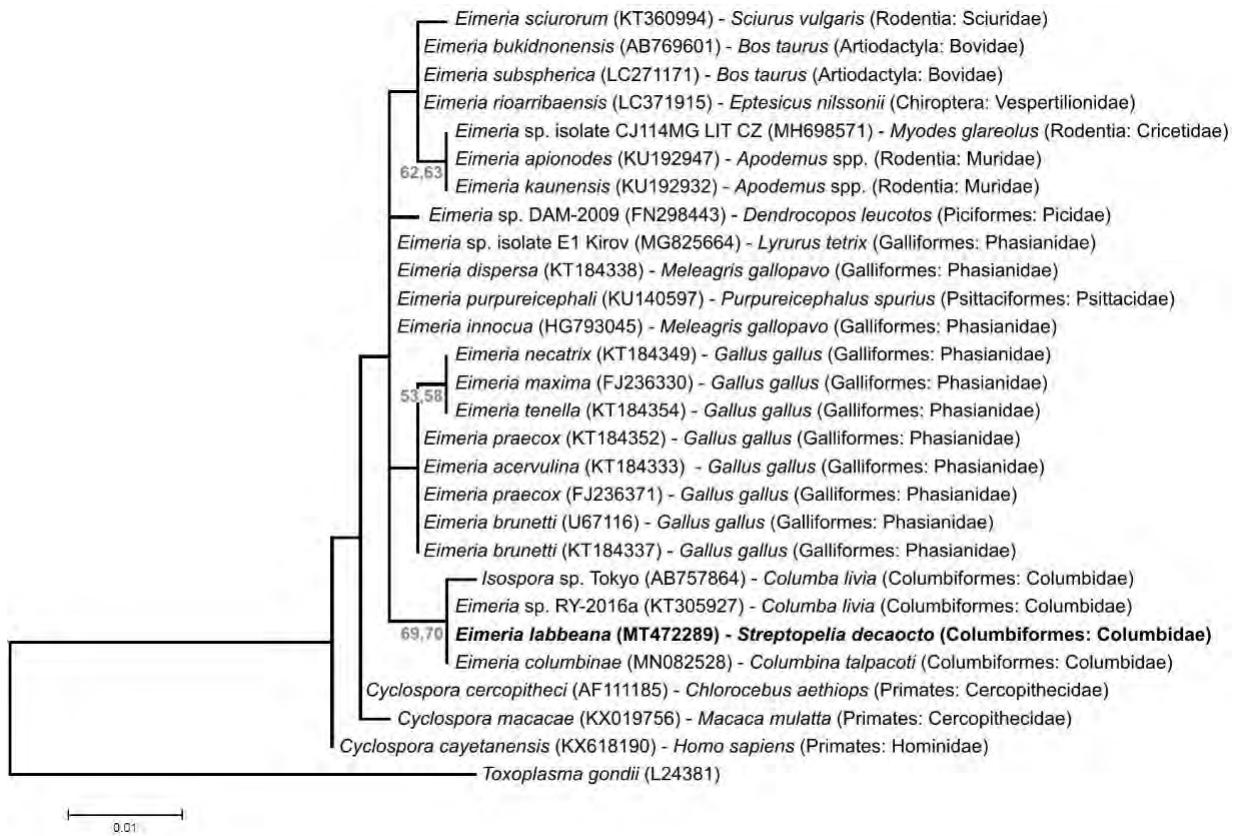


Figura 5: Árvore de máxima verossimilhança estimada a partir das sequências do gene 18S de espécies de coccídios. Os números nos nós representam o suporte de bootstrap de 1000 réplicas (> 50%) para Neighbour-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), respectivamente. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeos por local.

Table 1. Morfologia comparativa de *Eimeria* spp. registrado em Columbiformes do mundo

Coccídio	hospedeiro	Localidade	Referências	Oocistos					Esporocistos									
				forma	comprimento (μm)	Largura (μm)	C/L razão	parede	Resíduo	Micrópila	grânulo polar	Forma	Comprimento (μm)	Largura (μm)	C/L razão	Corpo Stieda	Corpo Substida	Resíduo
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896)	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Índia, Ásia	Pinto [21]	subsférico a ovóide	17–21	16–18	1.0– 1.1	Lisa	ausênte	presente	presente	ovóide	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	presente
			Nieschulz [11]	subsférico a elipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0– 1.1 (1.09)	Lisa	ausênte	ausênte	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausênte	presente
	Pinto, 1928	Portugal, Europa	current study	subsférico a	16–21 (18.5) ^a	14–17 (15.5) ^a	1.0– 1.4 (1.19) ^a	Lisa	ausênte	presente, 1– 3	presente, 1–3	ovóide ou ligeiramente reniforme	11–14 (12.2) ^a	5–7 (5.9) ^a	1.9– 2.3 (2.08) ^a	presente, triangular	ausênte	presente
				a elipsoidal	16–21 (19.0) ^a	14–18 (15.9) ^a	1.0– 1.3 (1.20) ^a											
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Nieschulz [11]	subsférico a ovóide	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0– 1.1 (1.07)	Lisa	ausênte	ausênte	presente	elipsoidal	–	–	–	presente	ausênte	presente
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Mitra and Das Gupta [26]	subsférico a ovóide	(16.4)	(14.4)	–	–	presente	ausênte	–	elipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	presente
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Índia, Ásia	Ray [27]	reniforme a elipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	Lisa com um dente na lateral	ausênte	presente, assimétrico com capuz polar	–	amplamente ovóide	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	presente
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Chatterjee and Ray [28]	subsférico	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	presente, anterior	presente, 1–2	ovóide	8–10	–	–	presente	–	presente, espalhado

<i>Eimeria turturi</i>	<i>Streptopelia turtur</i>	Bulgária, Europa	Golemansky [29]	elipsoidal ou amplamnete ovóide	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	Lisa ~1.5	ausênte	ausênte	ausênte	alongado, elipsoidal	11–13	6–8	–	ausênte	–	presente, espalhado
Golemansky, 1976	(Linnaeus, 1758)																	
<i>Eimeria waiganiensis</i>	<i>Chalcophaps indica</i>	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese [30]	amplamente ovóide	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	Lisa ~1.5	ausênte	presente, 4–6 (5)	presente, 2–4	ovóide	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	presente, proeminente	presente, pequeno	presente, espalhado
Varghese, 1978	(Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)																	
<i>Eimeria duculai</i>	<i>Ducula spilorrhoe</i>	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese [31]	amplamente ovóide	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	Lisa, 1.5–2.5 (2.0)	ausênte	imperceptível	presente, 1, ~2.0	alongado	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	presente, proeminente, cônico	ausênte	presente, compacto, delimitado por membrana
Varghese, 1980	(Gray, 1858)																	
<i>Eimeria gourai</i>	<i>Goura victoria</i>	Papua Nova Guiné, Oceania	Varghese [31]	subsférico	19–22 (20)	18–21 (20)	(1.0)	Lisa, ~1.0	ausênte	ausênte	presente, 1, ~2.0	alongado	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	presente	ausênte	presente, compacto
Varghese, 1980	(Fraser, 1844)																	
<i>Eimeria palumbi</i>	<i>Zenaida galapagoensis</i>	Equador, ilhas Galápagos, América do sul	McQuiston [32]	ovóide a elipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0–1.2 (1.16)	Lisa, ~2.0	presente, grânulos redondos e lascados	ausênte	ausênte	elipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	1.8–2.1 (1.9)	presente, semelhante a mamilo	ausênte	presente, espalhado
McQuiston, 1991	(Gould, 1841)																	
<i>Eimeria curvata</i>	<i>Columbina talpacoti</i>	Brasil, América do Sul	Adriano et al. [33]	ovóide a subsférico	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1–1.3 (1.2)	Lisa, ~1.3	ausente	ausênte	presente	alongado	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0–2.2 (2.1)	presente, proeminente, semelhante a mamilo	ausênte	presente, compacto
Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	(Temminck, 1809); <i>Columbina squammata</i> (Lesson, 1831)																	

<i>Eimeria</i>																		
<i>zenaidae</i>	<i>Zenaida</i>	Brasil,	Adriano et al.	subsférico	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	(1.2)	rude, ~1.7	ausente	ausênte	presente, 1	alongado	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7–1.9 (1.8)	presente, amplo	ausênte	presente, espalhado
Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	<i>auriculata</i> (Murs, 1847)	(Des América do Sul)	[34]															
<i>Eimeria janovyi</i>																		
Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Índia, Ásia	Bandyopadhyay et al. [35]	elipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	Lisa, ~1.1	ausente	ausênte	presente, 1, subsférico	piriforme	(12.1)	(10.1)	(1.2)	presente, amplo, proeminete	ausênte	presente, espalhado
<i>Eimeria livialis</i>																		
Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Arábia, Saudita, Ásia	Alyousif et al. [36]	elipsoidal alongado	19–23 (21)	14–17 (15)	(1.2)	Lisa, 1–1.3 (1.2)	presente, grânulos irregulares	ausênte	ausênte	elipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	pequeno, semelhante a mamilo	ausênte	presente, espalhado
<i>Eimeria columbapalumbi</i>																		
Jamriška and Modrý, 2012	<i>C. palumbus</i>	República Tcheca e Eslováquia, Europa	Jamriška and Modrý [37]	elipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0–1.4 (1.26)	Lisa, 0.6–1.5 (0.9)	ausênte	ausênte	presente, 2 irregular, ~2.0	ovóide alongado, ligeiramente assimétrico	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7–2.2 (1.9)	presente	ausênte	presente, espalhado
<i>Eimeria mauritiensis</i>																		
Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Madagascar, África	Ball et al. [38]	subsférico	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0–1.2 (1.1)	Lisa, ~0.8	ausente	ausênte	ausênte	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	presente	presente	presente
<i>Eimeria lyoni</i>																		
Yabsley, Bailey and Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	EUA, América do Norte	Yabsley et al. [39]	subsférico a ovóide	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1–1.3 (1.2)	Lisa, ~1.0	ausênte	ausênte	presente, 1–2	ovóide	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5–1.9 (1.7)	presente, forma de botão	presente, arredondado	presente, grânulos de ~1.0
<i>Eimeria</i> sp. of																		
Yang et al. (2016)	<i>C. livia</i>	Austrália, Oceania	Yang et al. [22]	subsférico	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	Lisa, ~1.0	presente	ausênte	presente	ovóide alongado	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0–2.2 (2.1)	present	ausênte	presente, compacto
<i>Eimeria columbinae</i>																		
	<i>C. talpacoti</i>	Brasil, América do Sul	Ortúzar-Ferreira et al. [5]	subsférico a elipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0–1.2 (1.11)	Lisa, 1.0–1.2 (1.1)	presente, grânulos Ligados	imperceptível	ausênte	elipsoidal a ligeiramente assimétrico	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6–2.0 (1.77)	present, flattened to	presente, arredondado	presente, espalhado

Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020								e/ou difusos					half-moon- shaped		
<i>Eimeria</i> <i>ferreirai</i>	<i>Leptotila</i> <i>verreauxi</i>	Bonaparte, 1855; <i>Leptotila</i> <i>rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	Brasil, América do Sul	Oliveira et al. [40]	subsférico a elipsoidal	16–21 (18.8)	1.0– 1.4 (1.15)	Lisa, 1.3–1.9 (1.6)	ausênte	presente, com capuz polar quase imperceptível	presente, alongado, em forma de bumerangue	6–8 (6.9)	1.8– 2.2 (1.95)	present, triangular to lozengal	presente, ausênte espalhado

REFERÊNCIAS

- ADRIANO EA, THYSSEN PJ, CORDEIRO NS. **Eimeria curvata n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in Columbina talpacoti and Scardafella squammata (Aves: Columbidae) from Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 95:53–55, 2000.
- ADRIANO EA, THYSSEN PJ, CORDEIRO NS. **A new species of Eimeria from the eared dove Zenaida auriculata (Aves: Columbidae) in Brazil.** Acta Protozool 42:71–73, 2003.
- ALYOUSIF SM, AL-SHAWA RY, AL-ASIRI, SS. **Eimeria livialis sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, Columba livia domestica in Saudi Arabia.** J Egypt SocParasitol 39:383–388, 2009.
- AYRES M, AYRES M, AYRES DL, SANTOS AAS. **BioStat aplicações estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas. Mamirauá: Belém. 380 pp, 2020.**
- BALL SJ, DASZAK P, SWINNERTON KR, JONES CG, SNOW KR. **A new species of Eimeria (Apicomplexa:Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, Nesoenas mayeri (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius.** Afr Zool 47:369–372, 2012.
- BANDYOPADHYAY PK, BHAKTA JN, SHUKLA R. **A new Eimeria species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue rock pigeon Columba livia (Aves: Columbidae).** ZoosPrint J 21:2386–2387, 2006.
- BERTO BP, MCINTOSH D, LOPES CWG. **Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida).** Rev Bras Parasitol Vet 23:1–15, 2014.
- BERTO BP, LOPES CWG. **Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction.** J Parasitol 106:707–713, 2020.
- DOLNIK OV, PALINAUSKAS V, BENSCH S. **Individual oocysts of Isospora (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence.** J Parasitol 95:169–174, 2009.
- DOLNIK OV, DOLNIK VR, BAIRLEIN F. **The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds.** Ardea 98:97–103, 2010.
- DUSZYNSKI D, WILBER P. **A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae.** J Parasitol 83:333–336, 1997.
- DUSZYNSKI D, COUCH, L, UPTON SJ. **The Coccidia of the World.** Available from: <<https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>>. Accessed 23 Apr 2020.
- GENOVEZ-OLIVEIRA JL, OLIVEIRA MS, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, FERREIRA I, BERTO BP. **Morphological and molecular identification of Isospora massardi Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes Turdus spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America.** ParasitolInt 75:102040, 2020.
- CHATTERJEE DK, RAY HN. **On Eimeria kapotei n. sp., from the domestic pigeon, Columba livia intermedia.** Proc 24th Indian Sci Cong 56:512, 1969.
- COUSSEMENT W, MAES L, VANPARIJS O, MARSBOOM R. **Action Of The Anticoccidial Clazuril On The Endogenous Stages Of Eimeria Labbeana And E. Columbarum In Experimentally Infected Pigeons.** Res Vet Sci 45:117–119, 1988.
- DUNCAN S. **The effects of some chemical and physical agents on the oocysts of the pigeon coccidium, Eimeria labbeana (Pinto, 1928).** J Parasitol 45:193–197, 1957).
- GOLEMANSKY V. **Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria.** Acta Protozool 15:399–404. 1976.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 23 Apr 2020

JAMRIŠKA J, MODRÝ D. **A new species of Eimeria Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon Columba palumbus Linnaeus, 1758 (Aves:Columbidae).** Acta Protozool 51:329–333, 2012.

LABBÉ A. **Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur less coccidies.** Arch Zool Exp Gen 24:517–654, 1896.

MARZOUK M, ABDEL-GHAFFAR F, MOSAAD MN. **Effects of infection with Eimeria labbeana on some serum constituents and liver glycogen in the palm dove (Streptopelia senegalensis aegyptiaca),** Parasitol Res 75:183–185, 1989.

MATSUBARA R, FUKUDA Y, MURAKOSHI F, NOMURA O, SUZUKI T, TADA C, NAKAI Y. **Detection and molecular status of Isospora sp. from the domestic pigeon (Columba livia domestica).** Parasitol Int 66:588–592, 2017.

MCQUISTION TE. **Eimeria palumbi, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (Zenaida galapagoensis).** Trans Am Microsc Soc 110:178–181, 1991. MITRA AN, DAS-GUPTA M. **On a species of Eimeria (Coccidia–Sporozoa) from the intestine of a pigeon, Columba intermedia.** Proc 24th Indian Sci Cong 24:291, 1937.

NIESCHULZ O. **Ueber Kokzidien der Haustauben.** Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 134:390–393, 1935.

OLIVEIRA MS, GENOVEZ-OLIVEIRA JL, ORTÚZAR-FERREIRA CN, MARONEZI C, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, BERTO BP. **Eimeria ferreirai n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves Leptotila spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil.** Zootaxa 4821:148–160, 2020.

ORTÚZAR-FERREIRA CN, OLIVEIRA MS, GENOVEZ-OLIVEIRA JL, FRANCO HA, THODE-FILHO S, CARDOZO SV, OLIVEIRA ÁA, LIMA VM, FERREIRA I, BERTO BP. **Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and Eimeria columbinae n. sp. from Columbina talpacoti (Temminck, 1809) from Brazil.** Parasitol Res 119:267–281, 2020.

PINTO C. **Synonymie de quelques especes du genre Eimeria (Eimeridia, Sporozoa).** C R Seances Soc Biol 98:564–1565, 1928.

QUEVEDO CL, ARCAAY-DE-PERAZA L. **Desarrollo de Eimeria labbeana (Labbe, 1896) Pinto, 1928, en la membrana corioalantoidea de embrion de pollo (MCA), bajo la accion de la ciclofosfamida.** Acta Biol Ven 10:255–301, 1980.

RAY DK. **On a new coccidium, Eimeria sphenocercae n. sp., from Sphenocercus sphenurus (Kokla Green pigeon).** J Parasitol 38:546–547, 1952.

SAMPAIO IBM. **Estatística aplicada à experimentação animal.** FEP MVZ Editora: Belo Horizonte. 265pp, 2002.

SICK H. **Ornitologia Brasileira.** Nova Fronteira: Rio de Janeiro. 862 pp, 1997.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol Biol Evol 24:1596–1599, 2007.

VARGHESE T. **Eimeria waiganiensis sp. n. from the Greenwinged Ground dove (Chalcophaps indica Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (Otidiphaps nobilis Gould) in Papua New Guinea.** J Parasitol 64:312–314, 1978.

VARGHESE T. **Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of Eimeria.** Parasitol 80:183–187, 1980.

VERCRUYSSSE J. **Efficacy of toltrazuril and clazuril against experimental infections with Eimeria labbeana and E. columbarum in racing pigeons.** Avian Dis 34:73–79, 1990.

- WILLIAMS RB, THEBO P, MARSHALL RN, MARSHALL JA. **Coccidian oöcysts as type– specimens: long– term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA.** SystParasitol 76:69–76, 2010.
- YABSLEY MJ, BAILEY K, ADAMS HC. **A New Species of Eimeria (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, Zenaida macroura (Columbiformes: Columbidae).** Comp Parasitol 82:231–234, 2015.
- YANG R, BRICE B, ELLIOT A, RYAN U. **Isospora serinuse n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (Serinus canaria forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia.** Exp Parasitol 159:59–66, 2015.
- YANG R, BRICE B, ELLOIT A, RYAN U. **Morphological and molecular characterization of Eimeria labbeana– like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (Columba livia domestica, Gmelin, 1789) in Australia.** Exp Parasitol 166:124–130, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo pode-se observar a grande diversidade de espécies de coccídios no Brasil e no mundo, identificadas novas espécies de coccídios dos gêneros *Eimeria* e *Isospora* além da redescrição de espécies descritas em outras décadas e até mesmo em outros séculos. Ao realizar todas as análises pode-se concluir o quão importante as revisões são para os estudos morfológicos e taxonomicos, trazendo novas informações e muitas das vezes novas características não observadas por outros pesquisadores da época, e na maioria por não existir tecnologias como as atuais. Ao observar e realizar redescrções das espécies pode-se descrever também novos hospedeiros, confirmando a transmissão dos coccídios a nível de família nas aves. Novas localidades também pode ser observado novas localidades das espécies de coccídios, mostrando a relevância nos estudos e conhecimentos de distribuição dos coccídios.

O uso da biologia molecular foi um grande auxílio na descrição taxonômicas, apoiando as validações de espécies, além de fornecer dados para futuros trabalhos com abordagens taxonômicas ou ecológicas.

ANEXOS

Anexo I

***Isospora brasilsatoae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil.**

Anexo II

Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil

Anexo III

***Eimeria ferreirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil**

Anexo IV

Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuistion et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America.

Anexo V

Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal.

Anexo VI

Declaração de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Grande Rio.

Anexo VII

Autorização para atividades com finalidade científica no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)/Ministério do Meio Ambiente (MMA)



Article

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4555.3.12><http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:59FB0170-2168-416F-9810-6678220E3C78>*Isospora brasilsatoae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from BrazilMARIANA S. OLIVEIRA¹, JHON LENNON G. OLIVEIRA¹, MARIANA B. RODRIGUES²,
LIDIANE MARIA SILVA-CARVALHO², LUCAS DE ASSIS S. ANDRADE¹,
SERGIAN V. CARDOZO³, ILDEMAR FERREIRA⁴ & BRUNO PEREIRA BERTO^{4,5}¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil³Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, 25071-202 Duque de Caxias, RJ, Brasil⁴Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil⁵Corresponding author. E-mail: berto.ufrj@gmail.com

Abstract

A new species of coccidia (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) found parasitizing the yellow-legged thrush *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818), the pale-breasted thrush *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 and the creamy-bellied thrush *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 in Southeastern Brazil is described. *Isospora brasilsatoae* n. sp. has oocysts that are ovoidal to pyriform, $26.8 \times 21.1 \mu\text{m}$, with smooth, bilayered wall, $\sim 1.6 \mu\text{m}$ thick. Micropyle present. Oocyst residuum absent, but one to three polar granules are present. Sporocysts are elongate ovoidal, $18.1 \times 10.5 \mu\text{m}$. Stieda body knob-like and sub-Stieda body trapezoidal. Sporocyst residuum is composed of granules that appear to be membrane-bounded. Sporozoites are vermiform with refractile bodies and striations. This is the ninth description of an *Isospora* sp. parasitizing a New World thrush.

Key words: taxonomy, morphology, coccidia, *Isospora*, oocysts, Passeriformes, Turdidae, Itatiaia National Park, Serra dos Órgãos National Park, Guapimirim, Cacaria, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

Brazil has 14% of the biodiversity of the world. The explanation for this biological richness lies in the large number of endemic species, the enormous vegetation cover, the variety of biomes and the immense coastline (Lewinsohn & Prado 2005). Brazil occupies 47.8% of the Neotropical region, being known as the 'country of the birds' for having about a third of all species on the planet, representing almost 57% of the total resident birds of South America. In this sense, Brazil becomes one of the most important countries for investment in bird conservation in the world (Sick 1997; Lewinsohn & Prado 2005; Marini & Garcia 2005).

Among all families of Aves in Brazil, the Turdidae family comprises 20 genera and 180 species, of which 87 are classified in the genus *Turdus* Linnaeus, 1758. *Turdus* spp. are abundant in the Atlantic and Amazon forests, preferably inhabiting humid areas with higher trees on slopes, but also found near the soil feeding on small fruits and insects (Sick 1997; BirdLife International 2016).

Wild birds are hosts of endo- and ectoparasites; however, among all these, coccidian protozoa can be highlighted. Parasitism by coccidians should not affect the health of wild birds in preserved/conserved environments; however, in impacted environments, stress and consequent low immunity make wild birds more susceptible to coccidiosis (Berto & Lopes 2013).

In this context, the current study describes a new species of *Isospora* recovered from yellow-legged thrushes

Turdus flavipes (Vieillot, 1818), pale-breasted thrushes *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 and creamy-bellied thrushes *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 captured in different localities in Southeastern Brazil.

Material and methods

A total of four expeditions were conducted in 3 different localities in southeastern Brazil: (1) Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57"S, 44°36'25"W), a protected area located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO 2018a); (2) a fragmented area of Atlantic Forest in the Municipality of Guapimirim (22°31'10"S, 43°00'36"W), which is located around Parque Nacional da Serra dos Órgãos, another protected area located in the coastal mountain range (Serra do Mar) of the State of Rio de Janeiro (ICMBIO 2018b); and (3) Cacaria (22°42'51"S, 43°50'38"W) at the Municipality of Piraí in the State of the Rio de Janeiro. A total of five *T. flavipes* (four from Parque Nacional do Itatiaia and one from Cacaria), four *T. leucomelas* (two from Parque Nacional do Itatiaia and two from Guapimirim) and one *T. amaurochalinus* (from Cacaria) were captured with mist nets. The birds were kept in individual boxes with clean ground paper. After identification of the species (Sigrist 2014), the bird was photographed and released. A fresh droplet of feces from each individual bird was placed in an individually centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution. Field-collecting permits were issued to B.P. Berto by SISBIO/ICMBio (licenses 42798-1; 45200-1; 49605-1; 54951-1) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). Fecal samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), where they were incubated at room temperature (20–25°C) for one week. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made with the use of an Olympus BX41 binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy) connected to a computer running the software BELView (Version 6.2.3.0, BEL Engineering, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), specifically Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Results

Two *T. flavipes* from the Parque Nacional do Itatiaia, one *T. leucomelas* from Guapimirim and the only *T. amaurochalinus* from Cacaria were positive for an *Isospora* sp. unrecorded in scientific literature.

Isospora brasilsatoae Oliveira and Berto n. sp.

Type host: Yellow-legged thrush *Turdus flavipes* (Vieillot, 1818) (Aves: Passeriformes: Turdidae).

Other hosts: Pale-breasted thrush *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 (Aves: Passeriformes: Turdidae); creamy-bellied thrush *Turdus amaurochalinus* Cabanis, 1850 (Aves: Passeriformes: Turdidae).

Type locality: Parque Nacional do Itatiaia (22°26'57"S, 44°36'25"W), Southeastern Brazil.

Other localities: Cacaria (22°42'51"S, 43°50'38"W) and Guapimirim (22°31'10"S, 43°00'36"W), also from Southeastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oocysts recovered from *T. flavipes* in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution (Williams et al. 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2018007. Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number P-90/2018. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 2012), details of the new species have been submitted

to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *Isospora brasilsatoae* is urn:lsid:zoobank.org:act:6C3FEE82-FC9C-4A58-8C17-1713532F03F3.

Site of infection: Unknown.

Prevalence: Four of 10 (40%).

Sporulation: Exogenous. All oocysts were passed in the feces unsporulated and were fully sporulated by day 7 in $K_2Cr_2O_7$ solution at room temperature (20–25°C).

Etymology: The specific name is derived from the family name of a Brazilian parasitologist Dr Marília de Carvalho Brasil Sato, given in her honor for her contribution to the study of taxonomy and ecology of parasites.

Description (Figs 1; 2A-C)

Oocyst (n = 15) ovoidal to pyriform, 25-30 × 19-23 (26.8 × 21.1); length/width (L/W) ratio 1.2-1.4 (1.27). Wall bi-layered, delicate, 1.4-1.8 (1.6) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle present, without micropyle cap, wrinkles or invagination of the in inner layer perceptible. Oocyst residuum absent, but 1 to 3 rounded polar granules are present. Sporocyst elongate ovoidal with tapered anterior end (where it is Stieda/sub-Stieda complex), 17-19 × 10-11 (18.1 × 10.5); L/W ratio 1.6-1.9 (1.72). Stieda body present, knob-like, 2.0 high × 2.0 wide. Sub-Stieda body present, trapezoidal, 1.5 high × 3.5 wide. Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, as a distinctly sub-spherical body consisting of numerous small granules that appear to be membrane-bounded, 6–9 (7.5). Sporozoites vermiform, with anterior and posterior refractile bodies and striations.

Remarks: *Isospora brasilsatoae* is different from other coccidian species of Turdidae of the New World on several aspects (Table 1). It is the only one to have a pyriform shape of the oocysts. It has a micropyle, which is a characteristic present only in the oocysts of *Isospora albicollis* Lainson and Shaw, 1989, *Isospora sabiai* Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes and Berto, 2017 and *Isospora machadoae* Pinho, Silva, Rodrigues, Lopes, Oliveira, Luz, Ferreira, Lopes and Berto, 2018 (Lainson & Shaw 1989; Pinho et al. 2017a; 2017b; 2018). From these three, but also from the others, *I. brasilsatoae* can be easily differentiated by having up to three rounded polar granules, sporocysts elongate ovoidal (L/W ratio > 1.6), sub-Stieda body trapezoidal, and compact residuum.

Discussion

Turdus spp. captured in the current study belonged to forest species, which have similar feeding habits, such as eating invertebrates in moist soil and feeding on fruits and berries (Vogel et al. 2014). Thus, the thrushes in the anthropogenic environments may have altered their habits and they had a greater energy expenditure in the adaptation to the different environment, predisposing them to transmissions and infections (Giraudeau et al. 2014). In addition, studies such as de Souza et al. (1992) emphasize that forest environments present smaller birds with predominantly frugivorous feeding habits, which tend to have higher prevalence and densities of coccidia. Despite this, the fecal samples recovered from the thrushes of the current study were not excessively dense, and the birds were apparently healthy, demonstrating that these birds did not suffer from coccidiosis, even in anthropogenic environments.

The coccidian parasites of the host family Turdidae in the New World integrate one of the few groups of coccidia to be well characterized and differentiated in the ‘World of Coccidia’. From the works of McQuiston & Holmes (1988) and Lainson & Shaw (1989) to the most recent works in the 21st century, coccidian species in this host family have been described accurately and in great detail. In this sense, species hardly identified as *I. sabiai*, which required many observations and morphometric evaluations for their characterization (Pinho et al. 2017b), even species with prominent characteristics such as *I. albicollis* and *I. machadoae* are well differentiated (Lainson & Shaw 1989; Pinho et al. 2018), as shown in Table 1.

Isospora brasilsatoae is an example of a coccidian species with very prominent characteristics, which considerably facilitate its identification. In addition to the large size, the pyriform shape that is observed in the great majority of its oocysts, added to the very elongated sporocyst with its tapered end (where it is Stieda/sub-Stieda complex), allow the identification of *I. brasilsatoae* with accuracy.

Finally, the comparison of *I. brasilsatoae* with *Isospora* spp. described from the host family Turdidae in the New World (Table 1) clearly supports the designation as a unique species. Therefore, *I. brasilsatoae* is considered as new to science, being the ninth description in a New World thrush.

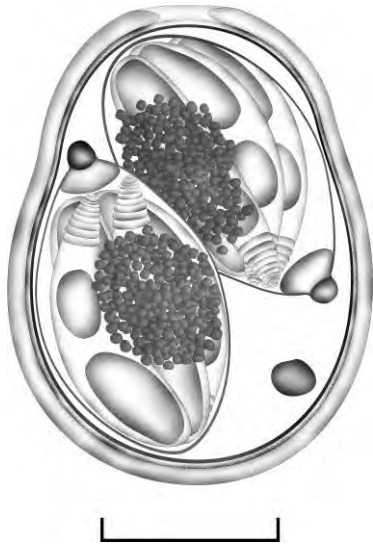


FIGURE 1. Line drawing of the sporulated oocyst of *Isospora brasilsatoae* n. sp, a new coccidium species recovered from the yellow-legged thrush *Turdus flavipes*, the pale-breasted thrush *Turdus leucomelas* and the creamy-bellied thrush *Turdus amaurochalinus*. Scale-bar: 10 μ m.

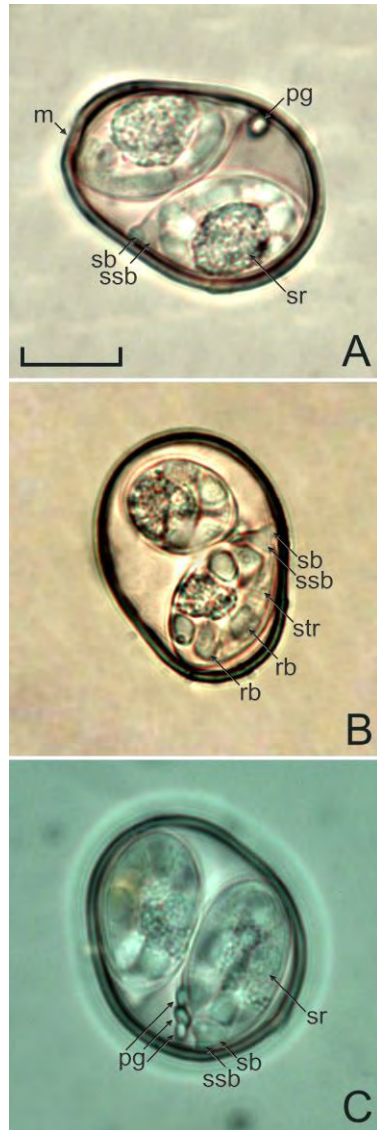


FIGURE 2. Photomicrographs (A-C) of sporulated oocysts of *Isospora brasilsatoae* n. sp, a new coccidium species recovered from the yellow-legged thrush *Turdus flavipes* (A), the pale-breasted thrush *Turdus leucomelas* (B) and the creamy-bellied thrush *Turdus amaurochalinus* (C). Note the micropyle (m), polar granule (pg), Stieda body (sb), sub-Stieda body (ssb), sporocyst residuum (sr), striations (str) and the refractile body (rb). Scale-bar: 10 μ m.

TABLE 1. Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from Turdidae of the New World

Coccidia	Hosts	References	Oocysts							Sporocysts						
			Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Micropyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Isoospora phaeornis</i> Levine, Van Riper and Van Riper, 1980	<i>Myadestes obscurus</i> (Gmelin, 1789)	Levine et al. (1980)	ellipsoidal	25–28 (27)	18–20 (19)	–	smooth	absent	present	ovoidal	15–18 (16)	10–11 (11)	–	present	present	compact
<i>Isoospora robini</i> McQuiston and Holmes, 1988	<i>Turdus migratorius</i> Linnaeus, 1766	McQuiston & Holmes (1988)	ellipsoidal or ovoid	20–28 (23)	16–22 (20)	– (1.2)	smooth	absent	present	ovoid	10–17 (13.8)	7–12 (9.0)	– (1.5)	nipple-like	prominent	compact
<i>Isoospora tucuruensis</i> Lainson and Shaw, 1989	<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	Lainson & Shaw (1989)	sub-spherical	15–19 (17.3)	14–19 (17.1)	–	smooth	absent	present, single, ~ 3 × 2	ellipsoidal	10–13 (11.8)	7–10 (8.4)	–	nipple-like	wide, 0.5 × 1.5	diffuse or compact
<i>Isoospora albicollis</i> Lainson and Shaw, 1989	<i>T. albicollis</i>	Lainson & Shaw (1989)	ovoidal	22–27 (24.5)	19–24 (20.3)	–	smooth	present	present, single, ~ 2.5 × 2	ellipsoidal	12–15 (16.0)	8–10 (11.2)	–	nipple-like to bubble-shaped	wide, 1.0 × 4	diffuse or compact
<i>I. albicollis</i>	<i>T. albicollis</i> ; <i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	Pinho et al. (2017a)	ovoidal	23–26 (24.4)	18–22 (19.7)	1.2–1.4 (1.24)	smooth	present	present, single	ellipsoidal	14–17 (15.4)	9–11 (10.1)	1.5–1.6 (1.52)	knob-like to rounded, 1.7 × 1.3	wide, 1.5 × 3.1	diffuse or compact
<i>Isoospora zorzali</i> Keeler, Yabsley, Gibbs, McGraw and Hernandez, 2012	<i>Catharus aurantiirostris</i> (Hartlaub, 1850)	Keeler et al. (2012)	round to slightly ovoid	16–24 (19.7)	15–21 (18.6)	(1.1)	smooth	absent	present, 1 to 2	ovoidal	11–18 (14.5)	7–11 (8.5)	(1.7)	nipple-like	absent	diffuse or compact
<i>Isoospora massardi</i> Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira and Lopes, 2014	<i>T. albicollis</i>	Lopes et al. (2014)	sub-spherical	15–21 (18.6)	14–19 (17.7)	1.0–1.1 (1.1)	smooth	absent	present, 2 ellipsoidal granules, 1.5 × 0.5	ovoidal	13–16 (14.8)	8–11 (9.3)	1.4–1.8 (1.6)	knob-like to rounded, 1 × 2	rounded, 1.5 × 3.5	diffuse
<i>Isoospora sabiai</i> Pinho, Rodrigues, Silva, Lopes, Oliveira, Ferreira, Cardozo, Luz, Ferreira, Lopes and Berto, 2017	<i>T. albicollis</i> ; <i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818; <i>T. leucomelas</i> ; <i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	Pinho et al. (2017b)	sub-spherical to ellipsoidal	17–27 (20.9)	15–24 (18.6)	1.0–1.4 (1.12)	1.0–1.4 (1.12)	present, inconspicuous or imperceptible	present, splinter-like or comma-shaped granules	elongate ellipsoidal to reniform	14–22 (16.5)	7–12 (9.2)	1.5–2.1 (1.8)	present, knob-like, 0.5 × 2.0	present, rounded to conical, 1.0 × 2.0	compact
<i>Isoospora machadoae</i> Pinho, Silva, Rodrigues, Lopes, Oliveira, Luz, Ferreira, Lopes and Berto, 2018	<i>T. albicollis</i>	Pinho et al. (2018)	sub-spherical	21–24 (22.2)	20–23 (21.2)	1.0–1.2 (1.1)	rough	present	present, 1 to 2, sub-spherical and robust	ellipsoidal	12–14 (13.3)	9–11 (9.7)	1.2–1.5 (1.4)	flattened to half-moon-shaped, 0.5 × 1.5	rounded, 1.5 × 2.5	diffuse
<i>Isoospora brasilsatoae</i> Oliveira and Berto n. sp.	<i>T. flavipes</i> ; <i>T. leucomelas</i> ; <i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	current work	ovoidal to piriform	25–30 (26.8)	19–23 (21.1)	1.2–1.4 (1.27)	smooth	present	present, 1 to 3, rounded	elongate ovoidal	17–19 (18.1)	10–11 (10.5)	1.6–1.9 (1.72)	knob-like, 2.0 × 2.0	trapezoidal, 1.5 × 3.5	compact

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento; the owner of a country house in the condominium 'Parque das Águas' in the Municipality of Guapimirim, RJ; and the landowner at Cacaria in the Municipality of Pirai, RJ, that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.


References

- Berto, B.P. & Lopes, C.W.G. (2013) Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. *In*: Ruiz, L. & Iglesias, F. (Eds.), *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, pp. 47–66.
- Berto, B.P., McIntosh, D. & Lopes, C.W.G. (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23 (1), 1–15.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- BirdLife International (2016) Data Zone. Available from: <http://datazone.birdlife.org/> (accessed 25 September 2018)
- Duszynski, D.W. & Wilber, P. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of parasitology*, 83 (2), 333–336.
<https://doi.org/10.2307/3284470>
- Giraudeau, M., Mousel, M., Earl, S. & McGraw, K. (2014) Parasites in the city: degree of urbanization predicts poxvirus and coccidian infections in house finches (*Haemorhous mexicanus*). *PLoS ONE*, 9 (2), e86747.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086747>
- ICMBIO (2018a) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia> (accessed 25 September 2018)
- ICMBIO (2018b) Parque Nacional Serra dos Órgãos. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos> (accessed 25 September 2018)
- ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys*, 219, 1–10.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.219.3994>
- Keeler, S.P., Yabsley, M.J., Gibbs, S.E., McGraw, S.N. & Hernandez, S.M. (2012) A new *Isoospora* species of passerines in the family Turdidae from Costa Rica. *Journal of Parasitology*, 98 (1), 167–169.
<https://doi.org/10.1645/GE-2721.1>
- Lainson, R. & Shaw, J.J. (1989) Two new species of *Eimeria* and three new species of *Isoospora* (Apicomplexa, Eimeriidae) from Brazilian mammals and birds. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 11 (2), 349–365.
- Lopes, B.B., Berto, B.P., Luz, H.R., Galvão, G.S., Ferreira, I. & Lopes, C.W.G. (2014) *Isoospora massardi* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Acta Parasitologica*, 59 (2), 272–275.
<https://doi.org/10.2478/s11686-014-0240-4>
- Levine, N.D., Van Riper, S. & Van Riper, C. (1980) Five new species of *Isoospora* from Hawaiian Birds. *Journal of Protozoology*, 27 (3), 258–259.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04250.x>
- Lewinsohn, T.M. & Prado, P.I. (2005) How many species are there in Brazil?. *Conservation Biology*, 19 (3), 619–624.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00680.x>
- Marini, M.A. & Garcia, F.I. (2005) Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade*, 1 (1), 95–102.
- McQuiston, T.E. & Holmes, B.B. (1988) *Isoospora robini* sp. n., a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the American robin (*Turdus migratorius*). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55 (2), 324–325.
- Pinho, I.F.D., Silva, L.M.D., Rodrigues, M.B., Oliveira, M.D.S., Lopes, B.B., Luz, H.R., Ferreira, I., Lopes, C.W.G. & Berto, B.P. (2017a) *Isoospora albicollis* (Apicomplexa: Eimeriidae) in thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae), in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26 (2), 231–234.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612017006>
- Pinho, I.F., Rodrigues, M.B., Silva, L.M., Lopes, B.B., Oliveira, M.S., Ferreira, M.A., Cardozo, S.V., Luz, H.R., Ferreira, I., Lopes, C.W.G. & Berto, B.P. (2017b) Characterization and distribution of *Isoospora sabiai* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) from Brazil. *Journal of Parasitology*, 103 (3), 285–291.
<https://doi.org/10.1645/16-152>
- Pinho, I.F.D., Silva, L.M.D., Rodrigues, M.B., Lopes, B.B., Oliveira, M.S., Luz, H.R., Ferreira, I., Lopes, C.W.G. & Berto, B.P. (2018) *Isoospora machadoae* sp. nov. (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian species from white-necked

- thrushes *Turdus albicollis* (Passeriformes: Turdidae) of South America. *Zoologia*, 35, e24570.
<https://doi.org/10.3897/zoologia.35.e24570>
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp.
- Sigrist, T. (2014) *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. Avis Brasilis, São Paulo, 608 pp.
- Souza, F.D., De Roma, J.C. & Guix, J.C. (1992) Consumption of *Didymopanax pachycarpum* unripe fruits by birds in southeastern Brazil. *Miscellanea Zoológica*, 16, 246–248.
- Vogel, H.F., Metri, R. & Zawadzki, C.H. (2014) Comunidade e partilha ecológica de turdídeos (Aves: Passeriformes) em um fragmento urbano de floresta com araucárias em Guarapuava no Sul do Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 17 (2), 151–152.
<https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i2.2014.4934>
- Williams, R.B., Thebo, P., Marshall, R.N. & Marshall, J.A. (2010) Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, 76 (1), 69–76.
<https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>



Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira¹ · Mariana S. Oliveira² · Jhon Lennon Genovez-Oliveira² · Heider A. Franco³ · Sergio Thode-Filho^{3,4} · Sergian V. Cardozo⁵ · Águida A. Oliveira⁶ · Viviane M. Lima⁶ · Ildemar Ferreira⁶ · Bruno P. Berto⁶ 

Received: 30 July 2019 / Accepted: 15 October 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Coccidia (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) of columbiform birds (Aves: Columbiformes) have been described since the end of the nineteenth century; however, some of these descriptions were poorly detailed or inconclusive. In this sense, the current work makes a detailed taxonomic revision reconsidering and organizing 18 *Eimeria* spp. and two *Isospora* spp. previously described or reported of Columbiformes. Along with this, a new species of *Eimeria* is morphologically and molecularly identified by the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene and by the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene from the ruddy ground-dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) in the Médio Paraíba region of the State of Rio de Janeiro, south-eastern Brazil. *Eimeria columbinae* n. sp. has subspheroidal oocysts, $14.7 \times 13.2 \mu\text{m}$, with smooth, bi-layered wall, $\sim 1.1 \mu\text{m}$ length/width ratio of 1.1. Micropyle and oocyst residuum are present, but polar granule is absent. Sporocysts are ellipsoidal to slightly asymmetrical, $9.0 \times 5.1 \mu\text{m}$, with both Stieda and sub-Stieda bodies. Sporocyst residuum present and sporozoites with refractile body and nucleus. This is the 19th description of an eimerian from Columbiformes in the World, and the second to have a molecular identification of the COI and 18S genes.

Keywords Taxonomy · Morphology · Sequencing · Coccidia · Oocysts · Columbidae · Médio Paraíba Region · Rio de Janeiro · Brazil

Section Editor: Larissa Howe

* Bruno P. Berto
berto.ufrj@gmail.com

- ¹ Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil
- ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil
- ³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rua José Breves 550, Pinheiral, RJ 27197-000, Brazil
- ⁴ Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil
- ⁵ Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brazil
- ⁶ Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

Introduction

The order Columbiformes brings together a total of 367 species in only one family: the Columbidae (IUCN 2019). These species have a worldwide distribution with 23 species occurring in Brazilian territory (Piacentini et al. 2015). Considered a synanthropic species, the ruddy ground-dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) is quite abundant in urban centers or anthropized regions. It is completely adapted to urban areas, similarly to the common pigeon *Columba livia* Gmelin, 1789, being found in large vertical buildings, squares, and houses, where they forage for food. It was one of the first species of Brazilian birds to adapt to the urban environment, and presently, it is observed in larger numbers in urban areas than in its original habitat (Sick 1997).

The columbiform birds are sometimes reported to have a high rate of parasitism with many diverse parasite types, including coccidia. Coccidia are obligate intracellular parasitic protozoa related to the intestinal parasites of the most diverse groups of animals (Berto et al. 2014). The

specific identification of the coccidians is based on the morphology of the sporulated oocyst, and complemented by approaches that include quantification of oocysts (oocysts per gram of feces or per fecal drop), infection sites, host specificity, ecological aspects, genotyping of specific genes, etc. (Duszynski and Wilber 1997; Tenter et al. 2002; Berto et al. 2011).

The genus *Eimeria* Schneider, 1875 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae), is often found in Columbiformes, although two *Isoospora* spp. has also been reported from this order (Varghese 1978a; Jamriška and Modrý 2012; Matsubara et al. 2017). These descriptions date from the end of the nineteenth century; however, some of these were poorly detailed or inconclusive, resulting in a current difficulty in identifying species based on the original descriptions. In this sense, the current work makes a detailed taxonomic revision reconsidering and organizing the eimeriid species previously described of Columbiformes. Along with this, a new species of *Eimeria* is morphologically and molecularly identified by the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene and by the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene from the ruddy ground-dove *C. talpacoti* in the Médio Paraíba region of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil.

Materials and methods

Sample collection

Six expeditions were conducted in two different localities in the Médio Paraíba Region of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The first expedition occurred on July 2018 in a rural area at the District of Santa Rita de Cássia in the Municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro (27°29'48" S, 44°09'45" W), which is a climax ecological community. The last five expeditions were conducted on August, September, October, and November 2018, and January 2019, on the campus of the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, in the Municipality of Pinheiral, State of Rio de Janeiro (22°31'37" S, 43°59'45" W), which is a community in secondary succession in process of reforestation. Mist nets were used for the capture of the birds. A total of four ruddy ground-doves *C. talpacoti* were captured (one from Barra Mansa and three from Pinheiral). The captured birds were specifically identified (Sigrist 2014) and photographed. Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of feces from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution.

Morphological analyses

Samples were transported to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated in the centrifuge tubes and regularly oxygenated by shaking, at room temperature (~ 25 °C) for 10 days or until ~ 70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (specific gravity 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses. The higher level classification used in the taxonomy of the current work followed Ruggiero et al. (2015), which was recently published and has been widely accepted.

Molecular analyses

An individual oocyst identified with the characteristic features of the new species under light microscopy was isolated and resuspended in PBS (Dolnik et al. 2009). DNA was extracted from the oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) (1×), 0.25 µL of each primer (0.2 µM), 3 µL of DNA (for primary reaction) or 3 µL of primary PCR product (for the secondary reaction) and 9 µL of Nuclease Free Water. Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). The PCR amplification for the 18S gene was carried out with the

primers 5′CAGGCTTGTCGCCCTGAATA-3′ and 5′-CTGG ACCTGGTGAGTTTCCC-3′, which produce a PCR product of 444 bp in size. These primers were drawn from sequences of *Isoospora* spp. available on the GenBank database. The PCR reaction contained 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) (1×), 0.25 µL of each primer (0.2 µM), 3 µL of DNA, and 9 µL of Nuclease Free Water. PCR cycling conditions were 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s and a final extension of 72 °C for 5 min.

DNA sequence analyses

All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, using an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared to each other and with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for coccidian species at the COI and 18S sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura et al. 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) methods, and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

Description of the new species

Four *C. talpacoti* were captured, but only one bird was positive for coccidia. The observed oocysts were characteristic of *Eimeria*; however, they did not share the same characteristics with any *Eimeria* sp. previously reported from Columbiformes (Figs. 1, 2, and 3; Table 1). Therefore, this new species is described as follows:

Eimeria columbinae n. sp. Ortúzar-Ferreira and Berto n. sp. (Fig. 4A-E)

Kingdom: Chromista Cavalier-Smith, 1981

Phylum: Miozoa Cavalier-Smith, 1987

Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970

Class: Coccidiomorpha Doflein, 1901

Subclass: Coccidia Leuckart, 1879

Family: Eimeriidae Minchin, 1903

Genus: *Eimeria* Schneider, 1875

Oocyst ($n = 20$) subspheroidal to ellipsoidal, 13-16 × 12-14 (14.7 × 13.2); length/width (L/W) ratio 1.0-1.2 (1.11). Wall bi-layered, 1.0-1.2 (1.1 µm) thick, outer layer smooth, $c. 2/3$ of total thickness. Micropyle inconspicuous, but perceptible where there is an invagination of the inner layer, 3.0-4.5 (3.8) wide. Oocyst residuum present, consisting of granules partially bound and/or diffused among the sporocysts, which appear to be membrane-bound. Polar granule absent. Sporocyst ellipsoidal to slightly asymmetrical, 8-10 × 5-6 (9.0 × 5.1); L/W ratio 1.6-2.0 (1.77). Stieda body present, flattened to half-moon-shaped, 0.2 high × 1.0 wide. Sub-Stieda body present, rounded, 0.6 high × 1.3 wide. Para-Stieda body absent. Sporocyst residuum present, consisting of numerous spherules of different sizes. Sporozoites vermiform, with a posterior refractile body and a central nucleus.

Taxonomic summary

Type host: *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) (Aves: Columbiformes: Columbidae), ruddy ground-dove.

Type locality: District of Santa Rita de Cássia (27°29′48″ S, 44°09′45″ W), Municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oocysts recovered from *C. talpacoti* in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution (Williams et al. 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2019015. Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number P-93/2019. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

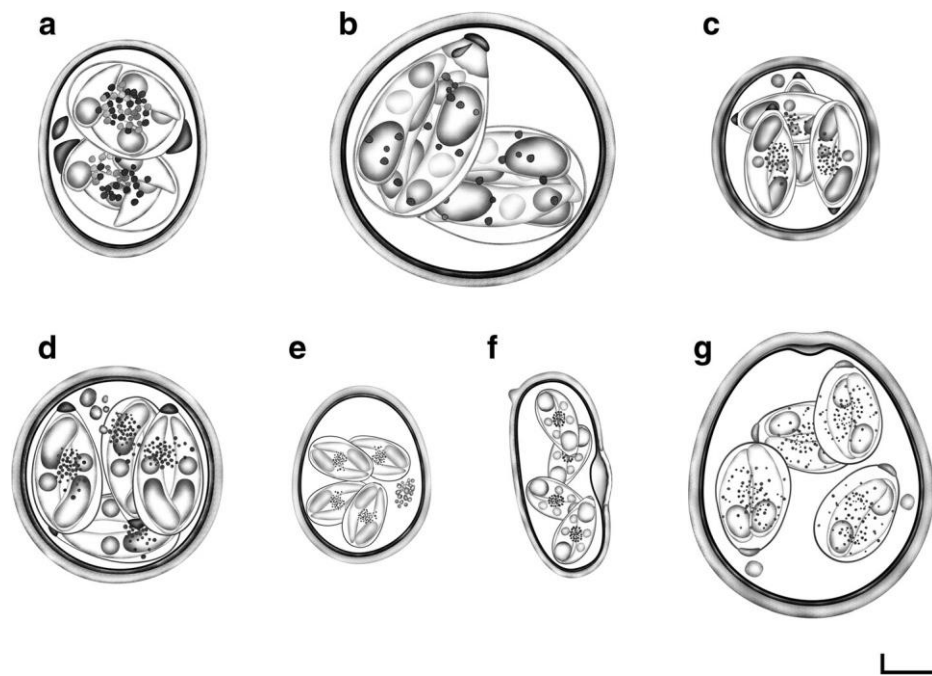
Representative DNA sequence: DNA amplification of the COI and 18S genes showed clear bands around ~ 250 bp and ~ 400 bp, respectively. Representative COI and 18S sequences were deposited in the GenBank database under the respective accession numbers MN088854 and MN082528.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 2012), details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *Eimeria columbinae* n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:D861188C-D367-444E-87E7-64586EB5F2CA

Site of infection: Unknown.

Prevalence: 1 of 4 (25%).

Fig. 1 Line drawings of sporulated oocysts of Eimeriidae species recorded from Columbiformes. *Isoospora gallicolumbae* (A). *Isoospora* sp. of Matsubara et al. (2017) (B). *Eimeria labbeana* (C). *Eimeria columbarum* (D). *Eimeria columbae* (E). *Eimeria sphenocercae* (F). *Eimeria kapotei* (G). All to same scale. Scale bar 10 μ m



Sporulation: Exogenous. All oocysts were passed in the feces unsporulated and were fully sporulated by day 4 in $K_2Cr_2O_7$ solution at room temperature (20–25 $^{\circ}C$).

Etymology: The specific epithet is derived from the generic name of the type host.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis included sequences from coccidians available in GenBank (Figs. 5 and 6). *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) was used as the outgroup. In

the phylogenetic analysis based on the COI gene (Fig. 5), *E. columbinae* n. sp. sat in a clade with the similarity of 98.5% with an *Isoospora* sp. recovered from the snow bunting *Plectrophenax nivalis* (Linnaeus, 1758) in the Czech Republic (Trefanová et al. 2019). Other *Isoospora* spp. from birds of the Old World, but also from the New World, as *Isoospora sporophila* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro and Lopes 2005 from *Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869) in Brazil (Rodrigues et al. 2019), sat in neighboring clades. The similarity in comparison with *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) was 95%. This isolate is the only *Eimeria* sp. from

Fig. 2 Line drawings of sporulated oocysts of Eimeriidae species recorded from Columbiformes. *Eimeria turturi* (A). *Eimeria waiganiensis* (B). *Eimeria duculai* (C). *Eimeria gourai* (D). *Eimeria palumbi* (E). *Eimeria curvata* (F). *Eimeria zenaidae* (G). All to same scale. Scale bar 10 μ m

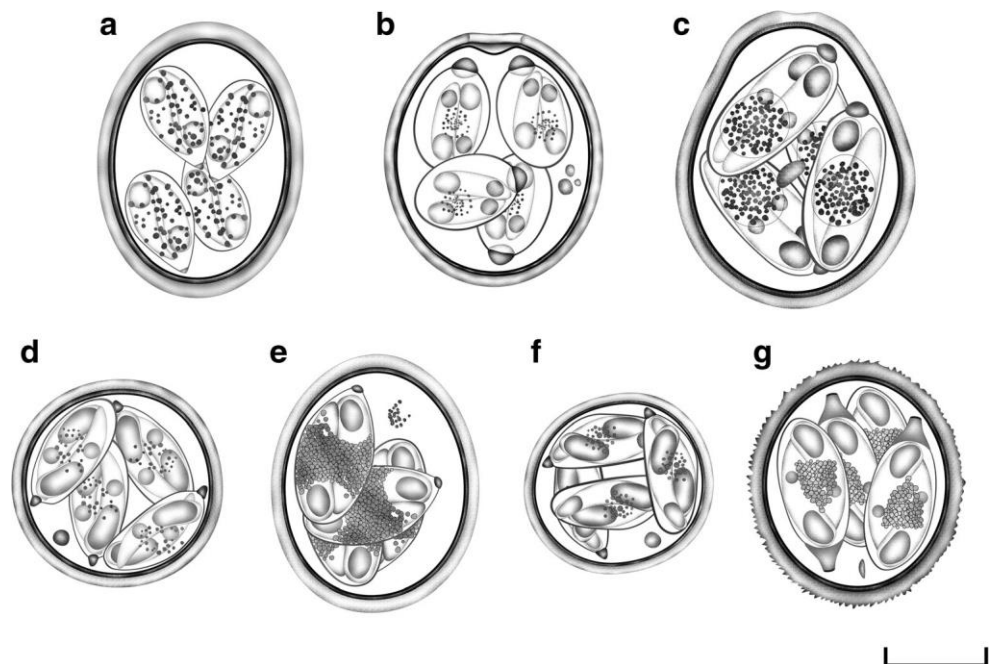
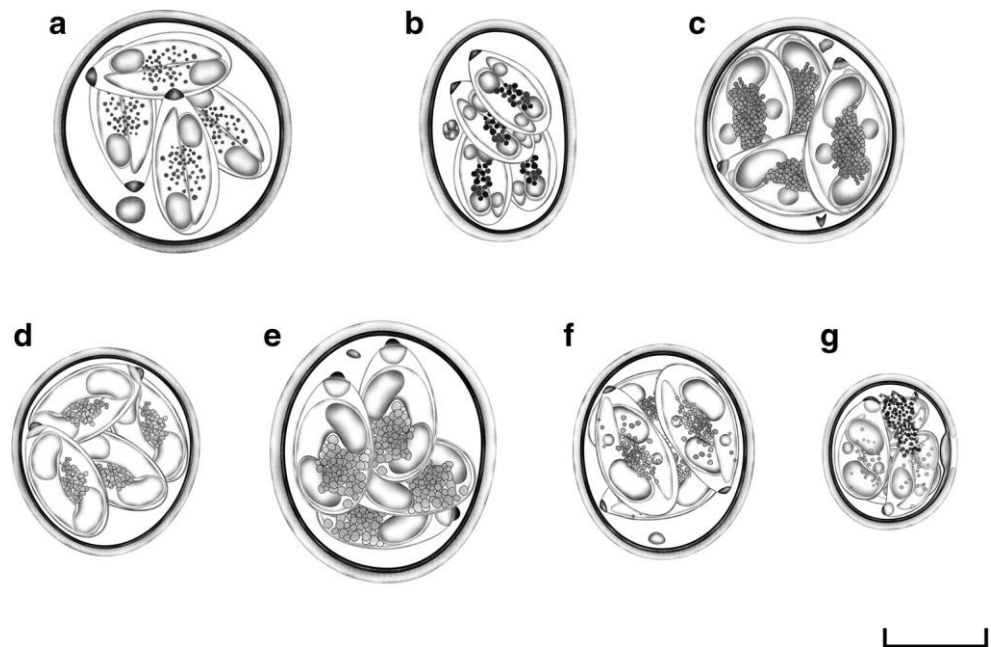


Fig. 3 Line drawings of sporulated oocysts of Eimeriidae species recorded from Columbiformes. *Eimeria janovyi* (A). *Eimeria livialis* (B). *Eimeria columbapalumbi* (C). *Eimeria mauritiensis* (D). *Eimeria lyoni* (E). *Eimeria* sp. (F). *Eimeria columbinae* n. sp. (G). All to same scale. Scale bar 10 μ m



Columbiformes with COI sequence deposited in the GenBank; however, this species sat in a clade distant of *E. columbinae* n. sp. in this phylogenetic analysis. In the 18S based phylogenetic analysis (Fig. 6), *E. columbinae* n. sp. sat in a clade composed of all coccidians from Columbiformes deposited in the GenBank, with the similarity of 100% with *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016). Neighboring clades were composed of *Eimeria* spp. from non-columbiform birds, such as parrots, turkeys, and chickens, with a similarity of ~ 99.5%; and by *Cyclospora* spp. and *Eimeria* spp. from mammals, such as primates, bats, rodents, and ruminants, with a similarity of ~ 99.3%.

Discussion

Taxonomic revision of eimeriid species of Columbiformes and their comparisons with *E. columbinae* n. sp.

As evidenced in studies on coccidian taxonomy, there seems to be a specificity at the family level in the coccidian parasitism of the class Aves, mainly in the order Passeriformes (Duszynski and Wilber 1997; Berto et al. 2011). In fact, this is not problematic in the current study, since the order Columbiformes has only one family: Columbidae. Therefore, it would be highly unlikely that there would be a cross-transmission of coccidians between birds of different orders, in this case, a coccidian from a non-columbiform infects a columbiform bird.

In this context, *Eimeria columbinae* n. sp. was compared in detail with coccidian species that parasitize birds belonging to

Columbiformes (Figs. 1, 2, and 3; Table 1). To date, there are 20 Eimeriidae species reported from the family Columbidae, being 18 *Eimeria* spp. and two *Isospora* spp.

Isospora gallicolumbae Varghese (Fig. 1A), was described from the western bronze ground-dove *Alopecoenas beccarii* (Salvadori, 1876) in Papua, New Guinea (Varghese 1978a). Doubts arise as to the validity of this species due to the atypical parasitism of *Isospora* spp. out of the passerine birds. These doubts are favored after the latest reports of pseudoparasitism of *Isospora* spp. in rodents and other animals that ingest feces of passerines and shed isosporan oocysts as pseudoparasites in their feces (Trefancová et al. 2019). In addition, Varghese (1978a) did not detail the morphology of this species nor did it present photomicrographs, although this author observed and measured 50 oocysts. In this sense, it would be important that this species was re-examined for validation and for its morphology, and other biological, ecological, and molecular characteristics be complemented.

Recently, Matsubara et al. (2017) reported an *Isospora* sp. (Fig. 1B) from domestic pigeons *C. livia* in Japan, becoming the second report of an *Isospora* sp. from Columbiformes in the scientific literature. Matsubara et al. (2017) presented a photomicrograph, a line drawing and a reasonable morphological description of the oocysts, as well as the molecular identification of the 18S and 28S large subunit ribosomal RNA (28S) genes. The low number of oocysts observed and a poorly detailed morphology may have prevented the naming of a new species, since this *Isospora* sp. was not taxonomically named in this work. It is noteworthy that the photomicrography presented in Matsubara et al. (2017) clearly shows, even if unfocused, an inclusion in the sub-Stieda body, which is a common feature in *Isospora* spp. of sparrows, but

Table 1 Comparative morphology of Eimeriidae species recorded from Columbiformes of the World

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts					
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum
<i>Isoospora gallicolumbae</i> Varghese, 1978	<i>Alopecoenas beccarii</i> (Salvadori, 1876)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	Ellipsoidal	18-21 (20.0)	15-17 (16.0)	1.1-1.2 (1.2)	Smooth, ~ 0.8	Absent
<i>Isoospora</i> sp. of Matsubara et al. (2017)	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Asia, Japan	Matsubara et al. (2017)	Subspheroidal	24-27 (25.6)	23-26 (24.7)	1.0-1.1	Smooth	Absent
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	<i>C. livia</i>	Asia, India	Pinto (1928)	Subspheroidal to ovoidal	17-21	16-18	1.0-1.1	Smooth	Absent
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Asia, India	Nieschulz (1935)	Subspheroidal to ellipsoidal	15-18 (16.7)	14-16 (15.3)	1.0-1.1 (1.09)	Smooth	Absent
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Asia, India	Mitra and Das Gupta (1937)	Subspheroidal to ovoidal	(16.4)	(14.4)	-	-	Present
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Asia, India	Ray (1952)	Rhiniform to ellipsoidal	17-25 (19.2)	12-15 (12.6)	-	Smooth with a lateral dent	Absent
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Asia, India	Chatterjee and Ray (1969)	Subspheroidal	24-30 (26.1)	22-26 (23.5)	-	-	-
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Bulgaria	Golemansky (1976)	Ellipsoidal or broadly ovoidal	23-29 (26)	18-25 (21.6)	-	Smooth, ~ 1.5	Absent
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	<i>Chalcophaps indica</i> (Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	Broadly ovoidal	22-25 (24)	19-23 (22)	1.1-1.2 (1.1)	Smooth, ~ 1.5	Absent
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	<i>Ducula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Broadly ovoidal	26-31 (28)	23-27 (25)	(1.1)	Smooth, 1.5-2.5 (2.0)	Absent
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Subspheroidal	19-22 (20)	18-21 (20)	(1.0)	Smooth, ~ 1.0	Absent
<i>Eimeria palumbi</i> McQuiston, 1991	<i>Zenaida galapagoensis</i> Gould, 1841	South America Ecuador, Galápagos Islands	McQuiston (1991)	Ovoidal to ellipsoidal	22-27 (24.2)	19-24 (21.7)	1.0-1.2 (1.16)	Smooth, ~ 2.0	Present, round to splinter-like granules
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); <i>Columbina squammata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano et al. (2000)	Ovoidal to ellipsoidal	17-19 (18.3)	15-17 (15.5)	1.1-1.3 (1.2)	Smooth, ~ 1.3	Absent
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	<i>Zenaida auriculata</i> (Des Murs, 1847)	South America, Brazil	Adriano et al. (2003)	Subspheroidal	22-26 (23.8)	19-22 (20.3)	(1.2)	Rough, ~ 1.7	Absent
<i>Eimeria janovyi</i> Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Asia, India	Bandyopadhyay et al. (2006)	Ellipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	Smooth, ~ 1.1	Absent
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Asia, Saudi Arabia	Alyousif et al. (2009)	Elongate ellipsoidal	19- 23 (21)	14-17 (15)	(1.2)	Smooth, 1-1.3 (1.2)	Present, irregular globules

Table 1 (continued)

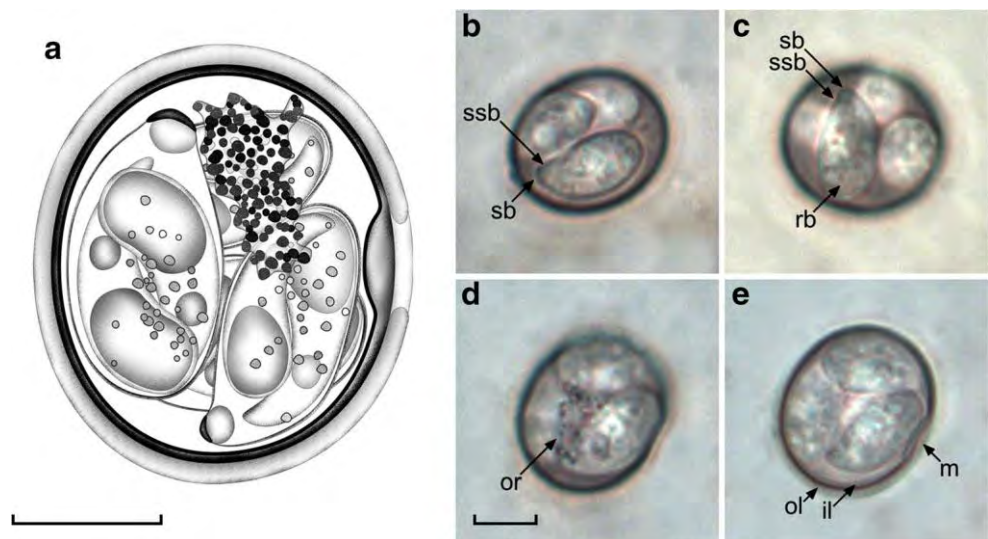
Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts					
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška and Modrý, 2012	<i>Columba palumbus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Czech and Slovak Republics	Jamriška and Modrý (2012)	Ellipsoidal	17-24 (21.3)	15-18 (16.9)	1.0-1.4 (1.26)	Smooth, 0.6-1.5 (0.9)	Absent
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Africa, Madagascar	Ball et al. (2012)	Subspheroidal	18-22 (19.7)	16-19 (17.8)	1.0-1.2 (1.1)	Smooth, ~ 0.8	Absent
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey and Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley et al. (2015)	Subspheroidal to ovoidal	23-26 (24.2)	20-22 (20.7)	1.1-1.3 (1.2)	Smooth, ~ 1.0	Absent
<i>Eimeria</i> sp. of Yang et al. (2016)	<i>C. livia</i>	Oceania, Australia	Yang et al. (2016)	Subspheroidal	19-22 (20.2)	16-19 (16.1)	(1.38)	Smooth, ~ 1.0	Present
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto n. sp.	<i>C. talpacoti</i>	South America, Brazil	Current work	Subspheroidal to elipsoidal	13-16 (14.7)	12-14 (13.2)	1.0-1.2 (1.11)	Smooth, 1.0-1.2 (1.1)	Present, granules bonded and/or dif- fused

Coccidia	Oocysts		Sporocysts						
	Micropyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Isoospora gallicolumbae</i> Varghese, 1978	Absent	Present, 1 ovoidal, ~ 2.5	Ovoidal	10-13 (12.0)	7-9 (8.0)	-	Present, conical	Absent	Present, compacted
<i>Isoospora</i> sp. of Matsubara et al. (2017)	Absent	Absent	Ovoidal	18-21 (19.5)	10-12 (11.2)	1.6-2.0	Present, nipple-like	Present	Present, scattered
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	Present Absent	Present Present	Ovoidal Ellipsoidal	11-14 (12.4) -	5-7 (6.4) -	(1.4) -	- Present	- Absent	Present, compacted Present
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	Absent	Present	Ellipsoidal	-	-	-	Present	Absent	Present
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	Absent	-	Ellipsoidal	(7.2)	(4.8)	-	-	-	Present
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	Present, asymmetrical, with micropyle cap	-	Broadly ovoidal	17-19 (17.5)	12-14 (12.5)	-	-	-	Present
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	Present, anterior	Present, 1-2	Ovoidal	8-10	-	-	Present	-	Present, scattered
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	Absent	Absent	Elongate ellipsoidal	11-13	6-8	-	Absent	-	Present, scattered
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	Present, 4-6 (5)	Present, 2-4	Ovoidal	9-11 (10.0)	6-8 (7.0)	-	Present, prominent	Present, small	Present, scattered
	Inconspicuous	Present, 1, ~ 2.0	Elongate	14-16 (15.5)	6-8 (7.2)	-		Absent	

Table 1 (continued)

Coccidia	Oocysts		Sporocysts						
	Micropyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980							Present, prominent, conical		Present, compacted, membrane-- bounded
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	Absent	Present, 1, ~2.0	Elongate	10-13 (12.0)	4-6 (5.5)	-	Present	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria palumbi</i> McQuiston, 1991	Absent	Absent	Ellipsoidal	15-17 (15.3)	8-9 (8.1)	1.8-2.1 (1.9)	Present, nipple-like	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	Absent	Present	Elongate	11-13 (12.3)	5-6 (5.8)	2.0-2.2 (2.1)	Present, protuberant, nipple-like	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	Absent	Present, 1	Elongate	12-14 (13.1)	7-8 (7.4)	1.7-1.9 (1.8)	Present, large	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria janovyi</i> Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	Absent	Present, 1, subspheroidal	Pyriiform	(12.1)	(10.1)	(1.2)	Present, large, prominent	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	Absent	Absent	Ellipsoidal	9-12 (10.6)	6-8 (6.7)	(1.6)	Present, small, nipple-like	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška and Modrý, 2012	Absent	Present, 2 irregular, ~2.0	Elongate ovoidal, slightly asymmetrical	11-16 (13.5)	6-7 (6.5)	1.7-2.2 (1.9)	Present	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	Absent	Absent	-	8-14 (12.0)	6-7 (6.6)	-	Present	Present	Present
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey and Adams, 2015	Absent	Present, 1-2	Ovoidal	12-14 (12.4)	7-8 (7.3)	1.5- 1.9 (1.7)	Present, knob-like	Present, rounded	Present, scattered, granules of ~ 1.0
<i>Eimeria</i> sp. of Yang et al. (2016)	Absent	Present	Elongate ovoidal	12-15 (13.0)	5-7 (6.1)	2.0-2.2 (2.1)	Present	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto n. sp.	Inconspicuous	Absent	Ellipsoidal to slightly asymmetrical	8-10 (9.0)	5-6 (5.1)	1.6-2.0 (1.77)	Present, flattened to half-moon-- shaped	Present, rounded	Present, scattered

Fig. 4 Line drawing (A) and photomicrographs (B-E) of sporulated oocysts of *Eimeria columbinae* n. sp. recovered from the ruddy ground-dove *Columbina talpacoti*. Note the inner (il) and outer (ol) layer of the oocyst wall, micropyle (m), oocyst residuum (or), refractile body (rb), Stieda body (sb), and sub-stieda (ssb) bodies. Scale bars 5 μ m



uncommon in other groups (Gruet et al. 1982). This characteristic feature was included in the redrawing of this species in the current work.

Eimeria labbeana (Labbe, 1896) Pinto, 1928 (Fig. 1C), was the first eimerian parasite described from Columbiformes. Labbe (1896) originally described this species as *Coccidium pfeifferi* Labbe, 1896, until Pinto

(1928) corrected its nomenclature by passing the species to the genus *Eimeria*; however, as the name *Eimeria pfeifferi* Labbe, 1896, was already in use for a parasite of a centipede of genus *Geophilus* Leach, 1814, by the law of priority, the species was renamed to *E. labbeana*. Several columbiform species are recorded as hosts for this species: the common pigeon *Columba livia* Gmelin, 1789; the

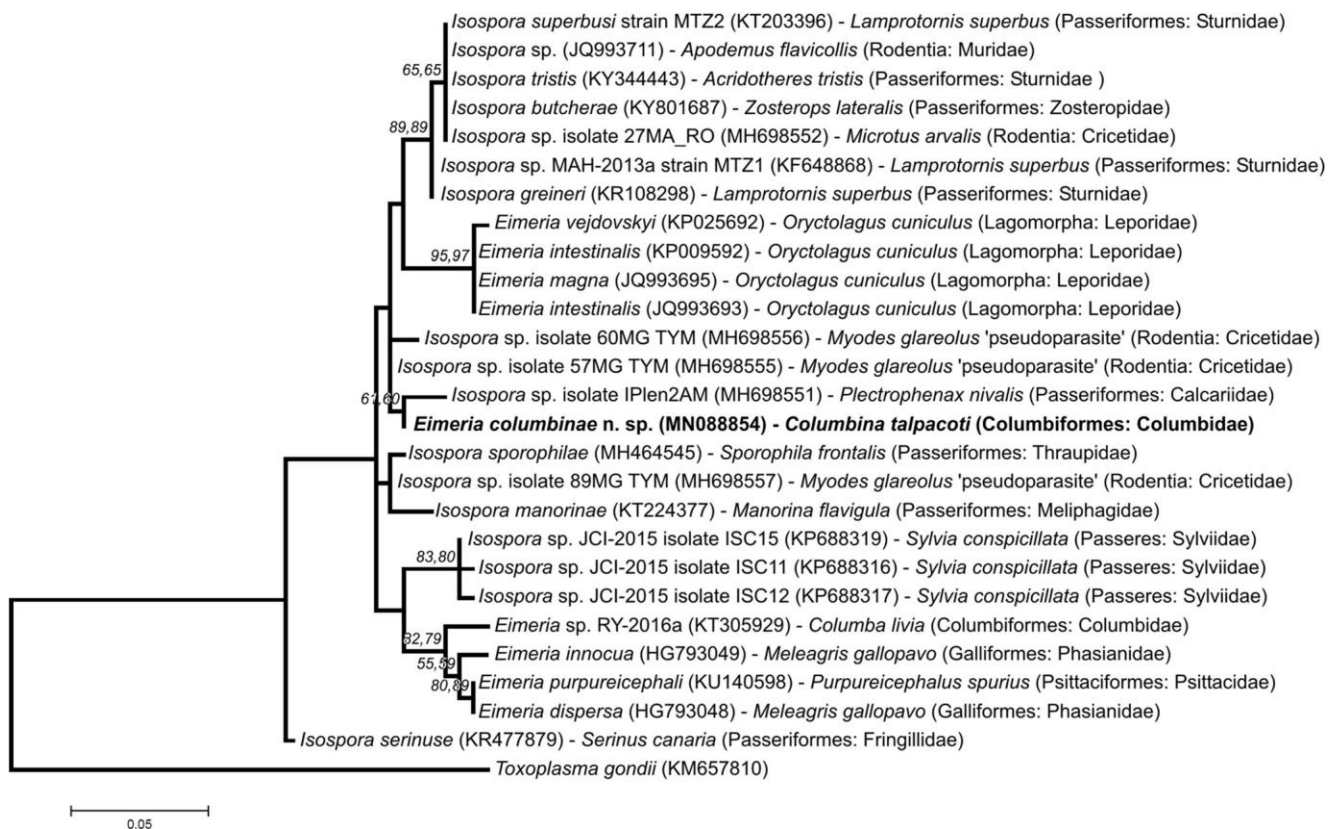


Fig. 5 Maximum likelihood tree estimated from the COI gene sequences of eimeriid species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood

(ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

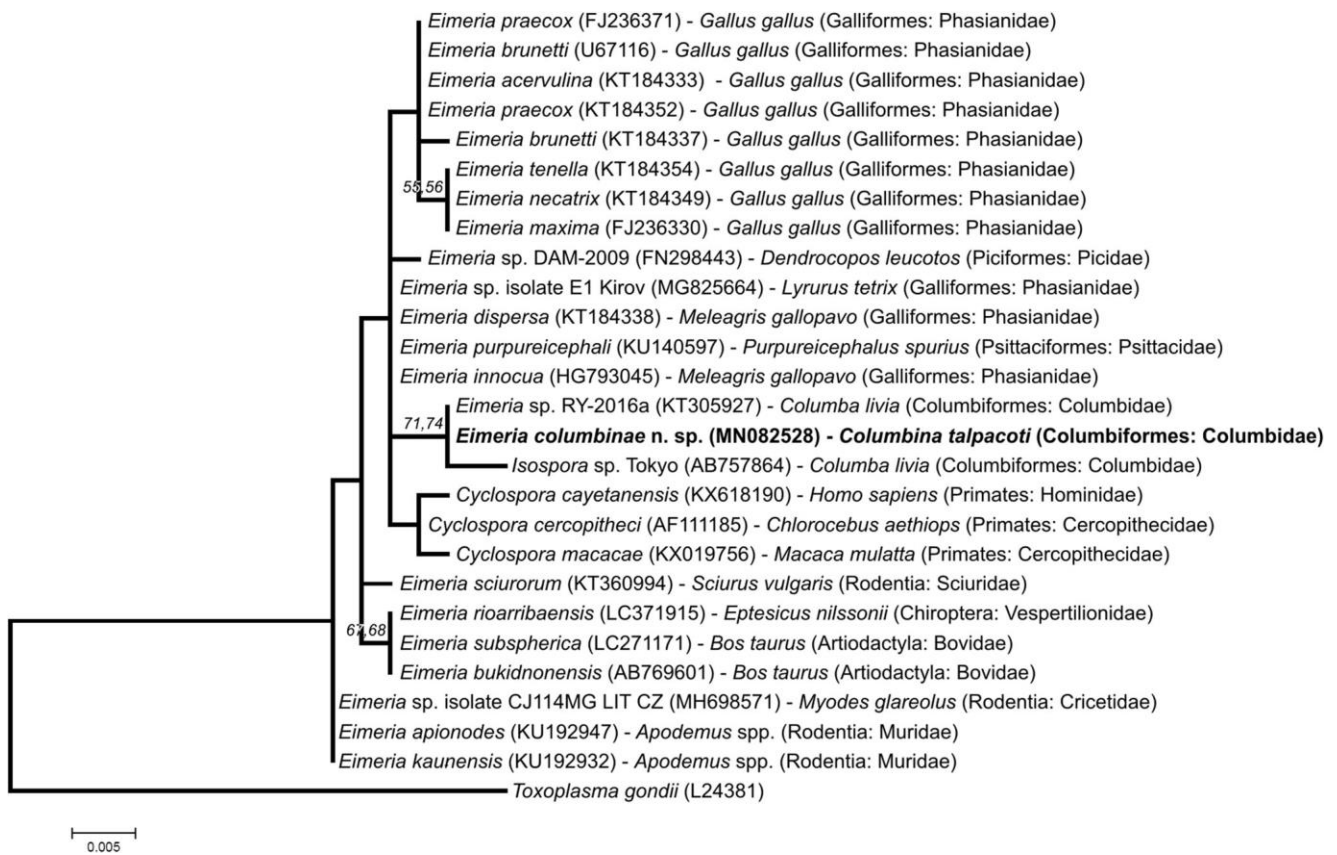


Fig. 6 Maximum likelihood tree estimated from the 18S gene sequences of eimeriid species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood

(ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

Eurasian collared-dove *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838; the oriental turtle-dove *Streptopelia orientalis* (Latham, 1790); and the laughing dove *Spilopelia senegalensis* (Linnaeus, 1766) (Labbe 1896; Nieschulz 1935; Hunt and O'Grady 1976; Abdel-Ghaffar et al. 1986). Bhatia et al. (1972) described *Eimeria choudari* Bhatia et al. 1972, in a study with birds and mammals of the Delhi Zoo, in India; however, this species was recorded as a synonym of *E. labbeana* due to the taxonomical equivalences between their descriptions (Duszynski et al. 2000). *Eimeria columbinae* n. sp. has smaller measurements than *E. labbeana*, besides divergence regarding the presence of a sporocyst residuum and sub-Stieda body (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria columbarum Nieschulz, 1935 (Fig. 1D) was the second *Eimeria* sp. described from common pigeons *C. livia* also in India. The work of Nieschulz (1935) was well written, describing the new species in detail and distinguishing it from *E. labbeana*, which was the only previously reported species of Columbiformes. Decades later, Malhotra and Ray (1961) described *Eimeria tropicalis* Malhotra and Ray, 1961, from this same host species also in India; however, its oocysts were morphologically equivalent to *E. columbarum*, being therefore considered a synonym (Duszynski et al. 2000). As in

the comparison with *E. labbeana*, *E. columbinae* n. sp. also has even smaller dimensions of oocyst and sporocyst than *E. columbarum* (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria columbae Mitra and Das-Gupta, 1937 (Fig. 1E), did not obtain the same detailed morphological description and line drawing as observed in the work of Nieschulz (1935). Although the biological cycle and the endogenous forms were characterized, the oocysts were not prioritized in the morphological description allowing a reliable retrospective identification of this species (Mitra and Das-Gupta 1937). The sporocysts were drawn without a Stieda body and with a size disproportionate in relation to the oocyst, establishing this species morphologically uncommon, or it was drawn from the observation of sporocysts in a non-longitudinal position, which is potentially possible (Berto et al. 2014). In addition, photomicrographs were not presented for analysis. Also, this species was redrawn from the original line drawing, only including a small flattened Stieda body; otherwise, this species could not be an *Eimeria* sp. (Jirků et al. 2002; Berto et al. 2014). It is important that samples be collected from this same host species in India to validate this species. Thus, this species is different from *E. columbinae* n. sp. by the size and proportion of oocysts and sporocysts (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria sphenocercae Ray, 1952 (Fig. 1F), was described from the wedge-tailed green-pigeon *Treron sphenurus* (Vigors, 1832) in Mukteshwar, in the district of Uttarakhand, India (Ray 1952). This is the most distinguishable species among the eimerians from Columbiformes. The shape rhiniform to ellipsoidal with a lateral dent is a morphological pattern very atypical within the coccidia of the World, as can be observed in the morphological comparisons showed in Figs. 1, 2, and 3. In this sense, this species is different from *E. columbinae* n. sp. in several characteristic features, but mainly due to its unique shape (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria kapotei Chatterjee and Ray, 1969 (Fig. 1G), was another example of a minimally described species, which significantly impaired the possibility of its later identification, especially in present times. In addition, Duszynski et al. (2000) considered this species as a probable synonym of *E. labbeana*; however, the size of the oocysts of *E. kapotei* is distinctly larger and have been described with a discernible micropyle. Therefore, in the current work, this species was drawn based on the original description, with the hope that it can be identified again, validated and possibly re-described. In comparison with *E. columbinae* n. sp., *E. kapotei* has larger oocysts, besides having a discernible micropyle and polar granules (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria turturi Golemsky, 1976 (Fig. 2A) was an eimerian described from wild doves from Bulgaria, specifically the European turtle-dove *Streptopelia turtur* (Linnaeus, 1758), which is a species categorized as “vulnerable” by the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources-IUCN (IUCN 2019). This information makes its eimerian very relevant for wildlife conservation; however, this coccidian species has not been reported since its original description by Golemsky (1976). *Eimeria columbinae* n. sp. has smaller oocysts than *E. turturi*, in addition to having a micropyle and oocyst residuum, which are not observed in *E. turturi* (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria waiganiensis Varghese (Fig. 2B), was also described from wild pigeons and doves, this time in Papua New Guinea (Varghese 1978b). Its hosts were the grey-capped emerald dove *Chalcophaps indica* (Linnaeus, 1758) and the green-naped pheasant-pigeon *Otidiphaps nobilis* Gould 1870.

Eimeria duculai Varghese, 1980 (Fig. 2C), and *Eimeria gourai* Varghese, 1980 (Fig. 2D), were two other eimerians described from pigeons in Papua New Guinea, 2 years after the first description by this same author Varghese (1980). The Torresian imperial-pigeon *Ducula spilorrhoa* (Gray, 1858) and the Victoria crowned-pigeon *Goura victoria* (Fraser, 1844) were their type-hosts, respectively. Among these three eimerians reported from Papua New Guinea, *E. gourai* should be considered the most relevant because *G. victoria* is categorized as “Near Threatened” by the IUCN. This wild pigeon is suspected to be declining at a

moderately rapid rate, given its long generation time and the rates of loss and degradation of its habitat across north coastal Papua New Guinea (IUCN 2019).

Parasites of endemic birds in isolated environments, such as insular environments, tend to remain isolated in these environments along with their hosts (Berto and Lopes 2013). This is the case of these three eimerian species of pigeons in Papua New Guinea. It would be highly unlikely that these eimerians would be transmitted to pigeons in South America. In any case, *E. columbinae* n. sp. is different from all these three eimerian species because its oocysts are considerably smaller and do not have polar granules (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria palumbi McQuistion, 1991 (Fig. 2E), was described from Galapagos doves *Zenaida galapagoensis* Gould, 1841, in the Galapagos Islands, which is part of the Republic of Ecuador (McQuistion 1991). It was the first description of an eimerian species from a columbiform bird of the South America. This coccidian species must be isolated in the Galapagos Islands, similar to the previous example; but, in any case, the oocysts of *E. columbinae* n. sp. are much smaller than those of *E. palumbi* (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Columbina talpacoti was recorded for the first time as host for a new species of *Eimeria* only in the 2000s. In Adriano et al. (2000), *Eimeria curvata* Adriano et al. 2000 (Fig. 2F), was described from *C. talpacoti*, as well as from the scaled dove *Columbina squammata* (Lesson, 1831) in the Municipality of Junqueirópolis, in the western of the State of São Paulo, Brazil. Recently, this species was reported from this same host species, *C. talpacoti*, in the Municipality of Guapimirim, in the mountain region of the State of Rio de Janeiro, thus demonstrating the wide distribution of this eimerian species, at least in southeastern Brazil (Oliveira et al. 2017). Despite being the same host of the current work, the morphological differences of *E. curvata* with *E. columbinae* n. sp. are evident. *Eimeria curvata* has a protuberant Stieda body and absence of sub-Stieda body, whereas *E. columbinae* n. sp. has a Stieda body delicate and flattened and sub-Stieda body present. In addition, the sporocyst residuum in *E. curvata* is compact, whereas in *E. columbinae* n. sp., it is diffuse (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria zenaidae Adriano et al. 2003 (Fig. 2G), was the second species described by Adriano et al. (2003), also in Junqueirópolis, São Paulo, Brazil. This species parasitized the eared dove *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847). This species is differenced because it has a rough oocyst wall, a wide and projected Stieda body, and no sub-Stieda body, whereas *E. columbinae* n. sp. has a delicate and flattened Stieda body and a sub-Stieda body (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria janovyi Bandyopadhyay et al. 2006 (Fig. 3A), is another species described from common pigeons *C. livia* in India, this time in the Kalyani area, West Bengal (Bandyopadhyay et al. 2006). This species did not have a

detailed description, besides not having equivalences between the line drawing and the photomicrograph. Therefore, in the current work, this species was redrawn based on the photomicrograph presented, disregarding the line drawing. The characteristic features presented differentiated it from *E. labbeana*, *E. columbarum* and *E. columbae*, which are the three species traditionally recorded from India. The absence of a micropyle, absence of oocyst residuum, presence of a polar granule, and absence of a sub-Stieda body are characteristics that are contrary to those found in *E. columbinae* n. sp. (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria livialis Alyousif et al. 2009 (Fig. 3B), is another described species from the common pigeon *C. livia*; this time in Saudi Arabia (Alyousif et al. 2009). This species has some characteristic features that make it distinguishable from the other *Eimeria* spp. described from *C. livia*, as the oocysts are elongate ellipsoidal and the oocyst residuum is composed of four to seven compacted globules. This globular residuum is the main characteristic that differentiates *E. livialis* from other *Eimeria* spp. of *C. livia*; however, this characteristic feature is not clearly observed in the original photomicrographs, even though it was described and drawn (Alyousif et al. 2009). The ellipsoidal elongated shape, larger oocysts, and the absence of a sub-Stieda body distinguish *E. livialis* from *E. columbinae* n. sp. (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria columbapalumbi Jamriška and Modrý, 2012 (Fig. 3C), was described from common woodpigeons *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, from urban environments within the Czech and Slovak Republics (Jamriška and Modrý 2012). The size, shape, and polar granules are the main characteristic features that distinguish this species from the other eimerian parasites of its congeneric host *C. livia* (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria mauritiensis Ball et al. 2012 (Fig. 3D), was described from the vulnerable pink pigeon *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) in another insular environment: Mauritius island, which is about 870 km east of Madagascar in the Indian Ocean (Ball et al. 2012; IUCN 2019).

Eimeria columbinae n. sp. is similar to *E. columbapalumbi* and *E. mauritiensis* in some morphological aspects but can be easily distinguished from others. These species have no oocyst residuum, which is one of the main characteristic features of *E. columbinae* n. sp. In addition, the sporocysts of *E. mauritiensis* are not asymmetrical as in *E. columbinae* n. sp. *Eimeria columbapalumbi* also has asymmetrical sporocysts; however, it has ellipsoidal oocysts and has no sub-Stieda body, in comparison to the subspheroidal oocysts and sub-Stieda body of *E. columbinae* n. sp. (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Eimeria lyoni Yabsley et al. 2015 (Fig. 3E), was described from mourning doves *Zenaidura macroura* (Linnaeus, 1758) in Kentucky, USA (Yabsley et al. 2015). This was the first and only description of an *Eimeria* sp. from Columbiformes in North America. *Zenaidura macroura* is widely distributed in North and

Central Americas, being apparently bordered by the Andes Mountains in Panama. From the opposite hemisphere, the ruddy ground-dove *C. talpacoti* is widely distributed throughout South and Central Americas, reaching northern Mexico in North America, where it is sympatric with *Z. macroura* (IUCN 2019). This sympatry would enable transmission between these hosts; however, *E. lyoni* is different of *E. columbinae* n. sp. by its ellipsoidal oocysts, prominent Stieda body and absence of a sub-Stieda body (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Finally, an *Eimeria* sp. identified as *E. labbeana*-like (Fig. 3F) was recently described from common pigeons *C. livia* in Australia (Yang et al. 2016). The worldwide distribution of *C. livia*, whether native or introduced, would allow the identification of *E. labbeana* in Australia. However, Yang et al. (2016) were not able to accurately identify this *Eimeria* sp. as that of *E. labbeana*, mainly because there are descriptions for *E. labbeana* with significant morphological and morphometric differences (Pinto 1928; Nieschulz 1935) (Figs. 1, 2, and 3; Table 1). Also, the description of the presence of polar granules and oocyst residuum is not obvious in the photomicrographs. It may possibly be that the description belongs to the sporocysts and not to the oocyst, or refers to some debris adhered externally to the oocyst wall. Thus, in the current work, this *E. labbeana*-like coccidian is cited as *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016), because it is not exactly like *E. labbeana*, at least not morphologically, nor ecologically, since it has been described from hosts of Australia that is quite distant from the type-locality of *E. labbeana*. In this sense, this *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) was redrawn (Fig. 3F) based on the photomicrographs presented, given that this *Eimeria* sp. can be identified again, validated and potentially described as a new species or as one of the preexisting *Eimeria* spp. of *C. livia*. In fact, all *Eimeria* spp. described from *C. livia* from India would need to be reevaluated from new samples of the same host species and locality, through detailed morphological and molecular studies and thereby validating and characterizing these species. In conclusion, *Eimeria columbinae* n. sp. can be distinguished from this *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) because it does not have a micropyle, contains a polar granule, and has no sub-Stieda body (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

Although the work of Yang et al. (2016) had been inconclusive in the specific identification of *Eimeria* sp., it was a pioneer in molecular studies of Eimeriidae of Columbiformes. This *Eimeria* sp. recovered from *C. livia* in Australia was sequenced by 18S, 28S, and COI genes, being the only *Eimeria* sp. from Columbiformes to have undergone molecular identification.

Phylogenetic analysis

Primers for amplification of longer PCR products were initially intended; however, only the short version 18S and COI

sequences were amplified. Failure to amplify longer sequences could be related to issues with DNA extraction from an individual oocyst, which has already been noted by Dolnik et al. (2009). In this methodology, DNA is extracted from eight cells (eight sporozoites/one oocyst), which ensures the molecular identity of the species/morphotype, but results in a smaller amount of extracted DNA, mainly for nuclear DNA which is present in even smaller amounts than mitochondrial DNA. Extracted DNA samples are subjected to temperature variations during laboratory manipulation, which were unavoidable and may have caused DNA strand breaks (Martinez et al. 2018). Thus, these breaks in the DNA combined with the low DNA concentration may have precluded the amplification of longer fragments.

Phylogenetic analysis based on the COI gene (Fig. 5) revealed that *E. columbinae* n. sp. is closer to an *Isospora* sp. from snow buntings *P. nivalis* from the Czech Republic (Trefančová et al. 2019). In this work of Trefančová et al. (2019), which included the sequence MH698551 from *P. nivalis* in the GenBank database, several samples of *Isospora* spp. from rodents, and also from passerines, were sequenced and analyzed to identify the pseudoparasitism of *Isospora* spp. in rodents. In this pseudoparasitism, isosporan oocysts only pass through the digestive tract of rodents that ingested feces of passerines, which can be confusing for the researcher who identifies these oocysts in the feces of the rodent and feels it is the true host. *Eimeria columbinae* n. sp. was also close to these sequences of *Isospora* spp. that were considered as pseudoparasites of bank voles *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) in the work of Trefančová et al. (2019).

The COI-based phylogenetic results were unexpected, since *E. columbinae* n. sp. was closer to *Isospora* spp. than to *Eimeria* spp., besides these closest isolates were obtained from the Czech Republic, with the exception of *I. sporophilae*, which is a parasite of seedeaters in southeastern Brazil (Rodrigues et al. 2019). Nevertheless, the genera *Isospora* and *Eimeria* are phylogenetically close in the Eimeriidae family, especially when they are parasites of birds (Yang et al. 2016).

Initially, the ecological hypothesis was accepted that the parasites coevolved with their hosts (Odum 1983); therefore, *E. columbinae* n. sp. was expected to be closer to the *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016), since these two species are congeneric parasites of Columbiformes. Another possibility would be a phylogenetic origin associated with their geographic localities; however, as previously mentioned, *E. columbinae* n. sp. was closer to eimeriid isolates from Europe than to isolates from southeastern Brazil. Likewise, *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) sat in a clade far from *E. columbinae* n. sp. and close to parasitic species of turkeys and parrots. Thus, only these two *Eimeria* spp. sequenced by the COI from columbiform birds precludes a better understanding of the phylogeny of Eimeriidae of Columbiformes.

In contrast, the phylogenetic analysis based on the 18S gene presented results consistent with the assumption of co-evolution of parasites and hosts (Fig. 5). Monophyletic groups that bring together coccidian species related to certain orders and classes of hosts are observed. In fact, the 18S gene is widely recognized as suitable for resolving deep phylogenetic relations within Apicomplexa (Ogedengbe et al. 2015; Xavier et al. 2018). However, the similarity of 100% between *E. columbinae* n. sp. and *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) that was observed emphasizes that the 18S gene is excessively conserved, at least in the amplified part in the current work. Thus, this 18S fragment amplified is potentially suitable for phylogenetic studies of higher taxa, but inappropriate for differentiation and identification at species level. In other words, the morphological differences of the oocysts and the ecological differences associated with the different hosts and the distant type localities of *E. columbinae* n. sp. and *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) are incompatible with the genetic similarity of 100%. In addition, a difference of only two nucleotide substitutions was observed in the comparison of *E. columbinae* n. sp. and *Eimeria* spp. of turkeys and parrots, which are species that are phylogenetically very distant.

Conclusions

The detailed taxonomic revision made in the current work from all *Eimeria* spp. described of Columbiformes of the world, and their comparisons with *E. columbinae* n. sp. clearly supports its designation as a unique species. Therefore, *E. columbinae* n. sp. is considered new to science, being the 19th description in a columbiform bird. Additionally, this is the second *Eimeria* sp. from Columbiformes to have undergone molecular identification of the COI and 18S genes.

Acknowledgments We are thankful to the staff at the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (Campus Pinheiral), and the landowner at Santa Rita de Cássia in the Municipality of Barra Mansa, RJ, who allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Field-collecting permits were issued to B.P. Berto by SISBIO/ICMBio (license 42798-1) and CEUA/UFRRJ (protocol IV-6606250616).

References

- Abdel-Ghaffar F, Bashtar AR, Kamal AA (1986) Studies on *Eimeria* species infecting the Egyptian wild dove *Streptopelia senegalensis aegyptiaca*. 1. Exogenous stages. *Bul Fac Scie* 54:185-198
- Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2000) *Eimeria curvata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:53-55
- Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2003) A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. *Acta Protozool* 42:71-73
- Alyousif MS, Al-Shawa YR, Al-Asiri SS (2009) *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol* 39:383-388
- Ball SJ, Daszak P, Swinerton KR, Jones CG, Snow KR (2012) A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. *Afr Zool* 47:369-372
- Bandyopadhyay PK, Bhakta JN, Shukla R (2006) A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). *Zoos Print J* 21:2386-2387
- Berto BP, Lopes CWG (2013) Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In: Ruiz L, Iglesias L (eds) *Birds: evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease*. Nova Science Publishers, New York, pp 47-66
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, Lopes CWG (2011) Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 80:159-204
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1-15
- Bhatia BB, Chauhan PPS, Arora GS, Agrawal RD (1972) Observations on some coccidian infections in birds and a mammal at the Delhi Zoo. *Indian J Anim Sci* 42:625-628
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169-174
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333-336
- Duszynski D, Couch L, Upton SJ (2000) The Coccidia of the World. Available from: <<https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>>. Accessed 2 Jun 2019
- Golemansky V (1976) Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. *Acta Protozool* 15:399-404
- Grulet O, Landau I, Baccam D (1982) Les *Isospora* du Moineau domestique; multiplicite des especes. *Ann Parasitol Hum Comp* 57:209-235
- Hunt S, O'Grady J (1976) Coccidiosis in pigeons due to *Eimeria labbeana*. *Aust Vet J* 52:390
- ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys* 219:1-10
- IUCN (2019) The IUCN Red List of Threatened Species. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 12 Jun 2019
- Jamriška J, Modrý D (2012) A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae). *Acta Protozool* 51:329-333
- Jirků M, Modrý D, Šlapeta JR, Koudela B, Lukeš J (2002) The phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the evolution of excystation structures in coccidia. *Protist* 153:379-390
- Labbe A (1896) Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur less coccidies. *Arch Zool Exp Gen* 24:517-654
- Malhotra MN, Ray HN (1961) On a few coccidium, *Eimeria tropicalis* n. sp. from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. *Proc 48th Indian Sci Cong* 48:412
- Martinez GG, Santos ALF, Oliveira CQP, Moraes TI (2018) Estocagem de DNA a temperaturas variadas: Análise da concentração. *Rev Saude Foco* 10:42-50
- Matsubara R, Fukuda Y, Murakoshi F, Nomura O, Suzuki T, Tada C, Nakai Y (2017) Detection and molecular status of *Isospora* sp. from the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). *Parasitol Int* 66:588-592
- McQuiston TE (1991) *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida galapagoensis*). *Trans Am Microsc Soc* 110:178-181
- Mitra AN, Das-Gupta M (1937) On a species of *Eimeria* (Coccidia-Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. *Proc 24th Indian Sci Cong* 24:291
- Nieschulz O (1935) Ueber Kokzidien der Haustaube. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 134:390-393
- Odum EP (1983) *Ecologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 434pp
- Ogedengbe ME, Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Arrowood MJ, Barta JR (2015) A linear mitochondrial genome of *Cyclospora cayetanensis* (Eimeriidae, Eucoccidiorida, Coccidiasina, Apicomplexa) suggests the ancestral start position within mitochondrial genomes of eimeriid coccidia. *Int J Parasitol* 45:361-365
- Oliveira PSD, Ferreira MA, Silva LMD, Rodrigues MB, Cardozo SV, Berto BP (2017) Diversity and distribution of coccidia of wild birds in an Atlantic forest fragment area in southeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 26:457-464
- Piacentini VDQ, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, Bravo GA, Brito GRR, Naka LN, Olmos F, Posso S, Silveira LF, Betini GS, Carrano E, Franz I, Lees AC, Lima LM, Pioli D, Schunck F, Amaral FR, Bencke GA, Cohn-Haft M, Figueiredo LFA, Straube FC, Cesari E (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Rev Brasil Ornitol* 23:91-298
- Pinto C (1928) Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa). *C R Seances Soc Biol* 98:564-1565
- Ray DK (1952) On a new coccidium, *Eimeria sphenocerca* n. sp., from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). *J Parasitol* 38:546-547
- Rodrigues MB, Oliveira JLG, Silva-Carvalho LM, Pastura DGN, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2019) The vulnerable *Sporophila frontalis* (Verreaux) and *Haplospiza unicolor* Cabanis as new hosts for *Isospora sporophilae* Carvalho-Filho, Meireles, Ribeiro and Lopes, 2005 (Eimeriidae) in Brazil. *Syst Parasitol* 96:423-431
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD, Kirk PM (2015) Correction: a higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10:e0130114
- Siek H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p 862
- Sigrist T (2014) *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. São Paulo, Avis Brasilis, 608 pp
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599
- Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RCA, Conrad PA (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int J Parasitol* 32:595-616
- Trefancová A, Mácová A, Kvičero J (2019) Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? *Protist* 170:104-120

- Varghese T (1978a) *Isospora gallicolumbae* sp. n. from Beccari's ground dove (*Gallicolumba beccarii* Salvadori) in Papua New Guinea. *J Protozool* 25:425-426
- Varghese T (1978b) *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the Greenwinged Ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent Ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea. *J Parasitol* 64:312-314
- Varghese T (1980) Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. *Parasitol* 80:183-187
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst Parasitol* 76:69-76
- Xavier R, Santos JL, Verissimo A (2018) Phylogenetic evidence for an ancestral coevolution between a major clade of coccidian parasites and elasmobranch hosts. *Syst Parasitol* 95:367-371
- Yabsley MJ, Bailey K, Adams HC (2015) A New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Mourning Dove, *Zenaidura macroura* (Columbiformes: Columbidae). *Comp Parasitol* 82: 231-234
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59-66
- Yang R, Brice B, Elloit A, Ryan U (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana* -like (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. *Exp Parasitol* 166:124-130

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Eimeria ferreirai n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from Brazil

MARIANA S. OLIVEIRA^{1,8}, JHON LENNON GENOVEZ-OLIVEIRA^{1,9}, CARLOS NEI ORTÚZAR-FERREIRA², CARLA MARONEZI³, SERGIO THODE-FILHO⁴, SERGIAN V. CARDOZO⁵, ÁGUIDA A. OLIVEIRA⁶, VIVIANE M. LIMA^{7,10} & BRUNO P. BERTO^{7*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil

²Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil

✉ carlosneiortuzarferreira@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-0177-5591>

³Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil. ✉ maronezi.carla@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6704-0395>

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Avenida República do Paraguai 120, 25050-100 Duque de Caxias, RJ, Brazil. ✉ sergio.thode@ifrrj.edu.br; <http://orcid.org/0000-0001-7930-8312>

⁵Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, 25071-202 Duque de Caxias, RJ, Brasil. ✉ sergianvc@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1432-7533>

⁶Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil. ✉ aguidaoliveira@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8685-0345>

⁷Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil.

⁸✉ mariana.s.o@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9594-0633>

⁹✉ jhonlennon_usher@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2994-397X>

¹⁰✉ vilima@ufrj.br; <https://orcid.org/0000-0001-7930-8312>

*Corresponding author. ✉ berto.ufrj@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-1072-5254>

Abstract

The doves and pigeons constitute a taxonomic group (Columbiformes: Columbidae) of granivorous and frugivorous birds with a worldwide distribution. The current work aims to describe morphologically and molecularly a new protozoan from white-tipped doves *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 and grey-fronted doves *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) in Southeastern Brazil. *Eimeria ferreirai* n. sp. has oocysts that are sub-spherical to ellipsoidal, 21.4 × 18.8 µm, with smooth, bilayered wall, ~1.6 µm thick. Micropyle present. Oocyst residuum absent, but one to two polar granules are present. Sporocysts are elongate ovoidal to boomerang-shaped, 13.4 × 6.9 µm. Stieda body triangular to lozengal. Sporocyst residuum is composed of granules of different sizes. Sporozoites are vermiform with refractile body and nucleus. Sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene and the subsequent phylogenetic molecular comparisons supported the description of the new species, since the maximum similarity was 90-95% with eimeriid species of Columbiformes, Anseriformes, Galliformes and Passeriformes. Thus, this is the first coccidian species reported from *Leptotila* spp. and the twentieth description of an eimerian from Columbiformes in the World.

Key words: taxonomy, morphology, coccidia, *Eimeria*, oocysts, Columbiformes, Columbidae, Itatiaia National Park, Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

The Columbidae family (Columbiformes) brings together 367 species of doves and pigeons, which have a worldwide distribution. It is estimated that in the Neotropical regions there are about 68 species, where 23 of these were recorded in Brazil (Bennett & Peirce 1990; IUCN 2019).

The white-tipped doves *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 and grey-fronted doves *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) are found in wooded areas, frequenting the ground to feed; live alone or in pairs (Sick 1997). This behavior and granivorous and frugivorous eating habits favor the fecal-oral transmission of intestinal parasites, such as protistan coccidians (Dolnik *et al.* 2010; Berto & Lopes 2013).

Parasitological studies in Columbidae have recorded 19 *Eimeria* spp. and two *Isospora* spp. using the traditional morphological taxonomy although recently some of these coccidians have been molecularly identified by sequencing of specific genes such as the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene and the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene (Ortuzar-Ferreira *et al.* 2020).

In this context, the current study describes a new species of *Eimeria* from white-tipped doves *L. verreauxi* and grey-fronted doves *L. rufaxilla* by morphological and molecular methods. These bird specimens were captured in the Itatiaia National Park, Serra dos Órgãos National Park and in an area under reforestation in the Municipality of Pinheiral, Southeastern Brazil.

Material and methods

Sample collection

A total of four expeditions were conducted in 3 different localities in southeastern Brazil: (1) Itatiaia National Park (22°27'40"S, 44°35'31"W), a protected area located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais and São Paulo (ICMBIO 2018a); (2) a fragmented area of Atlantic Forest in the Municipality of Guapimirim (22°31'10"S, 43°00'36"W), which is located on the edge of the Serra dos Órgãos National Park, another protected area located in the coastal mountain range (Serra do Mar) of the State of Rio de Janeiro (ICMBIO 2018b); and (3) an area of Atlantic Forest under reforestation in the campus of the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, in the Municipality of Pinheiral, State of Rio de Janeiro (22°31'37"S, 43°59'45"W). A total of nine *L. verreauxi* (one from Itatiaia National Park, six from Serra dos Órgãos National Park and two from Pinheiral) and one *L. rufaxilla* (from Pinheiral) were captured with mist nets. The doves were kept in individual boxes with clean ground paper. After identification of the species (Sigrist 2014), the bird was photographed and released. A fresh droplet of feces from each individual bird was placed in an individually centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution. Field-collecting permits were issued to B.P. Berto by SISBIO/ICMBio (licenses 42798-1; 45200-1; 49605-1; 54951-1) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616).

Morphological analyses

Fecal samples were taken to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), where they were incubated at room temperature (20–25°C) for one week. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski & Wilber (1997) and Berto *et al.* (2014). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made with the use of an Olympus BX41 binocular microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy) connected to a computer running the software BELView (Version 6.2.3.0, BEL Engineering, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), specifically Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analyses

Twenty-six oocysts carefully identified with the same characteristics features under light microscopy was isolated and resuspended in PBS (Dolnik *et al.* 2009). DNA was extracted from the oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik *et al.* (2009a) and Yang *et al.* (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 10 µl of 5× Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, 1.25 units of GoTaq® DNA polymerase, 3 µl of DNA (for primary reaction) or 3 µl primary PCR product (for the secondary reaction). Both primary and secondary PCR were conducted using

the same cycling conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 47°C for 45 s, 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil). All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, were an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was used for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analysed and edited using the program Chromas 2.6.

DNA sequence analyses

The newly generated sequences were compared to those for coccidians of Eimeriidae available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for eimeriid species at the COI sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura *et al.* 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

The white-tipped dove *L. verreauxi* from the Itatiaia National Park, five of the six *L. verreauxi* from the Serra dos Órgãos National Park, one of the two *L. verreauxi* from Pinheiral and the only grey-fronted dove *L. rufaxilla* from Pinheiral were positive for an *Eimeria* sp. undescribed in scientific literature.

Eimeria ferreirai Oliveira and Berto n. sp.

Type host: White-tipped dove *Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855 (Aves: Columbiformes: Columbidae).

Other host: Grey-fronted doves *Leptotila rufaxilla* (Richard & Bernard, 1792) (Aves: Columbiformes: Columbidae).

Type locality: Itatiaia National Park (22°27'40"S, 44°35'31"W), Southeastern Brazil.

Other localities: Serra dos Órgãos National Park (22°31'10"S, 43°00'36"W) and Pinheiral (22°31'37"S, 43°59'45"W), also from Southeastern Brazil.

Type-material: Photosyntypes, line drawing and oocysts recovered from *L. verreauxi* in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution (Williams *et al.* 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession number MZURPTZ2019016. Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository number P-99/2019. Photographs of the type-host specimen (symbiotype) are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: One representative COI sequence was deposited in the GenBank database under the accession number MN326301.

ZooBank registration: To comply with the regulations set out in article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 2012), details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) for *E. ferreirai* is urn:lsid:zoobank.org:act:04C29620-AF5E-4C8D-BF5D-5B9D31572122.

Site of infection: Unknown.

Prevalence: 70% (7/10) overall; 78% (7/9) for *L. verreauxi*; and 100% (1/1) for *L. rufaxilla*.

Sporulation: Exogenous. All oocysts were passed in the feces unsporulated and were fully sporulated by day 7 in K₂Cr₂O₇ solution at room temperature (20–25°C).

Etymology: The specific name is derived from the family name of a Brazilian ornithologist Dr Ildemar Ferreira, given in his honor for his contribution to the study of ecology and parasitology of birds.

Description (Figs 1; 2A–F)

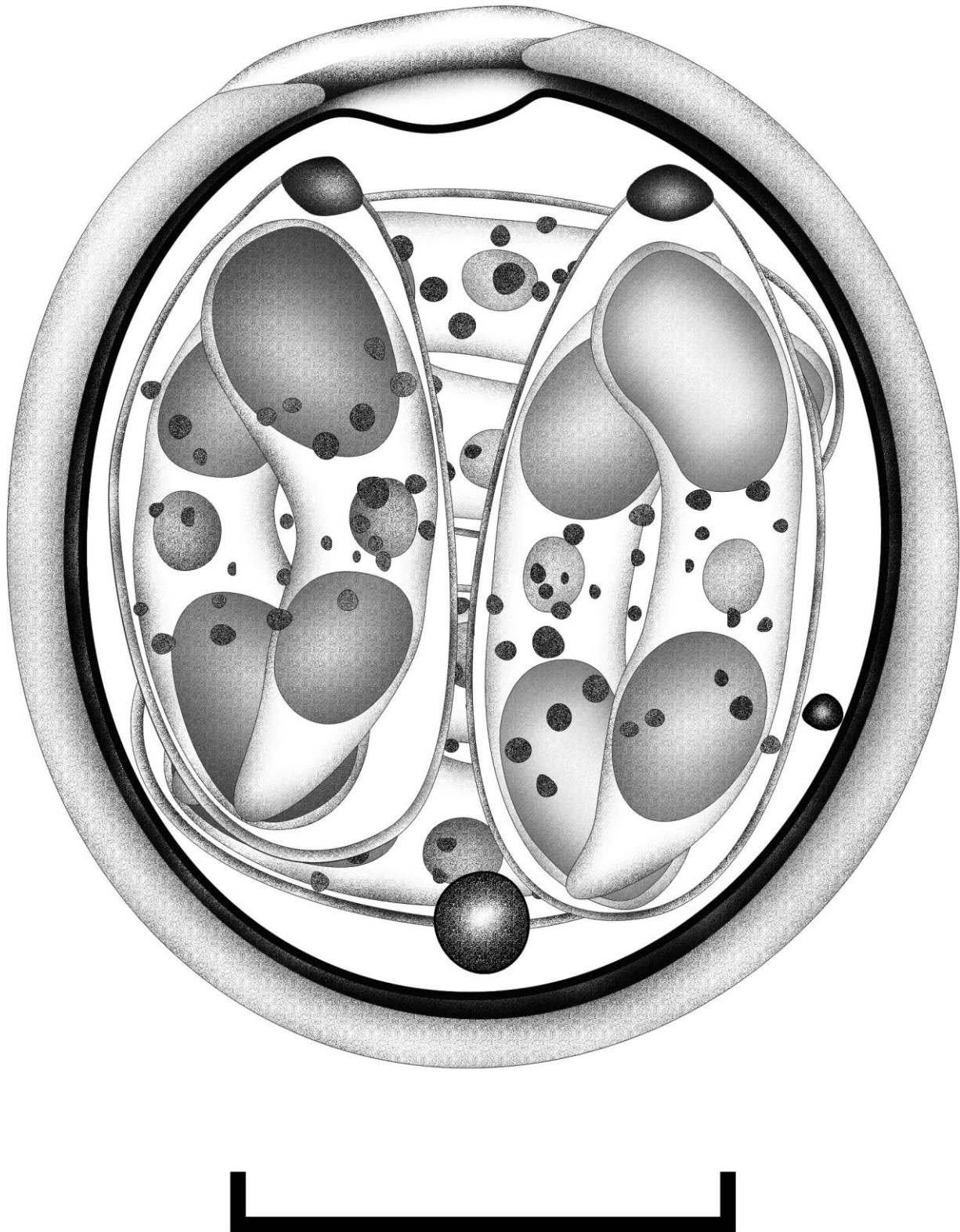


FIGURE 1. Line drawing of the sporulated oocyst of *Eimeria ferreirai* n. sp., a new coccidium species recovered from doves *Leptotila* spp. Scale-bar: 10µm.

Oocyst (n = 22) sub-spherical to ellipsoidal, 19–25 × 16–21 (21.4 × 18.8); length/width (L/W) ratio 1.0–1.4 (1.15). Wall bi-layered, delicate, 1.3–1.9 (1.6) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle present, but barely discernible in some oocysts, 3.0–4.0 (3.5) wide. A delicate micropyle cap was observed in few oocysts.

Oocyst residuum absent, but 1 or 2 rounded polar granules are present. Sporocyst elongate ovoidal to boomerang-shaped, 12–15 × 6–8 (13.4 × 6.9); L/W ratio 1.8–2.2 (1.95). Stieda body present, triangular to lozengal, 1.0 high × 1.5 wide. Sub-Stieda and Para-Stieda bodies absent. Sporocyst residuum present, consisting of granules of different sizes. Sporozoites vermiform, with a posterior refractile body and a central nucleus.

Remarks: *Eimeria ferreirai* is different from other coccidian species of Columbidae on in a few aspects (Table 1). In fact, there are few characteristic features, often barely detailed, that differentiate some *Eimeria* spp. from Columbiformes (Ortuzar-Ferreira *et al.* 2020), such as *Eimeria labbeana* (Labbe, 1896) Pinto, 1928, *Eimeria columbarum* Nieschulz, 1935, *Eimeria columbae* Mitra and Das Gupta, 1937, *Eimeria curvata* Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000, *Eimeria janovyi* Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška and Modrý, 2012 and *Eimeria* sp. of Yang *et al.* (2016), which are very similar morphologically and morphometrically, and have ecological compatibility. The presence of micropyle and micropyle cap differentiates *E. ferreirai* from all other *Eimeria* spp.; however, failure to observe this characteristic feature approximates *Eimeria* sp. of Yang *et al.* (2016) of *E. ferreirai*. In this sense, sequencing of the COI gene was performed to complement the identification of *E. ferreirai* and differentiate it from *Eimeria* sp. of Yang *et al.* (2016), which was also molecularly identified by the COI gene.

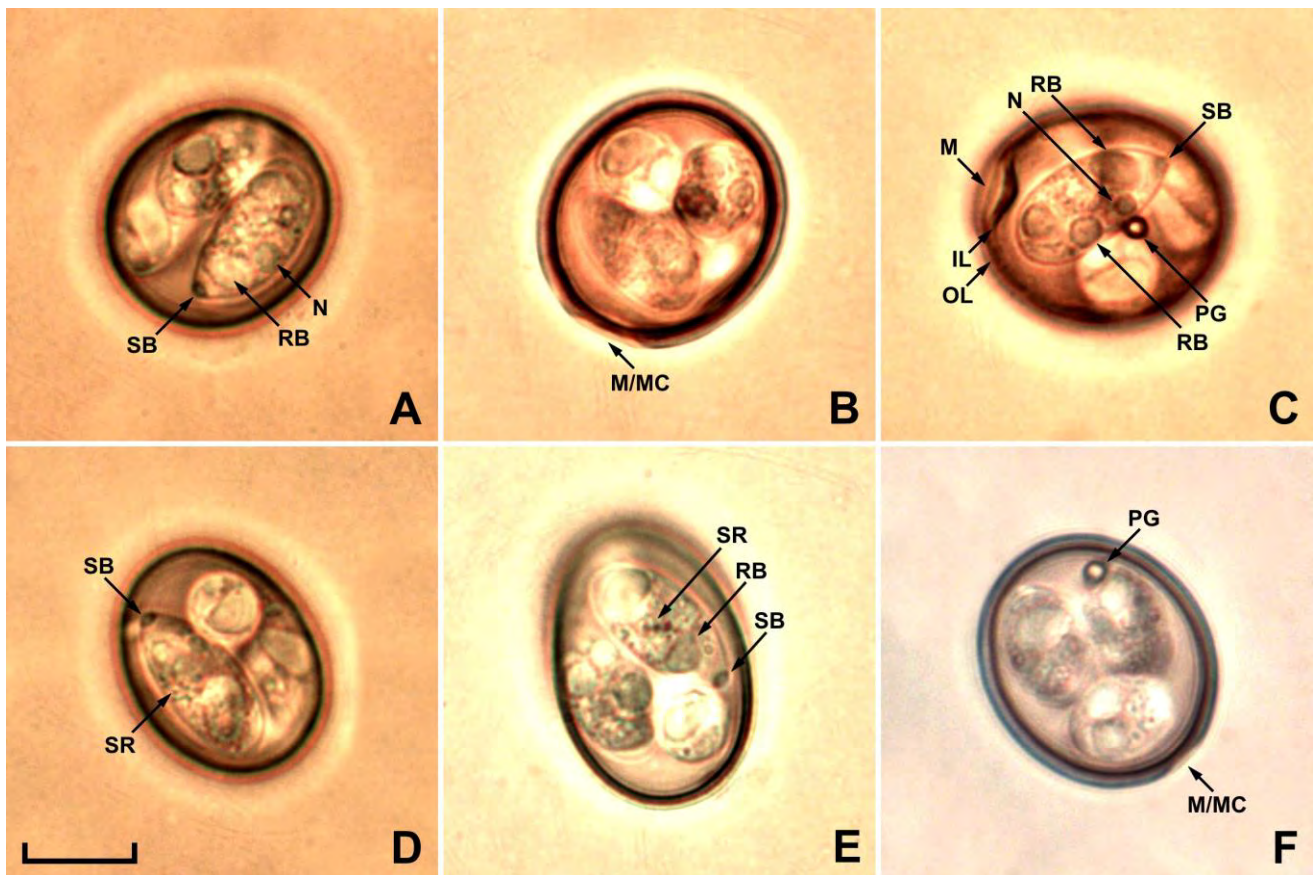


FIGURE 2. Photomicrographs (A–F) of sporulated oocysts of *Eimeria ferreirai* n. sp., a new coccidium species recovered from doves *Leptotila* spp. Note the inner (IL) and outer (OL) layer of the oocyst wall, micropyle (M), micropyle cap (MC), nucleus (N), polar granule (PG), refractile body (RB), Stieda body (SB) and the sporocyst residuum (SR). Scale-bar: 10µm.

Phylogenetic analysis: DNA amplification of the oocysts of *E. ferreirai* recovered from a *L. verreauxi* from Itatiaia National Park showed a clear band of ~250 bp. Phylogenetic analysis included 20 sequences for Eimeriidae species available on GenBank (Fig. 3). *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) was used as the outgroup. *Eimeria ferreirai* had the maximum similarity of only 94.9% with *Eimeria purpureicephali* Yang, Brice and Ryan (2016) (KU140598), which is a coccidian parasite of red-capped parrots *Purpureicephalus spurius* (Kuhl, 1820) (Yang *et al.* 2016). Thus, *E. ferreirai* sat isolated in the cladogram, between clades with *Eimeria* spp. from Psittaciformes and Galliformes, in addition to an *Eimeria* sp. from house mice *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (MH777502), which must be a pseudoparasite (Trefancová *et al.* 2019). Similarity to other *Eimeria* spp. from Columbiformes was low, of 93.5% with *Eimeria* sp. of Yang *et al.* (2016) (KT305929), of 90.9% with *Eimeria columbinae* Ortuzar-

Ferreira and Berto, 2019 (MN082528) (Ortúzar-Ferreira *et al.* 2019) and 93.5% with an *Eimeria* sp. from pigeons (MF496271) which is deposited in GenBank, but yet unpublished.

Discussion

The columbiform birds in Brazil brings together 23 species distributed in all Brazilian biomes, which are Amazon, Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga and Pampas (IUCN 2019). They are granivores and frugivores, eating mainly seeds and small fruits on the soil (Sick 1997). This wide distribution and diversity, in addition to the eating habits that favor the transmission and dispersal of the coccidians, are incompatible with the small number of three coccidian species described so far (Dolnik *et al.* 2010; Berto & Lopes 2013; Ortuzar-Ferreira *et al.* 2020). In this sense, the continuity and regularity of taxonomic works that research the diversity of *Eimeria* spp. in Brazil could potentially reveal new species.

Some morphological variations were observed in the oocysts of *E.ferreirai*: Micropyle was barely discernible in some oocysts, while in other oocysts it was prominent and easily observed; Micropyle cap was observed as a thin and delicate cover in only two oocysts; and sporocysts were observed as boomerang-shaped or elongate ovoidal, even within the same oocyst. All of these variations did not follow a pattern in the oocysts and samples to be identified as different species; therefore, these variations are considered as intraspecific.

Among the *Eimeria* spp. of Columbiformes that were sequenced by the COI gene, *Eimeria* sp. of Yang *et al.* (2016) is the only that shares morphological and morphometric characteristic features close to *E. ferreirai* (Table 1); however, these coccidians were genotypically different and phylogenetically distant (Fig. 3). *Eimeria ferreirai* was closer to *Eimeria* spp. from Galiformes and Psittaciformes than to *Eimeria* spp. from Columbiformes; therefore, these results reinforce the remarks of Ortúzar-Ferreira *et al.* (2019), that *Eimeria* spp. of Columbiformes do not form a monophyletic group, at least not by the COI gene.

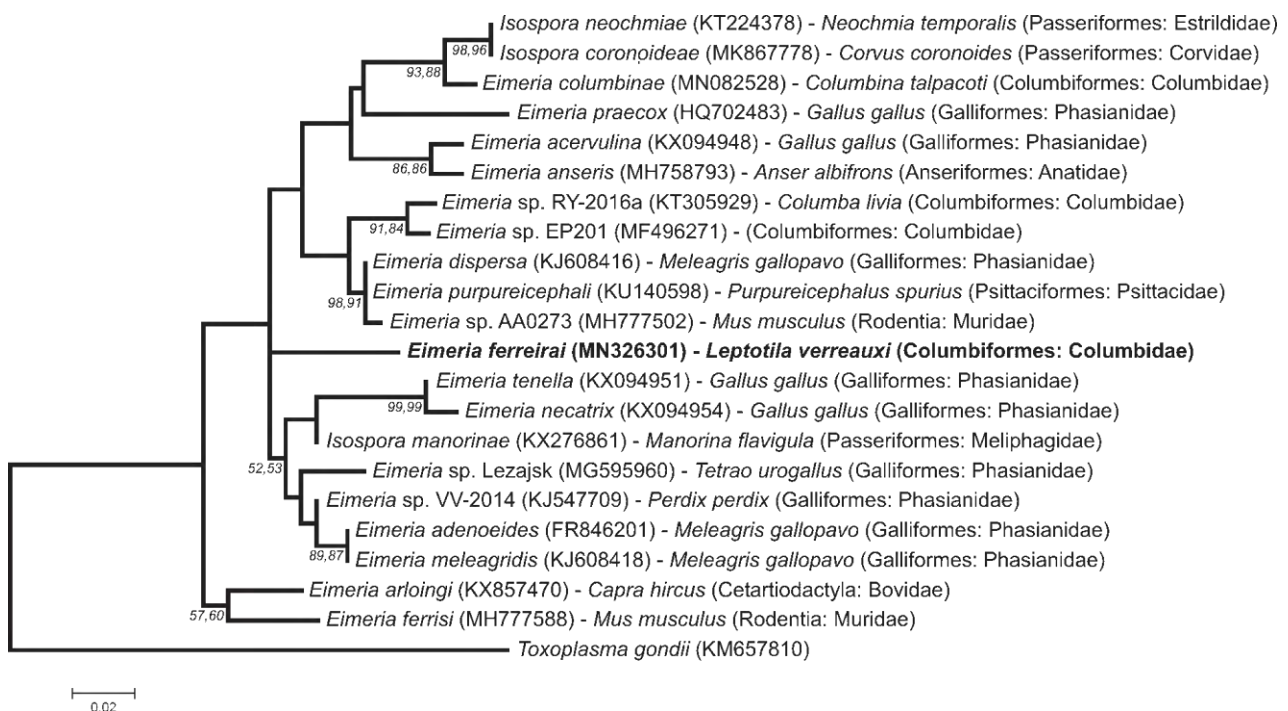


FIGURE 3. Maximum likelihood tree estimated from the COI gene sequences of eimeriid species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

Finally, the comparison of *E. ferreirai* with *Eimeria* spp. recorded in columbiform birds of the World (Table 1) supports the designation as a unique species. Therefore, *E. ferreirai* is considered as new to science, being the twentieth description from Columbiformes.

TABLE 1. Comparative morphology of *Eimeria* spp. recorded from Columbiformes of the World.

Coccidia	Hosts	Locality	References
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	<i>C. livia</i>	Asia, India	Pinto (1928) Nieschulz (1935)
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Asia, India	Nieschulz (1935)
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Asia, India	Mitra and Das Gupta (1937)
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Asia, India	Ray (1952)
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Asia, India	Chatterjee and Ray (1969)
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Bulgaria	Golemansky (1976)
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	<i>Chalcophaps indica</i> (Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	<i>Ducula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)
<i>Eimeria palumbi</i> McQuiston, 1991	<i>Zenaida galapagoensis</i> Gould, 1841	South America Ecuador, Galápagos Islands	McQuiston (1991)
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); <i>Columbina squammata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano <i>et al.</i> (2000)
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	<i>Zenaida auriculata</i> (Des Murs, 1847)	South America, Brazil	Adriano <i>et al.</i> (2003)
<i>Eimeria janovyi</i> Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	<i>C. livia</i>	Asia, India	Bandyopadhyay <i>et al.</i> (2006)
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	<i>C. livia</i>	Asia, Saudi Arabia	Alyousif <i>et al.</i> (2009)
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška and Modrý, 2012	<i>Columba palumbus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Czech and Slovak Republics	Jamriška and Modrý (2012)
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Africa, Madagascar	Ball <i>et al.</i> (2012)
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey and Adams, 2015	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley <i>et al.</i> (2015)
<i>Eimeria</i> sp. of Yang <i>et al.</i> (2016)	<i>C. livia</i>	Oceania, Australia	Yang <i>et al.</i> (2016)
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020	<i>C. talpacoti</i>	South America, Brazil	Ortúzar-Ferreira <i>et al.</i> (2020)
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira and Berto n. sp.	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855; <i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	South America, Brazil	current work

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

Coccidia	Oocysts							
	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum	Micropyle	Polar granule
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	sub-spherical to ovoidal	17–21	16–18	1.0–1.1	smooth	absent	present	present
	sub-spherical to ellipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	smooth	absent	absent	present
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	sub-spherical to ovoidal	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	smooth	absent	absent	present
	sub-spherical to ovoidal	(16.4)	(14.4)	–	–	present	absent	–
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	rhiniform to ellipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	smooth with a lateral dent	absent	present, asymmetrical, with micropyle cap	–
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	sub-spherical	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	present, anterior	present, 1–2
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	ellipsoidal or broadly ovoidal	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	smooth, ~1.5	absent	absent	absent
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	broadly ovoidal	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	smooth, ~1.5	absent	present, 4–6 (5)	present, 2–4
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	broadly ovoidal	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	smooth, 1.5–2.5 (2.0)	absent	inconspicuous	present, 1, ~2.0
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	sub-spherical	19–22 (20)	18–21 (20)	(1.0)	smooth, ~1.0	absent	absent	present, 1, ~2.0
<i>Eimeria palumbi</i> McQuiston, 1991	ovoidal to ellipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0–1.2 (1.16)	smooth, ~2.0	present, round to splin- ter-like granules	absent	absent
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	ovoidal to ellipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1–1.3 (1.2)	smooth, ~1.3	absent	absent	present

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

Coccidia	Oocysts							
	Shape	Length (μm)	Width (μm)	L/W ratio	Wall	Residium	Micropyle	Polar granule
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	sub-spherical	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	(1.2)	rough, ~1.7	absent	absent	present, 1
<i>Eimeria janovyi</i> Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	ellipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	smooth, ~1.1	absent	absent	present, 1, sub-spherical
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	elongate ellipsoidal	19–23 (21)	14–17 (15)	(1.2)	smooth, 1–1.3 (1.2)	present, irregular glo- bules	absent	absent
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška and Modrý, 2012	ellipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0–1.4 (1.26)	smooth, 0.6–1.5 (0.9)	absent	absent	present, 2 ir- regular, ~2.0
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinerton, Jones and Snow, 2012	sub-spherical	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0–1.2 (1.1)	smooth, ~0.8	absent	absent	absent
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey and Adams, 2015	sub-spherical to ovoidal	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1–1.3 (1.2)	smooth, ~1.0	absent	absent	present, 1–2
<i>Eimeria</i> sp. of Yang <i>et al.</i> (2016)	sub-spherical	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	smooth, ~1.0	present	absent	present
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020	sub-spherical to ellipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0–1.2 (1.11)	smooth, 1.0–1.2 (1.1)	present, granules bonded and/or diffused	inconspicuous	absent
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira and Berto n. sp.	sub-spherical to ellipsoidal	19–25 (21.4)	16–21 (18.8)	1.0–1.4 (1.15)	smooth, 1.3–1.9 (1.6)	absent	present, with micropyle cap barely discernible	present, 1–2

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

Coccidia	Sporocysts						
	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	ovoidal	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	present, compacted
	ellipsoidal	–	–	–	present	absent	present
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	ellipsoidal	–	–	–	present	absent	present
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	ellipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	present
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	broadly ovoidal	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	present
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	ovoidal	8–10	–	–	present	–	present, scattered
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	elongate ellipsoidal	11–13	6–8	–	absent	–	present, scattered
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	ovoidal	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	present, prominent	present, small	present, scattered
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	elongate	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	present, prominent, conical	absent	present, compacted, membrane-bounded
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	elongate	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	present	absent	present, compacted
<i>Eimeria palumbi</i> McQuiston, 1991	ellipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	1.8–2.1 (1.9)	present, nipple-like	absent	present, scattered
<i>Eimeria curvata</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2000	elongate	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0–2.2 (2.1)	present, protuberant, nipple-like	absent	present, compacted
<i>Eimeria zenaidae</i> Adriano, Thyssen and Cordeiro, 2003	elongate	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7–1.9 (1.8)	present, large	absent	present, scattered
<i>Eimeria janovyii</i> Bandyopadhyay, Bhakta and Shukla, 2006	pyriform	(12.1)	(10.1)	(1.2)	present, large, prominent	absent	present, scattered
<i>Eimeria livialis</i> Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 2009	ellipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	present, small, nipple-like	absent	present, scattered
<i>Eimeria columbapalumbi</i> Jamriška and Modrý, 2012	elongate ovoidal, slightly asymmetrical	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7–2.2 (1.9)	present	absent	present, scattered

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

Coccidia	Sporocysts						
	Shape	Length (μm)	Width (μm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria mauritiensis</i> Ball, Daszak, Swinnerton, Jones and Snow, 2012	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	present	present	present
<i>Eimeria lyoni</i> Yabsley, Bailey and Adams, 2015	ovoidal	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5– 1.9 (1.7)	present, knob-like	present, rounded	present, scattered, granules of ~1.0
<i>Eimeria</i> sp. of Yang <i>et al.</i> (2016)	elongate ovoidal	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0–2.2 (2.1)	present	absent	present, compacted
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020	ellipsoidal to slightly asymmetrical	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6–2.0 (1.77)	present, flattened to half-moon-shaped	present, rounded	present, scattered
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira and Berto n. sp.	elongate ovoidal to boomerang-shaped	12–15 (13.4)	6–8 (6.9)	1.8–2.2 (1.95)	present, triangular to lozengal	absent	present, scattered

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). MSO, JLG-O and CM have scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). CNO-F has a scholarship from CNPq (Grant/Award Number: 120107/2018-0). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019). We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr. Léo Nascimento; the owner of a country house in the condominium 'Parque das Águas' in the Municipality of Guapimirim, RJ; and the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (Campus Pinheiral), that allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

References


- Adriano, E.A., Thyssen, P.J. & Cordeiro, N.S. (2000) *Eimeria curvata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (1), 53–55.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000100008>
- Adriano, E.A., Thyssen, P.J. & Cordeiro, N.S. (2003) A new species of *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Columbidae) in Brazil. *Acta Protozoologica*, 42 (1), 71–73.
- Alyousif, S.M., Al-Shawa, R.Y. & Al-Asiri, S.S. (2009) *Eimeria livialis* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon, *Columba livia domestica* in Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 39 (2), 383–388.
- Ball, S.J., Daszak, P., Swinnerton, K.R., Jones, C.G. & Snow, K.R. (2012) A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the endangered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 (Columbiformes) in Mauritius. *African Zoology*, 47 (2), 369–372.
<https://doi.org/10.1080/15627020.2012.11407563>
- Bandyopadhyay, P.K., Bhakta, J.N. & Shukla, R. (2006) A new *Eimeria* species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). *Zoos' Print Journal*, 21 (9), 2386–2387.
<https://doi.org/10.11609/JoTT.ZPJ.1445.2386-7>
- Bennett, G.F. & Peirce, M.A. (1990) The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). *Journal of Natural History*, 24 (2), 311–325.
<https://doi.org/10.1080/00222939000770231>
- Berto, B.P. & Lopes, C.W.G. (2013) Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: Ruiz, L. & Iglesias, F. (Eds.), *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. Nova Science Publishers, New York, pp. 47–66.
- Berto, B.P., McIntosh, D. & Lopes, C.W.G. (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23 (1), 1–15.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>
- Chatterjee, D.K. & Ray, H.N. (1969) On *Eimeria kapotei* n. sp., from the domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. *Proceedings of the 56th Indian Science Congress*, 56, 512.
- Dolnik, O.V., Palinauskas, V. & Bensch, S. (2009) Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *Journal of Parasitology*, 95, 169–174.
<https://doi.org/10.1645/GE-1873.1>
- Dolnik, O.V., Dolnik, V.R. & Bairlein, F. (2010) The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, 98 (1), 97–103.
<https://doi.org/10.5253/078.098.0112>
- Duszynski, D.W. & Wilber, P. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83 (2), 333–336.
<https://doi.org/10.2307/3284470>
- Golemansky, V. (1976) Three new coccidian species (Coccidia: Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. *Acta Protozoologica*, 15 (4), 399–404.
- ICMBIO (2018a) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia> (accessed 21 August 2019)
- ICMBIO (2018b) Parque Nacional Serra dos Órgãos. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/pamaserradosorgaos> (accessed 21 August 2019)
- ICZN (2012) International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. *Zookeys*, 219, 1–10.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.219.3994>
- IUCN (2019) International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Available from: <http://www.iucnredlist>.

org (accessed 21 Aug 2019)

- Jamriška, J. & Modrý, D. (2012). A new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae) *Acta Protozoologica*, 51 (4), 329–333.
<https://doi.org/10.4467/16890027AP.12.026.0786>
- McQuiston, T.E. (1991) *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaidura galapagoensis*). *Transactions of the American Microscopical Society*, 110 (2), 78–181.
<https://doi.org/10.2307/3226755>
- Mitra, A.N. & Das-Gupta, M. (1937) On a species of *Eimeria* (Coccidia-Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. *Proceedings of the 24th Indian Science Congress Association*, 24, 291.
- Nieschulz, O. (1935) Ueber Kokzidien der Haustauben. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitologie, Infektionskrankheiten, und Hygiene*, 134, 390–393.
- Ortúzar-Ferreira, C.N., Oliveira, M.S., Genovez-Oliveira, J.L., Franco, H.A., Thode-Filho, S., Oliveira, A.A., Lima, V.M., Ferreira, I. & Berto, B.P. (2020) Coccidia of Columbiformes of the World: A taxonomic review of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. *Parasitology Research*, 119, 329–333.
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06514-4>
- Pinto, C. (1928) Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* (Eimeridia, Sporozoa). *Comptes Rendus de la Societe de Biologie*, 98, 1564–1565.
- Ray, D.K. (1952) On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae* n. sp., from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). *Journal of Parasitology*, 38 (6), 546–547.
<https://doi.org/10.2307/3273980>
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp.
- Sigrist, T. (2014) *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. Avis Brasilis, São Paulo, 608 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8), 1596–1599.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Trefančová, A., Máčová, A. & Kvičerová, J. (2019) Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): Real parasites, or pseudoparasites? *Protist*, 170 (1), 104–120.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.12.002>
- Varghese, T. (1978) *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the greenwinged ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* Gould) in Papua New Guinea. *Journal of Parasitology*, 64 (2), 312–314.
<https://doi.org/10.2307/3279680>
- Varghese, T. (1980) Coccidian parasites of birds of the avian order Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. *Parasitology*, 80, 183–187.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000000640>
- Williams, R.B., Thebo, P., Marshall, R.N. & Marshall, J.A. (2010) Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology*, 76 (1), 69–76.
<https://doi.org/10.1007/s11230-010-9234-2>
- Yabsley, M.J., Bailey, K. & Adams, H.C. (2015) A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the mourning dove, *Zenaidura macroura* (Columbiformes: Columbidae). *Comparative Parasitology*, 82 (2), 231–234.
<https://doi.org/10.1654/4769.1>
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A. & Ryan, U. (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 159, 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.020>
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A. & Ryan, U. (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa: Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. *Experimental Parasitology*, 166, 124–130.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.009>
- Yang, R., Brice, B., Elliot, A. & Ryan, U. (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria purpureicephali* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in a red-capped parrot (*Purpureicephalus spurius*, Kuhl, 1820) in Western Australia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5 (1), 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.003>



Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America

Mariana S. Oliveira¹ · Ericson R. de Mello² · Sergian V. Cardozo³ · Águida A. Oliveira⁴ · Viviane M. Lima⁴ · Ildemar Ferreira⁴ · Bruno P. Berto⁴ 

Received: 12 February 2021 / Accepted: 24 March 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Woodcreepers are passerines of the family Dendrocolaptidae, which have a high forest dependency. The current work aimed to redescribe *Isospora striata* McQuiston et al. 1997, from two new hosts in protected areas in Brazil, revealing new localities of parasitism, in addition to providing preliminary genotypic identifications via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene from both host species. *Isospora striata* has oocysts that are subspheroidal to ovoidal, 19.4 × 16.8 μm with smooth wall. Oocyst residuum is absent, but micropyle and polar granules are present. Sporocysts are ovoidal, 13.6 × 8.3 μm, with both Stieda and sub-Stieda bodies. Sporocyst residuum is present and sporozoites with refractile body, nucleus, and striations. The morphological study and the 100% similarity in sequencing of the COI gene between samples of different dendrocolaptid species confirmed the identification of a single species, supporting the identification of *I. striata* in the Brazilian Atlantic forest and consequently the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical Region.

Keywords Taxonomy · Morphology · Sequencing · Coccidia · Oocysts · Passeriformes · Parque Nacional de Itatiaia · Parque Nacional da Serra dos Órgãos · Brazil

Introduction

Woodcreepers are passerines of the family Dendrocolaptidae, which brings together 52 species distributed predominantly in

forest environments in the Neotropical Region (Marantz et al. 2003). Dependence on forest environments causes dendrocolaptid species to suffer population decline and even local extinction in altered forests and forest fragments (Marantz et al. 2003; IUCN 2020). In the Atlantic Forest of the Southeast and South of Brazil, several studies confirm this vulnerability of the woodcreepers to anthropogenic changes, notably forest fragmentation (Aleixo and Vielliard 1995; Christiansen and Pitter 1997; Bornschein and Reinert 2000).

These birds feed predominantly on large insects, small vertebrates, snails, and bird eggs that nest in tree cavities. They also regularly follow mixed flocks and army ants, foraging in all strata as dominant species (Sick 1997; Piacentini et al. 2015). This predominantly insectivorous feeding habit potentially reduces these birds the fecal-oral transmission of parasites, unlike frugivorous birds (Dolnik et al. 2010). Among the various parasites in this context, the coccidian protozoans can be highlighted due to its great importance for biodiversity and conservation of birds.

To date, six coccidian species are recorded from Neotropical woodcreepers, but none of them in Brazil. In this sense, the current work aimed to redescribe *Isospora striata* McQuiston et al. 1997, from two new hosts in protected areas in Brazil,

Section Editor: Nawal Hijjawi

* Bruno P. Berto
berto.ufrj@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brazil

⁴ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

revealing new localities and the wide distribution of this coccidian species in the Neotropical Region. Additionally, the present study will provide preliminary genotypic identifications via sequencing of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene from both host species.

Materials and methods

Sample collection

Eight expeditions were conducted in two Brazilian federal conservation units in Southeastern Brazil: (1) Itatiaia National Park, a protected area with a high degree of vulnerability, located in the Serra da Mantiqueira on the border of the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo (ICMBIO 2020a); and (2) Serra dos Órgãos National Park, another protected area created for biodiversity conservation of the Serra do Mar in the mountainous region of the State of Rio de Janeiro (ICMBIO 2020b). The first six expeditions were conducted on March (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) and April (22°27'52.0"S, 44°36'26.0"W) 2015, October (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) 2016, April (22°27'20.6"S, 44°36'28.6"W) 2017, and May (22°27'40.3"S, 44°35'31.9"W) and August (22°26'57.0"S, 44°36'25.0"W) 2018 in the Itatiaia National Park, and the last two expeditions were conducted on February (22°27'23.8"S, 42°59'58.7"W) and August (22°27'29.0"S, 43°00'08.8"W) 2019 in the Serra dos Órgãos National Park. Mist nets were used for the capture of the birds. Sixteen plain-winged woodcreepers *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) in the Itatiaia National Park and two white-throated woodcreepers *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) in the Serra dos Órgãos National Park were captured. The captured birds were specifically identified (Sigrist 2014) and photographed. Subsequently, the birds were kept in individual boxes lined with clean paper until defecation, when they were released at the same place of capture. Each fresh droplet of feces from each individual bird was placed individually in a centrifuge tube with a potassium dichromate 2.5% (K₂Cr₂O₇) solution.

Morphological analyses

Samples were transported to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were incubated in the centrifuge tubes and regularly oxygenated by shaking, at room temperature (~25 °C) for 10 days or until ~70% of the oocysts were sporulated. Oocysts were isolated by flotation in Sheather's sugar solution (Specific gravity: 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014a). Morphological observations, line drawings, photomicrographs, and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope

(Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera Eureka 5.0 (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings were edited using two software applications from CorelDRAW® (Corel Draw Graphics Suite, Version 11.0, Corel Corporation, Canada), i.e., Corel DRAW and Corel PHOTO-PAINT. All measurements are in micrometers and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Molecular analyses

Individual oocysts identified with the same characteristic features under light microscopy were isolated, resuspended in PBS, and washed by centrifuging until the supernatant became clear (Dolnik et al. 2009). DNA was extracted from the oocysts using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. In order to fully lyse the oocysts, four freeze-thaw cycles were applied prior to the DNA extraction. The PCR amplification for the COI gene was carried out using a nested PCR, as previously described by Dolnik et al. (2009) and Yang et al. (2015). The external primers COIbF1 (5'-GWT CAT TAG TAT GGG CAC ATC A-3') and COIbR1 (5'-CCA AGA GAT AAT ACR AAR TGG AA-3') produced a PCR product of 302 bp in size. The internal primers COIbF2 (5'-GGG CAC ATC ATA TGA TGA C-3') and COIbR2 (5'-ATA GTA TGT ATC ATG TAR WGC AA-3') produced an amplicon of 257 bp in size. The PCR reaction contained 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) (1×), 0.25 µL of each primer (0.2 µM), 3 µL of DNA (for primary reaction) or 3 µL of primary PCR product (for the secondary reaction), and 9 µL of nuclease-free water. Both primary and secondary PCR were conducted using the same cycling conditions: 1 cycle of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 47 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplicons from the second round of PCR were purified using the Qiagen MinElute PCR Purification (Qiagen, São Paulo, Brazil).

DNA sequence analyses

All PCR products were sequenced using the PCR forward and reverse primers by Ludwig Biotechnology, using an ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) for Sanger sequencing. The results of the sequencing reactions were analyzed and edited using the program Chromas 2.6. Sequences were compared to each other and with other coccidian parasites available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic trees were constructed for coccidian species at the COI sequences for additional isolates from GenBank. Alignment and parsimony analyses were conducted using MEGA version 7 (Tamura et al. 2007). The evolutionary history was inferred using the neighbor joining (NJ)

and maximum likelihood (ML) methods, and the distances were computed using the Tamura-Nei method based on model selection using ModelTest in MEGA 7. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying neighbor joining and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood approach and then selecting the topology with superior log likelihood value. Bootstrap analyses were conducted using 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree topologies.

Results

Prevalence and identification

Sixteen *D. turdina* from the Itatiaia National Park were examined, and 9 were positive for coccidian oocysts. The two *X. albicollis* captured in the Serra dos Órgãos National Park were also positive. These oocysts from both host species, after sporulation, were morphologically identified as *I. striata*. This material is described below.

- *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Figs. 1 and 2a-j)
- Kingdom: Chromista Cavalier-Smith, 1981
- Phylum: Miozoa Cavalier-Smith, 1987
- Infraphylum: Apicomplexa Levine, 1970
- Class: Coccidiomorpha Doflein, 1901
- Subclass: Coccidia Leuckart, 1879
- Family: Eimeriidae Minchin, 1903
- Genus: *Isospora* Schneider, 1881

Oocyst ($n = 88$) subspheroidal to ovoidal, $16\text{--}23 \times 13\text{--}21$ (19.4×16.8); length/width (L/W) ratio 1.0–1.4 (1.16). Wall bi-layered, 1.1–1.5 (1.3) thick, outer layer smooth, $c.2/3$ of total thickness. Micropyle delicate or inconspicuous, 2.8–7.1 (4.2) wide. Oocyst residuum is absent, but 1–3 polar granules are present. Sporocyst ovoidal, $11\text{--}16 \times 6\text{--}10$ (13.6×8.3); L/W ratio 1.5–2.0 (1.64). Stieda body is present, protruding, rounded to knob-like, $1.1\text{--}2.1$ high \times $1.2\text{--}1.6$ wide (1.3×1.4). Sub-Stieda body is present, rectangular to rounded, and lying directly beneath the Stieda body, $1.0\text{--}1.4$ high \times $1.4\text{--}2.2$ wide (1.2×1.9). Para-Stieda body is absent. Sporocyst residuum is present, consisting of granules partially bound and/or diffused. Sporozoites vermiform, with posterior refractile body, central nucleus, and striations.

Taxonomic summary

Hosts: *Dendrocincla turdina* (Lichtenstein, 1820) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Sittasominae),

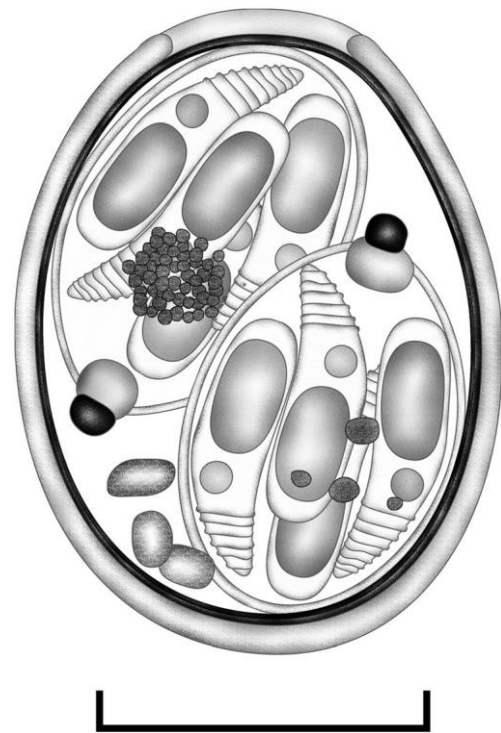


Fig. 1 Composite line drawing of the sporulated oocyst for redescription of *Isospora striata* from woodcreepers in the Brazilian Atlantic forest. Scale bar: 10 μ m

plain-winged woodcreeper; *Xiphocolaptes albicollis* (Vieillot, 1818) (Aves: Passeriformes: Tyranni: Dendrocolaptidae: Dendrocolaptinae), white-throated woodcreeper.

Localities: Itatiaia National Park ($22^{\circ}27'S$, $44^{\circ}35'W$) and Serra dos Órgãos National Park ($22^{\circ}27'S$, $43^{\circ}00'W$), both from Southeastern Brazil.

Specimens: Photomicrographs, line drawing, and oocysts in 2.5% $K_2Cr_2O_7$ solution (Williams et al. 2010) are deposited at the Museu de Zoologia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, under accession numbers MZURPTZ2020026 (*D. turdina*) and MZURPTZ2020027 (*X. albicollis*). Photomicrographs are also deposited and available (<http://r1.ufrrj.br/labicoc/colecao.html>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under repository numbers 110/2020 (*D. turdina*) and 111/2020 (*X. albicollis*). Photovouchers of the host specimens are deposited in the same collection.

Representative DNA sequence: DNA amplification of the COI gene showed clear bands around ~ 250 bp. Representative sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers MW582619 (*D. turdina*) and MW582620 (*X. albicollis*).

Site of infection: Unknown.

Prevalence: 61% (11/18) in total; 56% (9/16) for *D. turdina*; and 100% (2/2) for *X. albicollis*.

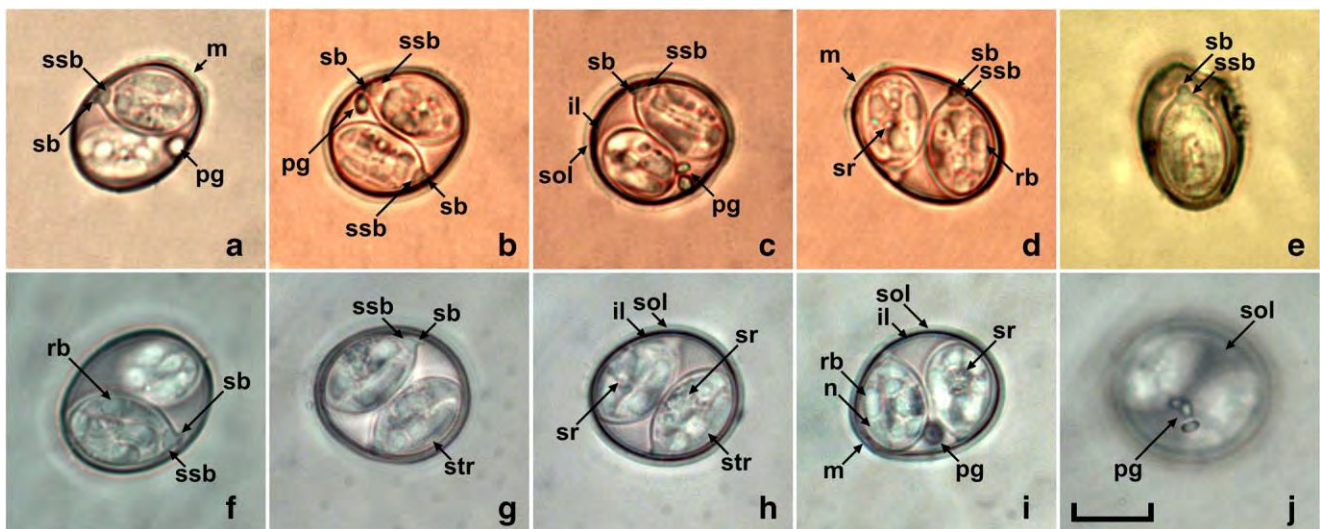


Fig. 2 Photomicrographs of *Isospora striata* recovered from plain-winged woodcreepers *Dendrocincla turdina* (a-e) and white-throated woodcreepers *Xiphocolaptes albicollis* (f-j). Note the inner (il) and the smooth outer (sol) layer of the oocyst wall, micropyle (m), nucleus (n),

polar granules (pg), refractile body (rb), sporocyst residuum (sr), Stieda body (sb), and sub-stieda (ssb) bodies and striations (str). Scale bar: 10 μ m

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis based on the COI gene included sequences from coccidians available in GenBank (Fig. 3). *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet, 1891) was used as the outgroup. *Isospora striata* from *D. turdina* and *X. albicollis* were 100% identical and sat in a clade with the similarity of 99% with *Isospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira, and Lopes, 2009, which is a parasite of tyrant-flycatchers

(Tyranni: Tyrannoidea) in Brazil (Ortúzar-Ferreira et al. 2021). *Isospora striata* was also close to other *Isospora* spp. of neotropical suboscine passerines (Tyranni), such as *Isospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992, of antbirds (Thamnophilidae) with 96% similarity (Silva-Carvalho et al. 2018) but also with neotropical oscine passerines (Passeri), such as *Isospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira and Lopes, 2014, of thrushes (Turdidae) with 97% similarity (Genovez-Oliveira et al. 2020), in addition to

Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI gene sequences of *Isospora* species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for neighbor joining (NJ) and maximum likelihood (ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

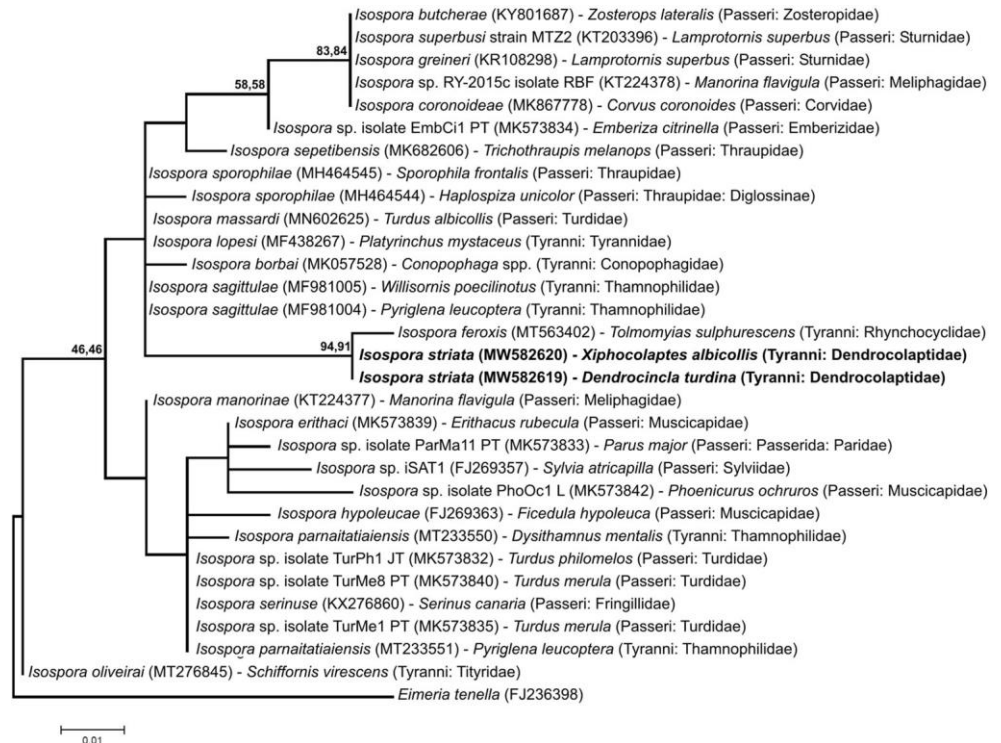


Table 1 Comparative morphology of *Isoospora* spp. recorded from woodcreepers (Dendrocolaptidae)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residium	Micropyle
<i>Isoospora concentrica</i> McQuiston and Caparella, 1995	<i>Dendrocolaptes certhia</i> (Boddaert, 1783)	South America, Equador	McQuiston and Caparella (1995)	Ovoid	24-30 (26.9)	21-25 (22.7)	1.04-1.38	Smooth	Absent	Absent
<i>Isoospora magna</i> McQuiston and Caparella, 1995	<i>D. certhia</i>	South America, Equador	McQuiston and Caparella (1995)	Ovoidal	26.0-31.0 (29.7)	23.0 - 26.0 (24.9)	1.08-1.30 (1.20)	Smooth	Absent	Absent
<i>Isoospora ocellati</i> McQuiston, Walden and Caparella, 1997	<i>Xiphorhynchus ocellatus</i> (Spix, 1824)	South America, Equador	McQuiston et al. (1997)	Ovoidal	18-21 (20.0)	15-19 (17)	1-1.3 (1.2)	Smooth	Absent	Absent
<i>Isoospora striata</i> McQuiston, Walden and Caparella, 1997	<i>X. ocellatus</i> (Spix, 1824)	South America, Equador	McQuiston et al. (1997)	Ovoidal	16-20 (18)	15-17 (16)	1.1-1.2 (1.2)	Smooth	Absent	Absent
	<i>Xiphocolaptes albicollis</i> (Vieillot, 1818); <i>Dendrocincla turdina</i> (Lichtenstein, 1820)	South America, Brazil	Current work	Subspheroidal to ovoidal	16-23 (19.4)	13-21 (16.8)	1.0-1.4 (1.2)	Smooth	Absent	Present, inconspicuous
<i>Isoospora ubique</i> McQuiston and Caparella, 1997	<i>Glyphorhynchus spirurus</i> (Vieillot, 1819)	South America, Equador	McQuiston and Caparella (1997)	Subspherical	21 -27 (23.4)	19-24 (21.8)	1.00-1.23 (1.07)	Smooth	Absent	Absent
<i>Isoospora dendrocinclae</i> McQuiston, Galewsky and Caparella, 2010	<i>Dendrocincla merula</i> (Lichtenstein, 1820)	South America, Guyana	McQuiston et al. (2010)	Subspherical to ovoid	15-23	14.5-19	1.1-1.3 (1.2)	Smooth	Absent	Absent

Coccidia	Oocysts	Sporocysts						Sporozoites			
	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residium	Refractile body	Nucleus	Striations
<i>Isoospora concentrica</i> McQuiston and Caparella, 1995	Present	Ovoid to ellipsoidal	15.0-18.0 (17.2)	9.0-12.0 (11.0)	1.42-1.70 (1.56)	Block-shaped	Ovoidal or bubble-shaped	Present, compact	Present, 1 posterior	Present	Present
<i>Isoospora magna</i> McQuiston and Caparella, 1995	Subspherical to ovoid	Ovoidal	15.0-20.0 (15.8)	11.0-14.0 (12.6)	1.07-1.82 (1.28)	Broad, dome-like	Inconspicuous	Composed of uniform	Present, 2	Present	Absent
<i>Isoospora ocellati</i> McQuiston, Walden and Caparella, 1997	Ovoid to subspherical	Ovoidal	11-13 (12)	7-9 (8)	1.2-1.7 (1.5)	Dome or bubble-like	Elipsoidal	Composed	Present, 1 posterior	Present	Absent
<i>Isoospora striata</i> McQuiston,	Spherical	Ovoidal	11-12 (11)	7-8 (8)	1.4-1.5 (1.4)	Protruding and nipple-like	Rectangular	Compact, spherical	Present, 1 posterior	Present	Present
		Ovoidal	11-16 (13.6)	6-10 (8.3)	1.5-2.0 (1.6)					Present	Present

Table 1 (continued)

Walden and Caparella, 1997	Subspherical to ellipsoidal, 1-3	Ovoidal	14-16 (14.8)	9-11 (10.1)	1.36-1.67 (1.46)	Protruding, rounded to knob-like Nipple-like	Rectangular to rounded	Compact or diffused	Present, 1 posterior	Present	Absent
<i>Isoospora ubique</i> McQuiston and Caparella, 1997	Ovoid	Ovoidal	14-16 (14.8)	9-11 (10.1)	1.36-1.67 (1.46)	Nipple-like	Absent	Composed	Present, 1 posterior	Present	Absent
<i>Isoospora dendrocinclae</i> McQuiston, Galewsky and Caparella, 2010	Subspherical	Ovoid	12-14	7-10	1.6-1.8 (1.7)	Small and knob-like	Slightly larger and subglobular	Subspherical	Present, 1 posterior	Present	Absent

other *Isoospora* spp. from other distant zoogeographic regions, such as *Isoospora coronoidae* Liu et al. 2019, from Australian ravens *Corvus coronoides* Vigors and Horsfield, 1827 (Passeri: Corvidae) from Australia with 95% similarity (Liu et al. 2019).

Discussion

In Brazil, Passeriformes brings together 37 families distributed in all Brazilian biomes (Atlantic Forest, Amazon, Pantanal, Caatinga, Cerrado, and Pampa), comprising more than half of all birds. Dendrocolaptidae comprises 14 genera and 43 species known as “arapaçus” in Brazil (Piacentini et al. 2015). Despite this great diversity, the current work reports for the first time an *Isoospora* sp. from Brazilian woodcreepers. The low density and prevalence expected from insectivorous birds (Dolnik et al. 2010) could justify this first report in Brazilian woodcreepers only in 2020; however, contrary to what was expected, the prevalence was reasonably high in the current study (61%), even with the low number of woodcreepers analyzed.

Isoospora striata was originally described from ocellated woodcreepers *Xiphorhynchus ocellatus* (Spix, 1824) in the province of Morona-Santiago, about 5 km southwest of Taisha, in Ecuador (McQuiston et al. 1997). The oocysts identified in the current study were morphologically compatible with this original description by McQuiston et al. (1997); with the exception of the presence of the micropyle and other minor differences in size and shape of some characteristic features (Table 1). The micropyle identified in the oocysts of the current work is delicate and inconspicuous, being difficult to observe in most oocysts; therefore, it must have been unobserved by McQuiston et al. (1997). The differences in the morphometry might be justified by the greater number of oocysts measured in the current study, in addition to the greater number of host species and specimens (Sampaio 2002; Berto and Lopes 2020). The morphometric comparison between the oocysts of the two hosts of the current work was suppressed, due to the low number of oocysts and hosts *X. albicollis* in relation to *D. turdina*, which would weaken any statistical analysis. In any case, the morphometric differences between current and original work of McQuiston et al. (1997) were mainly associated with the measured ranges, while the means were closer. In fact, the main characteristic features that guided the identification as *I. striata* in the current work were the striations in the sporozoites and the rectangular sub-Stieda body, which were exceptionally highlighted by McQuiston et al. (1997) for being the main distinctive features of *I. striata* in comparison to the other *Isoospora* spp. recorded from Dendrocolaptidae (Table 1).

The hosts of the current study, *D. turdina* and *X. albicollis*, and the host of the original description of *I. striata*,

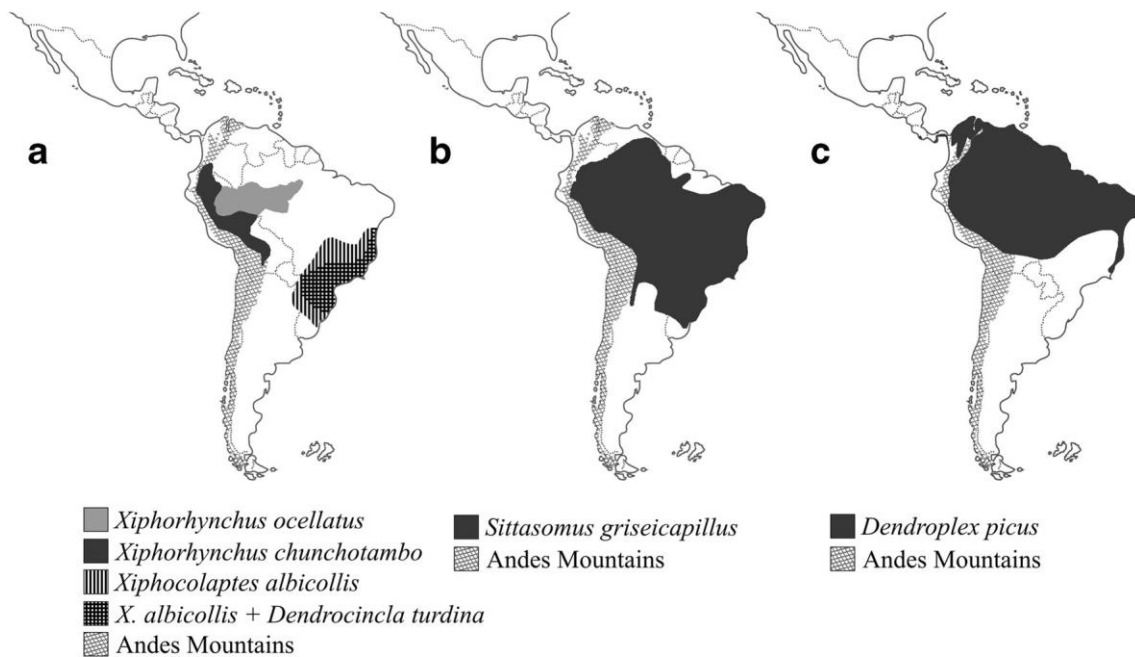


Fig. 4 Geographic range of the dendrocolaptid hosts of *Isospora striata* in the Neotropical Region [based on data from IUCN 2020]. *Xiphorhynchus chunchotambo* and *Xiphorhynchus ocellatus* are distributed in the Amazon. The news hosts *Xiphocolaptes albicollis* and *Dendrocincla turdina* have geographic ranges in the Atlantic Forest in

southeastern Brazil (a). *Sittasomus griseicapillus* (b) and *Dendroplex picus* (c) are examples of woodcreepers with wide Neotropical geographic ranges that are sympatric with *X. chunchotambo*, *X. ocellatus*, *X. albicollis*, and *D. turdina*

X. ocellatus, are not sympatric. In fact, the original host identified by McQuiston et al. (1997) is potentially the current Tschudi's woodcreeper *Xiphorhynchus chunchotambo* (von Tschudi, 1844), which was previously classified as a subspecies of *X. ocellatus*. Nevertheless, currently, only *X. chunchotambo* has distribution in Ecuador, while *X. ocellatus* is restricted to the Brazilian and Peruvian Amazon, being slightly sympatric with *X. chunchotambo* in the Brazilian States of Acre and Rondônia (Fig. 4). At the opposite end in South America, *D. turdina* and *X. albicollis* are distributed strictly in the Atlantic Forest.

Thus, the non-sympatry of these hosts could be incompatible with the identification of *I. striata* in the current study, since the transmission of *Isospora* spp. is fecal-oral and, therefore, depends on the minimum sympatry for there to be transmission/dispersion of its oocysts; however, as assumed in the studies by Berto et al. (2014b), Silva et al. (2017), and Silva-Carvalho et al. (2018), susceptible hosts with wide geographic distributions in South America could transmit *I. striata* to a wide range of sympatric susceptible hosts. In this way, the eastern olivaceous woodcreeper *Sittasomus griseicapillus* (Vieillot, 1818) and straight-billed woodcreeper *Dendroplex picus* (Gmelin, 1788) can be potential transmitters/dispersers of *I. striata* in South America, since they have wide geographical distributions and are sympatric with *X. ocellatus*/*X. chunchotambo*, *D. turdina*, and *X. albicollis* (Fig. 4). It is worth mentioning that this

assumption is based on the concept of specificity at the host family level, which has been widely accepted in the numerous studies of coccidian taxonomy (Duszynski and Wilber 1997; Berto et al. 2011).

The genotypic similarity of 100% at the COI gene between the samples of *D. turdina* and *X. albicollis* confirms the identification of a single species of these hosts and reinforces the identification of *I. striata* in the Brazilian Atlantic forest, because if this species can parasitize woodcreepers of different species, potentially this species must be widely distributed within the geographic ranges of neotropical woodcreepers (Fig. 4) (Berto and Lopes 2020).

The phylogenetic analysis of Fig. 3 does not allow further conclusions about the origin or aspects of monophyletic groups, since *Isospora* spp. from passerines of different families and suborders, from different and distant zoogeographic regions and with different characteristics sat in the same clades. Indeed, the use of a single gene for genotypic identification of *Isospora* spp. does not allow a more detailed phylogenetic characterization (Yang et al. 2021); in any case, the COI gene has been the most indicated for species confirmation (Ogedengbe et al. 2011, Yang et al. 2015, Silva-Carvalho et al. 2018) and the most used for genotypic and phylogenetic studies of *Isospora* spp., possibly due to the favorable extraction and amplification of mitochondrial genes, which are in a greater number of copies, from individual oocysts (Dolnik et al. 2009).

Finally, based on the morphological and molecular features described above, *I. striata* is redescribed in the current work, documenting two new hosts, *D. turdina* and *X. albicollis*, and new localities in the Brazilian Atlantic forest, the Itatiaia National Park and the Serra dos Órgãos National Park.

Acknowledgements We are thankful to staff at the Parque Nacional do Itatiaia, mainly to the research coordinator Dr Léo Nascimento, and the Parque Nacional da Serra dos Órgãos, mainly to the research coordinator Dr Jorge Nascimento (Julião), who allowed us to access and use some facilities during the expeditions.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). MSO has a scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has a fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019).

Declarations

Ethical approval Field-collecting permits were issued by SISBIO/ICMBio (licenses 45200; 49605; 54951; 61126) and CEUA/UFRRJ (protocols IV-036/2014; ICBS-008/2015; IV-6606250616). All applicable institutional, national, and international guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Aleixo A, Vielliard J (1995) Composição e dinâmica da avifauna da mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool* 12: 493-511
- Berto BP, Lopes CWG (2020) Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: some approaches on parasite-host-environment interaction. *J Parasitol* 106:707-713
- Berto BP, Flausino W, McIntosh D, Teixeira-Filho WL, CWG L (2011) Coccidia of new world passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isoospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst Parasitol* 80:159-204
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014a) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev Bras Parasitol Vet* 23:1-15
- Berto BP, Lopes BB, Melinski RD, Souza A, Ribas C, Abreu F, Ferreira I, Lopes CWG (2014b) Coccidial dispersion across *trans*- and *cis*-Andean antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae): *Isoospora sagittulae* McQuiston and Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from non-sympatric hosts. *Can J Zool* 92:383-388
- Bornschein MR, Reinert BL (2000) Aves de três remanescentes florestais do norte do Estado do Paraná. *Rev Bras Zool* 17:615-636
- Christiansen B, Pitter E (1997) Species loss in a forest bird community near Lagoa Santa in southeastern Brazil. *Biol Conserv* 80:23-32
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isoospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. *J Parasitol* 95:169-174
- Dolnik OV, Dolnik VR, Bairlein F (2010) The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98:97-103
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 83:333-336
- Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Morphological and molecular identification of *Isoospora massardi* Lopes, Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) in South America. *Parasitol Int* 75:102040
- ICMBIO (2020a) Parque Nacional do Itatiaia. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>>. Accessed 02 Jul 2020
- ICMBIO (2020b) Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Available from: <<https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>>. Accessed 02 Jul 2020
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed 02 Aug 2020
- Liu D, Brice B, Elliot A, Ryan U, Yang R (2019) *Isoospora coronoidae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Australian raven (*Corvus coronoides*) (Passeriformes: Corvidae) (Linnaeus, 1758) in Western Australia. *Parasitol Res* 118:2399-2408
- Marantz CA, Aleixo A, Bevier LR, Patten MA (2003) In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (eds) Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). *Handbook of the birds of the world*. Lynx Edicions, Barcelona, pp 358-447
- McQuiston TE, Capparella A (1995) Two new isosporan parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from the South American woodcreeper *Dendrocolaptes certhia*. *Acta Protozool* 34:299-302
- McQuiston TE, Capparella A (1997) *Isoospora ubique*: a new coccidian parasite from the wedge-billed woodcreeper (*Glyphorhynchus spirurus*) from South America. *Acta Protozool* 36:75-78
- McQuiston TE, Walden KKO, Capparella AP (1997) Two new species of *Isoospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the ocellated woodcreeper, *Xiphorhynchus ocellatus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae). *Arch Protistenkd* 147:401-404
- McQuiston TE, Galewsky S, Capparella AP, Rebling F (2010) *Isoospora dendrocinclae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the whitechinned woodcreeper (*Dendrocincla merula*) from South America. *Acta Protozool* 49:121-124
- Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *Int J Parasitol* 41: 843-850
- Ortúzar-Ferreira CN, Mello ER, Melo JO, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2021) Redescription and molecular identification of *Isoospora feroxis* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. *Syst Parasitol* [in press]
- Piacentini VDQ, Aleixo A, Agne CE, Maurício GN, Pacheco JF, Bravo GA, Brito GRR, Naka LN, Olmos F, Posso S, Silveira LF, Betini GS, Carrano E, Franz I, Lees AC, Lima LM, Pioli D, Schunck F, Amaral FR, Bencke GA, Cohn-Haft M, LFA F, Straube FC, Cesari E (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Rev Brasil Ornitol* 23:91-298
- Sampaio IBM (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte, FEP MVZ Editora, 265pp
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 862 pp
- Sigrist T (2014) *Guia de Campo: Avifauna Brasileira*. São Paulo, Avis Brasilis, 608 pp
- Silva LM, Rodrigues MB, Pinho IF, Lopes BB, Luz HR, Ferreira I, Lopes CWG, Berto BP (2017) Some remarks on the distribution and dispersion of coccidia from icterid birds in South America: *Isoospora guaxi* n. sp. and *Isoospora bellicosa* Upton, Stamper & Whitaker, 1995 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the red-rumped cacique *Cacicus*

- haemorrhous* (L.)(Passeriformes: Icteridae) in Southeastern Brazil. *Syst Parasitol* 94:151-157
- Silva-Carvalho LM, Pastura DG, Rodrigues MB, Gomes JV, Oliveira MS, Siqueira PB, Genovez-Oliveira JL, Soares SS, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2018) *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitol Res* 117:2635-2641
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Syst Parasitol* 76:69-76
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Exp Parasitol* 159:59-66
- Yang R, Brice B, Liu Q, Berto BP, Austen J, Ryan U (2021) Morphological and genetic characterization of the first *Isospora* species (*I. lugensae* n. sp.) from a Kerguelen petrel (*Lugensa brevirostris*). *Parasitol Res* 120:1037-1047

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal

Mariana S. Oliveira¹ · David Wilson Ramilo^{2,3} · Ericson R. Mello⁴ · Sergian V. Cardozo⁵ · Inês Caetano⁶ · Erica Brazio⁶ · Isabel P. Fonseca² · Águida A. Oliveira⁷ · Viviane M. Lima⁸ · Bruno P. Berto⁸

Received: 23 April 2021 / Accepted: 25 August 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Columbiformes have a worldwide distribution, of which 166 species occur in Eurasia. They have been reported parasitized by coccidians recurrently in recent years; however, *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928, which is first *Eimeria* sp. from Columbiformes described in the late nineteenth century, is not taxonomically identified by its oocysts since the 1930s. In this context, the current study aimed to supplement the morphology of *E. labbeana* from Eurasian collared doves *Streptopelia decaocto* Frivaldszky, 1838 and from a common woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 in Portugal, providing a preliminary genotypic characterization. Three of the four columbiforms were positive for oocysts identified as *E. labbeana*, which were morphologically revised as having micropyles, in addition to other minor adjustments. Oocysts from *S. decaocto* and *C. palumbus* were morphologically identical and equivalent in all morphometric aspects, besides having genotypic similarity of 99.5%. Phylogenetic analysis based on the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene resulted in a large clade with *Eimeria* spp. and *Isospora* spp. from different vertebrates and low similarity between *Eimeria* spp. from Columbiformes, whereas the phylogenetic analysis based on the small subunit ribosomal RNA gene resulted in well-supported monophyletic groups, including one with the coccidians of columbiform birds.

Keywords Oocysts · Coccidia · Taxonomy · Morphology · Genotyping · Phylogeny · Pigeons · Doves · Eurasia

Introduction

The birds classified in the order Columbiformes are the pigeons and doves which are 369 species worldwide, being 166 distributed in Eurasia (IUCN 2020). They are birds with

an exceptional sense of orientation that allow long-distance flights. This fact allows them to have geographic distributions that are almost always continental, crossing two or three continents (IUCN 2020; Sick 1997). The rock dove or common pigeon *Columba livia* Gmelin, 1789 exemplifies an extreme geographical distribution, since that it is native to

Section Editor: Daniel K Howe

✉ Bruno P. Berto
berto.ufrrj@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

² Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brazil

⁶ Centro de Reabilitação de Animais Selvagens de Lisboa (LxCRAS), Parque Florestal de Monsanto, Estrada do Barcal, 1500-068 Lisboa, Portugal

⁷ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

⁸ Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

26
27
28
29
30
31
32

A15
A16
A17
A18
A19
A20
A21
A22
A23
A24
A25
A26
A27

- 33 Eurasia and North Africa and introduced in all other conti-
 34 nents on the planet, where it has adapted widely, mainly in
 35 urban areas (IUCN 2020).
- 36 Most columbiform birds feed on the ground looking for
 37 grains and seeds (Sick 1997). This habit favors the transmis-
 38 sion of parasites through the fecal–oral route, as the coccid-
 39 ians, which have been widely reported from columbiforms
 40 in recent years (Dolnik et al. 2010). Among the coccidian
 41 species recorded from Columbiformes, *Eimeria labbeana*
 42 (Labbé, 1896) Pinto, 1928 can be highlighted as the first
 43 species to be described in the nineteenth century by Dr.
 44 Alphonse Labbé (Labbé 1896; Ortúzar-Ferreira et al. 2020).
 45 Over the following decades, *E. labbeana* was frequently
 46 used in studies of experimental assays, ultrastructure or
 47 coccidian biology in general (Duncan 1957; Quevedo and
 48 Arcay-de-Peraza 1980; Coussement et al. 1988; Marzouk
 49 et al. 1989; Vercruyse 1990), although it was last taxonomi-
 50 cally studied in the 1930s by Nieschulz (1935).
- 51 In this context, the current study provides supplement-
 52 ary data obtained from morphologic and molecular analyses
 53 (mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) and
 54 small subunit ribosomal RNA (ssrRNA)) of *E. labbeana*
 55 obtained from Eurasian collared doves *Streptopelia decaocto*
 56 Frivaldszky, 1838 and from a common woodpigeon
 57 *Columba palumbus* Linnaeus, 1758 from Lisbon, Portugal.
- 58 Materials and methods
- 59 Samples
- 60 Fecal samples were collected from three Eurasian collared
 61 doves *S. decaocto* and one common woodpigeon *Columba*
 62 *palumbus* Linnaeus, 1758. These birds were undergoing
 63 rehabilitation treatment for reintroduction into the wild at
 64 the Lisbon Center for Wild Animal Recovery, in Monsanto
 65 Forest Park, Lisbon, Portugal. These fecal samples were
 66 collected after defecation and stored in plastic containers
 67 containing 2.5% potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) solution
 68 at 1:6 (v/v).
- 69 Morphology
- 70 Fecal samples were collected from three Eurasian collared
 71 doves *S. decaocto* and one common woodpigeon *C. palum-*
 72 *bus*. These birds were undergoing rehabilitation treatment
 73 for reintroduction into the wild at the Lisbon Center for
 74 Wild Animal Recovery, in Monsanto Forest Park, Lisbon,
 75 Portugal. These fecal samples were collected after defeca-
 76 tion, stored in plastic containers containing 2.5% potassium
 77 dichromate (K₂Cr₂O₇) solution at 1:6 (v/v) and maintained
 78 at room temperature for one week in order to sporulate the
 79 oocysts. After this period, the sporulated oocysts were sent
 to the Laboratório de Biologia de Coccídios, Universidade
 Federal Rural do Rio de Janeiro for specific identification
 using the technique described by Duszynski and Wilber
 (1997) and Berto et al. (2014). The morphological study,
 measurements, line drawings, and photomicrographs were
 made using an Olympus BX binocular microscope (Olym-
 pus Optical, Tokyo, Japan) linked to an Eurekam 5.0 digi-
 tal camera (BEL Photonics, Monza, Italy). Line drawings
 were edited using the applications Corel DRAW and Corel
 PHOTO-PAINT from CorelDRAW® software (Corel Draw
 Graphics Suite, version 11.0, Corel Corporation, Canada).
 The measurements are given as the range followed by the
 mean in parentheses, always in micrometers.
- Statistics
- D'Agostino's test of normality was used to evaluate the
 measurements of length, width, and length/width (L/W) ratio
 of the oocysts and sporocysts. Then, these measurements of
 eimerian oocysts and sporocysts obtained of *S. decaocto* and
C. palumbus were statistically evaluated by analysis of vari-
 ance (ANOVA). The statistical package Bioestat 5.0 (Ayres
 et al. 2020) was used to calculate the mean, variance, degree
 of freedom, and *p* value (Berto et al. 2014; Sampaio 2002).
- DNA extraction
- The isolation of a single oocyst from each sample was
 achieved by serial dilutions of the oocysts in drops using
 a sterile micropipette on a microscope slide, according to
 guidelines of Dolnik et al. (2009). The isolated oocysts were
 resuspended in PBS and washed by centrifugation until
 the supernatant became clear. The DNA of these isolated
 oocysts was extracted using the Qiagen DNeasy Blood and
 Tissue kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) following the manu-
 facturer's instructions. In order to smooth the oocysts, four
 freeze–thaw cycles were employed prior to DNA extraction.
 All precautions were taken to avoid contamination during
 extraction and amplification, including: the reagents were
 prepared in a laminar flow biological safety cabinet; all sam-
 ples were recorded individually; and negative controls were
 used for the amplification reactions.
- COI amplification
- A nested PCR was used to amplify ~250 bp of the COI
 gene by PCR (Dolnik et al. 2009; Yang et al. 2015). Initially
 a PCR product of ~302 bp was obtained by the external
 primers (COIbF1: 5'-GWTCATTAGTATGGGCACATCA-
 3'; COIbR1: 5'-CCAAGAGATAATACRAARTGGAA-3').
 Then, the internal primers (COIbF2: 5'-GGGCACATCATA
 TGATGAC-3'; COIbR2: 5'-ATAGTATGTATCATGTAR
 WGCAA-3') produced an amplicon of ~257 bp in size. The

127 PCR reaction included 12.5 μL of GoTaq® G2 Hot Start
 128 Colorless Master Mix (Promega Labs) (1 \times), 0.25 μL of
 129 each primer (0.2 μM), 3 μL of genomic DNA (for primary
 130 reaction) or 3 μL primary PCR product (for the secondary
 131 reaction), and 9 μL of nuclease-free water. The primary and
 132 secondary PCRs were employed using the same cycling condi-
 133 tions: 1 cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 35 cycles
 134 of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min and a
 135 final extension of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The amplicons obtained
 136 from the second round PCRs were purified using the Reli-
 137 aPrep™ DNA Clean-up and Concentration System (Pro-
 138 mega Corporation, São Paulo, Brazil).

139 ssrRNA amplification

140 A one step PCR was used to amplify ~ 444 bp of the ssrRNA
 141 gene by PCR, as previously described by Genovez-Oliveira
 142 et al. (2020). The primers were as follows: 1NF (5'-CAG
 143 GCTGTGCGCCCTGAATA-3') and 1NR (5'-CTGGACCTG
 144 GTGAGTTTCCC-3'). For amplification, a 25 μL PCR reac-
 145 tion was prepared using 3 μL of genomic DNA (< 1 μg), 12.5
 146 μL of GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega
 147 Labs) (1 \times), 0.25 μL of each primer (0.2 μM), and 9 μL of
 148 nuclease-free water. PCR was employed using the following
 149 cycling conditions: 1 cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by
 150 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and 72 $^{\circ}\text{C}$ for
 151 30 s and a final extension of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The amplicons
 152 obtained from the PCR were purified using the ReliaPrep™
 153 DNA Clean-up and Concentration System (Promega Corpo-
 154 ration, São Paulo, Brazil).

155 DNA sequencing

156 The PCR products obtained in the current work were
 157 sequenced using the PCR forward and reverse primers by
 158 Ludwig Biotechnology. An ABI-Prism 3500 Genetic Ana-
 159 lyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) was
 160 used for Sanger sequencing. The obtained sequences were
 161 studied and edited using Chromas 2.6 ([https://chromas.
 162 software.informer.com/](https://chromas.software.informer.com/)). The similarities of the sequences
 163 were searched with the Basic Local Alignment Search Tool
 164 (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) search
 165 program. Phylogenetic trees were constructed for coccidians
 166 at the COI and ssrRNA sequences for additional isolates
 167 from GenBank. Alignment using ClustalW algorithm and
 168 parsimony analyses were employed using MEGA version 7
 169 (Tamura et al. 2007). The evolutionary history was inferred
 170 using the neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood
 171 (ML) methods, and the distances were computed using the
 172 Tamura-Nei method based on model selection using Model-
 173 Test in MEGA 7. Bootstrap analyses were conducted using
 174 1000 replicates to assess the reliability of inferred tree
 175 topologies.

176 Results

177 Taxonomy and prevalence

178 Four columbiform birds (3 *S. decaocto* and 1 *C. palum-*
 179 *bus*) were examined. Two *S. decaocto* and one *C. palumbus*
 180 were positive for a coccidian species, which was morpho-
 181 logically identified as *E. labbeana* (Figs. 1 and 2A–H). Sup-
 182 plementary morphological data and molecular analyses are
 183 provided.

184 Oocyst (n = 73) sub-spheroidal to ellipsoidal, 16–
 185 21 $\mu\text{m} \times 14$ –18 μm (18.7 \times 15.7 μm); L/W ratio 1.0–1.4
 186 (1.2). Wall bi-layered, 1.0–1.5 μm (1.2 μm) thick, outer
 187 layer smooth. Micropyles are often present, more dis-
 188 cernibly one at the longitudinal end and the other at the
 189 side. Oocyst residuum absent, but one to three polar gran-
 190 ules are present. Sporocysts (n = 73) 4, ovoidal or slightly
 191 reniform, 10–14 $\mu\text{m} \times 5$ –7 μm (12.2 \times 6.4 μm); L/W ratio
 192 1.8–2.4 (2.1). Stieda body present, prominent triangular,
 193 1.0–1.3 $\mu\text{m} \times 1.2$ –1.4 μm (1.2 \times 1.3 μm); sub-Stieda and
 194 para-Stieda bodies absent; sporocyst residuum present, com-
 195 posed of scattered spherules. Sporozoites 2, vermiform, with
 196 anterior and posterior refractile bodies and a nucleus.

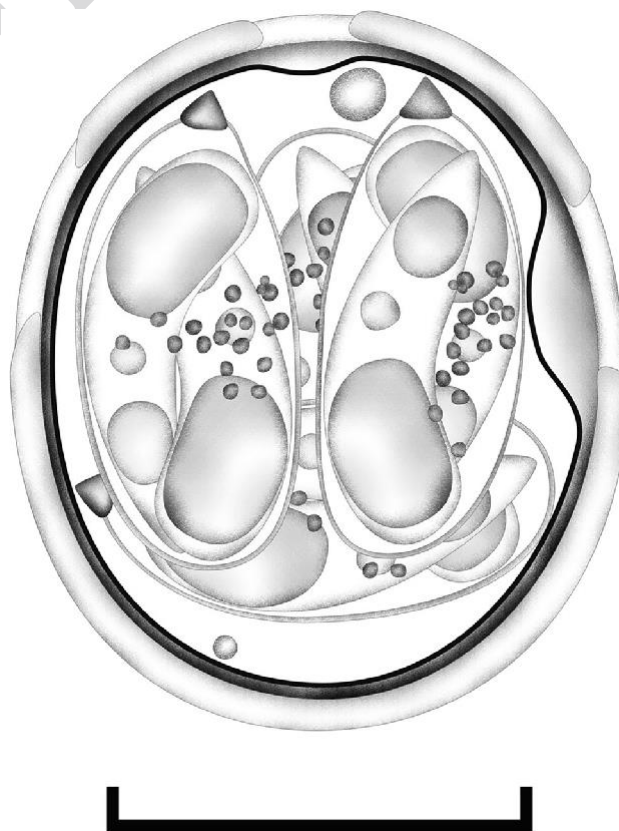
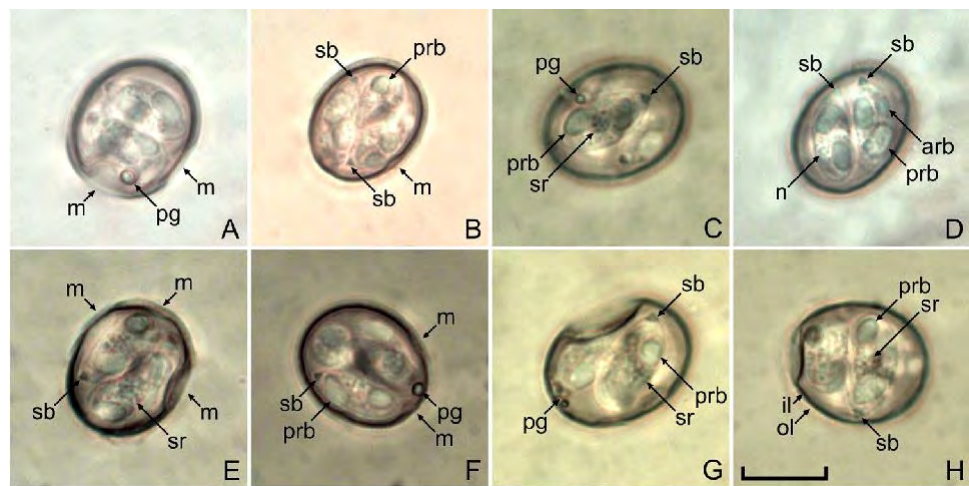


Fig. 1 Line drawing of *Eimeria labbeana*, a coccidium species recovered from columbiform birds. Scale bar: 10 μm

Fig. 2 Photomicrographs of sporulated oocysts of *Eimeria labbeana*, a coccidium species recovered from (A–D) *Streptopelia decaocto* and (E–H) *Columba palumbus* from Portugal. Note the anterior (arb) and posterior (prb) refractile bodies, inner (il) and outer (ol) layer of the oocyst wall, micropyle (m), nucleus (n), polar granule (pg), sporocyst residuum (sr), and the Stieda body (sb). Scale bar: 10 μ m



197 Taxonomic summary

198 Hosts: The Eurasian collared dove *Streptopelia decaocto*
199 Frivaldszky, 1838; and the common woodpigeon *Columba*
200 *palumbus* Linnaeus, 1758 (Aves: Columbiformes: Columbidae).

201 Locality: Lisbon Center for Wild Animal Recovery (Centro
202 de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa), Monsanto
203 Forest Park, Lisbon, Portugal (38°44'22.9"N, 9°11'02.3"W).

204 Specimens: Photomicrographs, line drawing, and oocysts
205 in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution, according to guidelines of Wil-
206 liams et al. (2010), are deposited at the Museu de Zoolo-
207 gia at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
208 Brazil, under accession numbers MZURPTZ2020023 (*S.*
209 *decaocto*) and MZURPTZ2020024 (*C. palumbus*). Photo-
210 micrographs are also deposited and available ([http://rl.ufrj.
211 br/labioc/colecao.html](http://rl.ufrj.br/labioc/colecao.html)) in the Parasitology Collection of
212 the Laboratório de Biologia de Coccídios, at UFRRJ, under
213 repository numbers 106/2020 (*S. decaocto*) and 107/2020
214 (*C. palumbus*). Photovouchers of the host specimens are
215 deposited in the same collection.

216 Representative DNA sequence: DNA amplification of the
217 COI and *ssrRNA* genes showed clear bands around ~ 250 bp
218 and ~ 400 bp, respectively. Representative sequences were
219 deposited in the GenBank database under the accession
220 numbers: MT475825 (COI, *S. decaocto*); MT475826 (COI,
221 *C. palumbus*); and MT472289 (*ssrRNA*, *S. decaocto*).

222 Site of infection: Unknown.

223 Prevalence: 75% (3/4) in total; 67% (2/3) for *S. decaocto*;
224 and 100% (1/1) for *C. palumbus*.

225 Remarks

226 The comparative morphology between *Eimeria* spp.
227 recorded from Columbiformes and the oocysts identified
228 in the current study are shown in Table 1. Oocysts from
229 *S. decaocto* and *C. palumbus* were morphologically iden-
230 tical to each other and equivalent in all morphometric

231 aspects by ANOVA (Table 1). The identification as *E.* 231
labbeana was based on the typical characteristic of the 232
prominent triangular Stieda body, presence of micropyle 233
according to the description of Pinto (1928), in addition 234
to the similar sizes and shapes of oocysts and sporocysts. 235
In addition to *E. labbeana*, the species *Eimeria colum-* 236
barum Nieschulz, 1935, *Eimeria curvata* Adriano et al., 237
2000, *Eimeria livialis* Alyousif, Al-Shawa and Al-Asiri, 238
2009, *Eimeria columbapalumbi* Jamriška and Modrý, 239
2012, *Eimeria mauritiensis* Ball et al., 2012, *Eimeria* sp. 240
of Yang et al. [22] and *Eimeria ferreirai* Oliveira and 241
Berto, 2020, were similar in size to the oocysts of the 242
current study. Of these species, *E. curvata*, *E. livialis*, 243
E. mauritiensis, and *Eimeria* sp. of Yang et al. [22] have 244
only one or no polar granules, and all, except *E. ferreirai*, 245
do not have micropyle. *Eimeria ferreirai* is differentiated 246
by Stieda body less prominent, in addition to having a 247
delicate micropyle cap and slightly larger oocysts. 248

249 Phylogenetic analysis

250 Sequences of *Eimeria* spp., *Isospora* spp., and *Cyclospora*
251 spp. available in GenBank were used for the phylogenetic
252 analysis (Figs. 3 and 4). The cyst-forming coccidian *Toxo-*
253 *plasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) was the out-
254 group. In the phylogenetic analysis based on the COI gene
255 (Fig. 3), *E. labbeana* from *S. decaocto* and *C. palumbus* had
256 similarity of 99.5% and was recovered in a large clade between
257 *Isospora* spp. from Passeriformes and *Eimeria* spp. from
258 Columbiformes, Anseriformes, Galliformes, Strigiformes,
259 and Picittaciformes, besides mammals, mainly rodents. In the
260 *ssrRNA*-based phylogenetic analysis (Fig. 4), *E. labbeana* sat
261 in a clade with the similarity of 100% with *Eimeria columbi-*
262 *nae* Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020 and *Eimeria* sp. of Yang
263 et al. (2016) and of 99.7% with an *Isospora* sp. from domestic
264 pigeons *C. livia* in Japan (Matsubara et al. 2017).

Table 1 Comparative morphology of *Eimeria* spp. recorded from Columbiformes of the world

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts								Sporocysts						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum	Micro-pyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria labbeana</i> (Labbe, 1896) Pinto, 1928	<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789	Asia, India	Pinto (1928)	Sub-spheroidal to ovoidal	17–21	16–18	1.0–1.1	Smooth	Absent	Present	Present	Ovoidal	11–14 (12.4)	5–7 (6.4)	(1.4)	–	–	Present
			Nieschulz (1935)	Sub-spheroidal to ellipsoidal	15–18 (16.7)	14–16 (15.3)	1.0–1.1 (1.09)	Smooth	Absent	Absent	Present	Ellipsoidal	–	–	–	Present	Absent	Present
	<i>Streptopelia decaocto</i> Frivaldszky, 1838	Europe, Portugal	Current study	Sub-spheroidal to ellipsoidal	16–21 (18.5) ^a	14–17 (15.5) ^a	1.0–1.4 (1.19) ^a	Smooth	Absent	Present, 1–3	Present, 1–3	Ovoidal or slightly reniform	11–14 (12.2) ^a	5–7 (5.9) ^a	1.9–2.3 (2.08) ^a	Present, prominent triangular	Absent	Present
	<i>Columba palumbus</i> Linnaeus, 1758				16–21 (19.0) ^a	14–18 (15.9) ^a	1.0–1.3 (1.20) ^a					10–14 (12.3) ^a	5–7 (6.0) ^a	1.8–2.4 (2.04) ^a				
<i>Eimeria columbarum</i> Nieschulz, 1935	<i>C. livia</i>	Asia, India	Nieschulz (1935)	Sub-spheroidal to ovoidal	19–21 (20)	17–20 (18.7)	1.0–1.1 (1.07)	Smooth	Absent	Absent	Present	Ellipsoidal	–	–	–	Present	Absent	Present
<i>Eimeria columbae</i> Mitra and Das Gupta, 1937	<i>C. livia</i>	Asia, India	Mitra and Das Gupta (1937)	Sub-spheroidal to ovoidal	(16.4)	(14.4)	–	–	Present	Absent	–	Ellipsoidal	(7.2)	(4.8)	–	–	–	Present
<i>Eimeria sphenocercae</i> Ray, 1952	<i>Treron sphenurus</i> (Vigors, 1832)	Asia, India	Ray (1952)	Reniform to ellipsoidal	17–25 (19.2)	12–15 (12.6)	–	Smooth with a lateral dent	Absent	Present, asymmetrical, with micro-pyle cap	–	Broadly ovoidal	17–19 (17.5)	12–14 (12.5)	–	–	–	Present
<i>Eimeria kapotei</i> Chatterjee and Ray, 1969	<i>C. livia</i>	Asia, India	Chatterjee and Ray (1969)	Sub-spheroidal	24–30 (26.1)	22–26 (23.5)	–	–	–	Present, anterior	Present 1–2	Ovoidal	8–10	–	–	Present	–	Present, scattered

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts								Sporocysts						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum	Micro-pyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria turturi</i> Golemansky, 1976	<i>Streptopelia turtur</i> (Linnaeus, 1758)	Europe, Bulgaria	Golemansky (1976)	Ellipsoidal or broadly ovoidal	23–29 (26)	18–25 (21.6)	–	Smooth, ~1.5	Absent	Absent	Absent	Elongate ellipsoidal	11–13	6–8	–	Absent	–	Present, scattered
<i>Eimeria waiganiensis</i> Varghese, 1978	<i>Chalco-phaps indica</i> (Linnaeus, 1758); <i>Otidiphaps nobilis</i> (Gould, 1870)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1978)	Broadly ovoidal	22–25 (24)	19–23 (22)	1.1–1.2 (1.1)	Smooth, ~1.5	Absent	Present, 4–6 (5)	Present, 2–4	Ovoidal	9–11 (10.0)	6–8 (7.0)	–	Present, prominent	Present, small	Present, scattered
<i>Eimeria duculai</i> Varghese, 1980	<i>Ducula spilorrhoa</i> (Gray, 1858)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Broadly ovoidal	26–31 (28)	23–27 (25)	(1.1)	Smooth, 1.5–2.5 (2.0)	Absent	Inconspicuous	Present, 1, ~2.0	Elongate	14–16 (15.5)	6–8 (7.2)	–	Present, prominent, conical	Absent	Present, compacted, membrane-bounded
<i>Eimeria gourai</i> Varghese, 1980	<i>Goura victoria</i> (Fraser, 1844)	Oceania, Papua New Guinea	Varghese (1980)	Sub-spheroidal	19–22 (20)	18–21 (20)	(1.0)	Smooth, ~1.0	Absent	Absent	Present, 1, ~2.0	Elongate	10–13 (12.0)	4–6 (5.5)	–	Present	Absent	Present, compacted
<i>Eimeria palumbi</i> McQuisition, 1991	<i>Zenaida galapagoensis</i> Gould, 1841	South America, Ecuador, Galápagos Islands	McQuisition (1991)	Ovoidal to ellipsoidal	22–27 (24.2)	19–24 (21.7)	1.0–1.2 (1.16)	Smooth, ~2.0	Present, round to splinter-like granules	Absent	Absent	Ellipsoidal	15–17 (15.3)	8–9 (8.1)	1.8–2.1 (1.9)	Present, nipple-like	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria curvata</i> Adriano et al., 2000	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1809); <i>Columbina squamata</i> (Lesson, 1831)	South America, Brazil	Adriano et al. (2000)	Ovoidal to ellipsoidal	17–19 (18.3)	15–17 (15.5)	1.1–1.3 (1.2)	Smooth, ~1.3	Absent	Absent	Present	Elongate	11–13 (12.3)	5–6 (5.8)	2.0–2.2 (2.1)	Present, protuberant, nipple-like	Absent	Present, compacted

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts								Sporocysts						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum	Micro-pyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria zenaidae</i>	<i>Zenaida auriculata</i> (Des Murs, 1847)	South America, Brazil	Adriano et al. (2003)	Sub-spheroidal	22–26 (23.8)	19–22 (20.3)	(1.2)	Rough, ~1.7	Absent	Absent	Present, 1	Elongate	12–14 (13.1)	7–8 (7.4)	1.7–1.9 (1.8)	Present, large	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria janovyi</i>	<i>C. livia</i>	Asia, India	Bandyopadhyay et al. (2006)	Ellipsoidal	(24.3)	(19.8)	(1.2)	Smooth, ~1.1	Absent	Absent	Present, 1, sub-spheroidal	Pyriform	(12.1)	(10.1)	(1.2)	Present, large, prominent	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria livialis</i>	<i>C. livia</i>	Asia, Saudi Arabia	Alyousif et al. (2009)	Elongate ellipsoidal	19–23 (21)	14–17 (15)	(1.2)	Smooth, 1–1.3 (1.2)	Present, irregular globules	Absent	Absent	Ellipsoidal	9–12 (10.6)	6–8 (6.7)	(1.6)	Present, small, nipple-like	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria columbapalumbi</i>	<i>C. palumbus</i>	Europe, Czech and Slovak Republics	Jamriška and Modrý (2012)	Ellipsoidal	17–24 (21.3)	15–18 (16.9)	1.0–1.4 (1.26)	Smooth, 0.6–1.5 (0.9)	Absent	Absent	Present, 2 irregular, ~2.0	Elongate ovoidal, slightly asymmetrical	11–16 (13.5)	6–7 (6.5)	1.7–2.2 (1.9)	Present	Absent	Present, scattered
<i>Eimeria mauritensis</i>	<i>Nesoenas mayeri</i> (Prévost, 1843)	Africa, Madagascar	Ball et al. (2012)	sub-spheroidal	18–22 (19.7)	16–19 (17.8)	1.0–1.2 (1.1)	Smooth, ~0.8	Absent	Absent	Absent	–	8–14 (12.0)	6–7 (6.6)	–	Present	Present	Present
<i>Eimeria lyoni</i>	<i>Zenaida macroura</i> (Linnaeus, 1758)	North America, USA	Yabsley et al. (2015)	Sub-spheroidal to ovoidal	23–26 (24.2)	20–22 (20.7)	1.1–1.3 (1.2)	Smooth, ~1.0	Absent	Absent	Present, 1–2	Ovoidal	12–14 (12.4)	7–8 (7.3)	1.5–1.9 (1.7)	Present, knob-like	Present, rounded	Present, scattered, granules of ~1.0
<i>Eimeria</i> sp. of Yang et al. (2016)	<i>C. livia</i>	Oceania, Australia	Yang et al. (2016)	Sub-spheroidal	19–22 (20.2)	16–19 (16.1)	(1.38)	Smooth, ~1.0	Present	Absent	Present	Elongate ovoidal	12–15 (13.0)	5–7 (6.1)	2.0–2.2 (2.1)	Present	Absent	Present, compacted

Table 1 (continued)

Coccidia	Hosts	Locality	References	Oocysts								Sporocysts						
				Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Wall	Residuum	Micro-pyle	Polar granule	Shape	Length (µm)	Width (µm)	L/W ratio	Stieda body	Substieda body	Residuum
<i>Eimeria columbinae</i> Ortúzar-Ferreira and Berto, 2020	<i>C. talpacoti</i>	South America, Brazil	Ortúzar-Ferreira et al. (2020)	Sub-spheroidal to ellipsoidal	13–16 (14.7)	12–14 (13.2)	1.0–1.2 (1.11)	Smooth, 1.0–1.2 (1.1)	Present, granules bonded and/or dif-fused	Inconspicuous	Absent	Ellipsoidal to slightly asymmetrical	8–10 (9.0)	5–6 (5.1)	1.6–2.0 (1.77)	Present, flattened to half-moon-shaped	Present, rounded	Present, scattered
<i>Eimeria ferreirai</i> Oliveira and Berto, 2020	<i>Leptotila verreauxi</i> Bona-partre, 1855; <i>Leptotila rufaxilla</i> (Richard & Bernard, 1792)	South America, Brazil	Oliveira et al. (2020)	Sub-spheroidal to ellipsoidal	19–25 (21.4)	16–21 (18.8)	1.0–1.4 (1.15)	Smooth, 1.3–1.9 (1.6)	Absent	Present, with micro-pyle cap barely discernible	Present, 1–2	Elongate ovoidal to boomerang-shaped	12–15 (13.4)	6–8 (6.9)	1.8–2.2 (1.95)	Present, triangular to lozenge-shaped	Absent	Present, scattered

^aDifferent letters in each column denote statistically significant differences ($P < 0.01$) by ANOVA

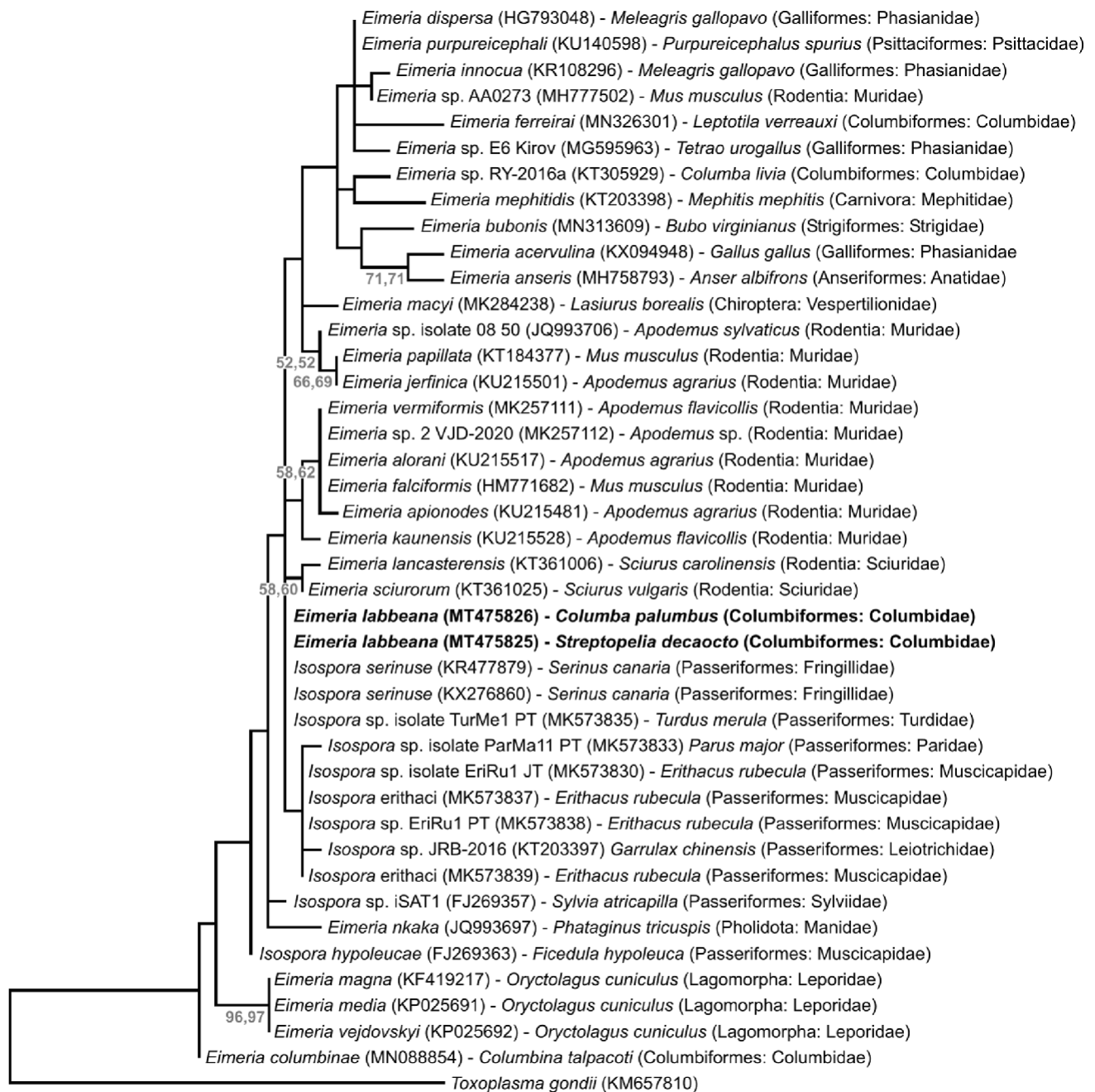


Fig. 3 Maximum likelihood tree estimated from the COI gene sequences of coccidian species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (>50%) for neighbor-joining (NJ) and maxi-

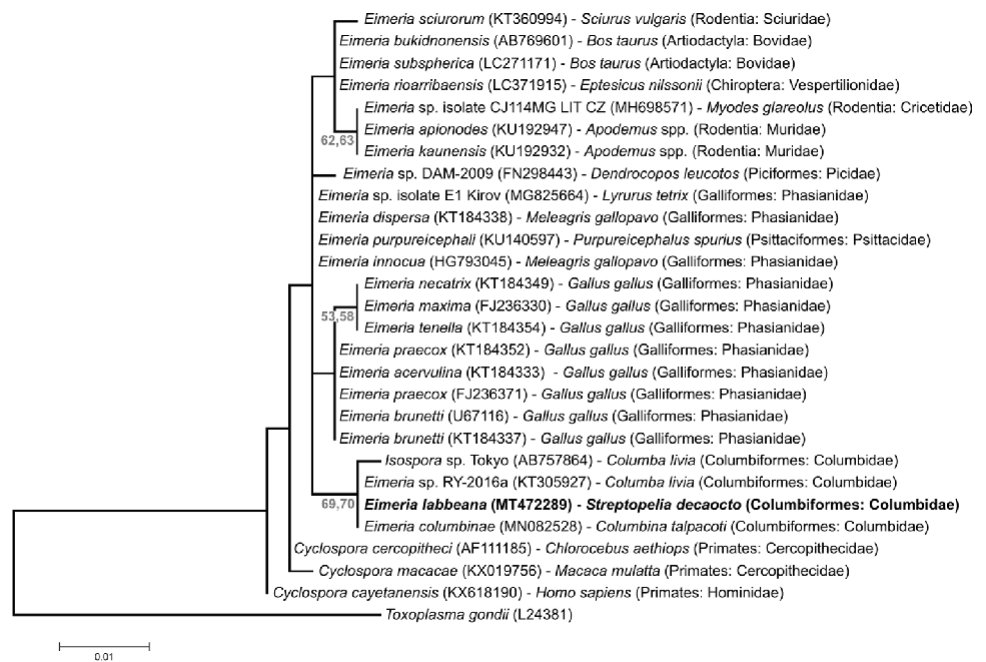
imum likelihood (ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

265 Discussion

266 *Eimeria labbeana* was the first eimerian described from
 267 Columbiformes in the 1920s of the last century (Pinto 1928),
 268 correcting and renaming the previous descriptions of *Coc-*
 269 *cidium pfeifferi* Labbe, 1896 and *Eimeria pfeifferi* Labbe,
 270 1896, which have become synonymies (Ortúzar-Ferreira

et al. 2020). This description of Pinto (1928), although not
 very detailed, recorded the presence of micropyle in the
 oocysts. In the following 1930s, Nieschulz (1935) high-
 lighted in his line drawings a main distinguishable feature
 for *E. labbeana*, a prominent triangular Stieda body, which
 would be the main difference for the second *Eimeria* sp.
 described from Columbiformes, *E. columbarum*. In this

Fig. 4 Maximum likelihood tree estimated from the ssrRNA gene sequences of coccidian species. Numbers at nodes represent bootstrap support 1000 replicates (> 50%) for neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML), respectively. Scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site



278 sense, the oocysts were identified as *E. labbeana* in current
 279 study by combining the descriptions of Pinto (1928), who
 280 observed a micropyle in the oocysts, and Nieschulz (1935),
 281 who highlighted the prominent triangular Stieda body.

282 As shown in Table 1, several *Eimeria* spp. have basic
 283 morphology and sizes similar to *E. labbeana*. Among these,
 284 *E. curvata*, *E. livialis*, *E. columbapalumbi*, *E. mauritiensis*,
 285 and *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) have not been detailed
 286 on the morphology of Stieda body to distinguish them from
 287 *E. labbeana*, although some photomicrographs show trian-
 288 gular Stieda bodies, which were minimally redrawn in the
 289 review of Ortuzar-Ferreira et al. (2020). Anyway, none of
 290 these species has been described having micropyle, which
 291 should be easily observed through the microscopic resources
 292 available in the current century. In contrast, Nieschulz
 293 (1935), unlike Pinto (1928), should not have been able to
 294 observe micropyle in the oocysts identified as *E. labbeana*
 295 through the microscopic resources available in the beginning
 296 of the last century (Table 1).

297 The description of more than one micropyle in the oocyst
 298 is very unusual in the taxonomy of Coccidia. According to
 299 Duszynski and Wilber (1997) and Berto et al. (2014), the
 300 micropyle consists of a discontinuity in the outer layer of
 301 the oocyst wall. In this sense, up to three discontinuities, or
 302 micropyles, are observed in the outer layer of the oocysts,
 303 as highlighted in Fig. 2e; however, two micropyles are more
 304 clearly observed, one at the longitudinal end and the other at
 305 the side, as shown in Fig. 2a and f. In this sense, the oocysts
 306 of the current study were identified as *E. labbeana*, having
 307 its morphological description supplemented with the pres-
 308 ence of micropyles, in addition to other minor adjustments.

309 In addition to this morphological basis, the identification
 310 of the current study is also based on the previous reports
 311 of *E. labbeana* from the oriental turtle dove *Streptopelia*
 312 *orientalis* (Latham, 1790), the laughing dove *Spilopelia sen-*
 313 *egalensis* (Linnaeus, 1766), and *S. decaocto*, in Eurasia and
 314 North Africa (Coussement et al. 1988; Marzouk et al. 1989;
 315 Vercruyse 1990). Although these reports are not from stud-
 316 ies on taxonomy, or presented morphological details of the
 317 oocysts, these reports are in the coccidian database “Coc-
 318 cidia of the World” of Duszynski et al. (2000). In turn, *C.*
 319 *palumbus* despite being a new host in the current study shed
 320 oocysts with identical morphological characteristics with
 321 oocysts from *S. decaocto*, in addition to equivalent means
 322 in all morphometric aspects (Table 1, Fig. 2).

323 Phylogenetic analysis based on the COI sequences
 324 (Figs. 3 and 4) resulted in a large clade, with low bootstrap
 325 support, with *Eimeria* spp. and *Isospora* spp. from different
 326 groups of birds and mammals. To date, there are three COI
 327 sequences of *Eimeria* spp. from Columbiformes deposited
 328 in the GenBank, in addition to *E. labbeana* from the current
 329 study. These species were expected to be genotypically simi-
 330 lar; however, they differed by 5 to 10% or 10 to 20 nucleotide
 331 substitutions. An assumption for these wide differences may
 332 be associated with the distinct and distant localities of these
 333 coccidians: *E. columbinae* and *E. ferreirai* are from South
 334 America, and *Eimeria* sp. of Yang et al. (2016) is from Oce-
 335 ania (Table 1). In contrast, the worldwide distribution of *C.*
 336 *livia*, as native or introduced, could equally distribute its
 337 coccidia worldwide (IUCN 2020; Berto and Lopes 2020).
 338 Anyway, when more COI sequences of coccidians from

339 Columbiformes were deposited in GenBank, better conclu-
340 sions should be possible.

341 At the other extreme, the phylogenetic analysis based on
342 the *ssrRNA* gene clearly showed the monophyletic groups
343 of coccidia according to their host groups, forming clades
344 with coccidians from bovines, primates, galliforms, rodents,
345 and, finally, columbiforms. The clade with the coccidians
346 from Columbiformes showed a very high similarity between
347 the sequences, which confirms the suitability of the *ssrRNA*
348 gene for phylogenetic positioning in taxonomic groups; how-
349 ever, it proves to be unsuitable for specific differentiation or
350 genotyping, at least in the region amplified in the current
351 study.

352 In conclusion, a new host was recorded to *E. labbeana*;
353 the common woodpigeon *C. palumbus* and supplementary
354 morphological data and molecular and phylogenetic analyses
355 by the COI and *ssrRNA* were provided for the first *Eimeria*
356 species described from Columbiformes.

357 **Acknowledgements** We thank the staff at the Lisbon Center for Wild
358 Animal Recovery, in Monsanto Forest Park, Lisbon, Portugal, who
359 enabled the collection of samples from birds held for rehabilitation and
360 reintroduction into the wild.

361 **Funding** This study was supported by Conselho Nacional de Desen-
362 volvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aper-
363 feioamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Car-
364 los Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
365 (FAPERJ), and Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade
366 Animal (Project UIDP/CVT/00276/2020, funded by FCT). MSO have
367 scholarship from CAPES (Grant/Award Number: 001). BPB has a
368 fellowship from CNPq (Grant/Award Number: 303899/2019-0) and
369 from FAPERJ (Grant/Award Number: E-26/202.797/2019). DWR has
370 a postdoctoral fellowship from FCT (Grant/Award Number: SFRH/
371 BPD/115202/2016).

372 Declarations

373 **Ethics approval** All applicable institutional, national and international
374 guidelines for the care and use of animals were followed. Animal
375 manipulation in the Lisbon Center for Wild Animal Recovery was
376 performed by suitably qualified professionals, according to the direc-
377 tive 86/609/EEC.

378 **Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

379 References

- 380 Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2000) *Eimeria curvata* n.
381 sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and
382 *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. Mem
383 Inst Oswaldo Cruz 95:53–55
- 384 Adriano EA, Thyssen PJ, Cordeiro NS (2003) A new species of
385 *Eimeria* from the eared dove *Zenaida auriculata* (Aves: Colum-
386 bidae) in Brazil. Acta Protozool 42:71–73
- 387 Alyousif SM, Al-Shawa RY, Al-Asiri, SS, (2009) *Eimeria livialis*
388 sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic pigeon,

- Columba livia domestica* in Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol 39:383–388 389
- Ayres M, Ayres M, Ayres DL, Santos AAS (2020) BioStat aplicações 390
estatísticas nas áreas de Ciências Biomédicas. Mamirauá: Belém. 391
380 pp 392
- Ball SJ, Daszak P, Swinnerton KR, Jones CG, Snow KR (2012) A new 393
species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the endan- 394
gered pink pigeon, *Nesoenas mayeri* (Prévost, 1843) Cheke, 2005 395
(Columbiformes) in Mauritius. Afr Zool 47:369–372 396
- Bandyopadhyay PK, Bhakta JN, Shukla R (2006) A new *Eimeria* 397
species (Protozoa: Apicomplexa: Sporozoa) from the blue 398
rock pigeon *Columba livia* (Aves: Columbidae). Zoos Print J 399
21:2386–2387 400
- Berto BP, Lopes CWG (2020) Coccidia of wild birds as ecological 401
biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment inter- 402
action. J Parasitol 106:707–713 403
- Berto BP, McIntosh D, Lopes CWG (2014) Studies on coccidian 404
oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Rev Bras Parasitol Vet 405
23:1–15 406
- Chatterjee DK, Ray HN (1969) On *Eimeria kapotei* n. sp., from the 407
domestic pigeon, *Columba livia intermedia*. Proc 24th Indian Sci 408
Cong 56:512 409
- Coussemont W, Maes L, Vanparijs O, Marsboom R (1988) Action of 410
the anticoccidial clazuril on the endogenous stages of *Eimeria* 411
labbeana and *E. columbarum* in experimentally infected pigeons. 412
Res Vet Sci 45:117–119 413
- Dolnik OV, Palinauskas V, Bensch S (2009) Individual oocysts of *Isospora* 414
(Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from 415
photo to sequence. J Parasitol 95:169–174 416
- Dolnik OV, Dolnik VR, Bairlein F (2010) The effect of host foraging 417
ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in 418
wild passerine birds. Ardea 98:97–103 419
- Duncan S (1957) The effects of some chemical and physical agents on 420
the oocysts of the pigeon coccidium, *Eimeria labbeana* (Pinto, 421
1928). J Parasitol 45:193–197 422
- Duszynski D, Wilber P (1997) A guideline for the preparation of spe- 423
cies descriptions in the Eimeriidae. J Parasitol 83:333–336 424
- Duszynski D, Couch, L, Upton SJ (2000) The coccidia of the world. 425
Available from: <https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>. Accessed 23 Apr 2020 426
- Genovez-Oliveira JL, Oliveira MS, Thode-Filho S, Cardozo SV, 427
Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, Berto BP (2020) Morpho- 428
logical and molecular identification of *Isospora massardi* Lopes, 429
Berto, Luz, Galvão, Ferreira & Lopes, 2014 (Chromista: Miozoa: 430
Eimeriidae) from thrushes *Turdus* spp. (Passeriformes: Turdidae) 431
in South America. Parasitol Int 75:102040 432
- Golemansky V (1976) Three new coccidian species (Coccidia: 433
Eimeriidae) found in wild birds from Bulgaria. Acta Protozool 434
15:399–404 435
- IUCN (2020) The IUCN red list of threatened species. Available from: 436
<http://www.iucnredlist.org>. Accessed 23 Apr 2020 437
- Jamriška J, Modrý D (2012) A new species of *Eimeria* Schneider, 438
1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the common wood pigeon 439
Columba palumbus Linnaeus, 1758 (Aves: Columbidae). Acta 440
Protozool 51:329–333 441
- Labbé A (1896) Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques 442
sur less coccidies. Arch Zool Exp Gen 24:517–654 443
- Marzouk M, Abdel-Ghaffar F, Mosaad MN (1989) Effects of infec- 444
tion with *Eimeria labbeana* on some serum constituents and liver 445
glycogen in the palm dove (*Streptopelia senegalensis aegyptiaca*). 446
Parasitol Res 75:183–185 447
- Matsubara R, Fukuda Y, Murakoshi F, Nomura O, Suzuki T, Tada C, 448
Nakai Y (2017) Detection and molecular status of *Isospora* sp. 449
from the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). Parasitol 450
Int 66:588–592 451
452
453

- 454 McQuiston TE (1991) *Eimeria palumbi*, a new coccidian parasite 489
 455 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Galapagos dove (*Zenaida* 490
 456 *galapagoensis*). Trans Am Microsc Soc 110:178–181 491
- 457 Mitra AN, Das-Gupta M (1937) On a species of *Eimeria* (Coccidia– 492
 458 Sporozoa) from the intestine of a pigeon, *Columba intermedia*. 493
 459 Proc 24th Indian Sci Cong 24:291 494
- 460 Nieschulz O (1935) Ueber Kokzidien der Haustauben. Zentralbl Bak- 495
 461 teriol Mikrobiol Hyg 134:390–393 496
- 462 Oliveira MS, Genovez-Oliveira JL, Ortúzar-Ferreira CN, Maronezi C, 497
 463 Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Berto BP 498
 464 (2020) *Eimeria ferreirai* n. sp. (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) 499
 465 from doves *Leptotila* spp. (Columbiformes: Columbidae) from 500
 466 Brazil. Zootaxa 4821:148–160 501
- 467 Ortúzar-Ferreira CN, Oliveira MS, Genovez-Oliveira JL, Franco HA, 502
 468 Thode-Filho S, Cardozo SV, Oliveira AA, Lima VM, Ferreira I, 503
 469 Berto BP (2020) Coccidia of Columbiformes: a taxonomic review 504
 470 of its Eimeriidae species and *Eimeria columbinae* n. sp. from 505
 471 *Columbina talpacoti* (Temminck, 1809) from Brazil. Parasitol 506
 472 Res 119:267–281 507
- 473 Pinto C (1928) Synonymie de quelques especes du genre *Eimeria* 508
 474 (Eimeridia, Sporozoa). C R Seances Soc Biol 98:564–1565 509
- 475 Quevedo CL, Arcay-de-Peraza L (1980) Desarrollo de *Eimeria labbeana* 510
 476 (Labbe, 1896) Pinto, 1928, en la membrana corioalantoidea 511
 477 de embrion de pollo (MCA), bajo la accion de la ciclofosfamida. 512
 478 Acta Biol Ven 10:255–301 513
- 479 Ray DK (1952) On a new coccidium, *Eimeria sphenocercae* n. sp., 514
 480 from *Sphenocercus sphenurus* (Kokla Green pigeon). J Parasitol 515
 481 38:546–547
- 482 Sampaio IBM (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. 516
 483 FEP MVZ Editora: Belo Horizonte. 265pp
- 484 Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 516
 485 p 862
- 486 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular 516
 487 evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol 516
 488 Biol Evol 24:1596–1599
- Varghese T (1978) *Eimeria waiganiensis* sp. n. from the greenwinged 489
 ground dove (*Chalcophaps indica* Linnaeus) and the magnificent 490
 ground pigeon (*Otidiphaps nobilis* gould) in Papua New Guinea. 491
 J Parasitol 64:312–314 492
- Varghese T (1980) Coccidian parasites of birds of the avian order 493
 Columbiformes with a description of two new species of *Eimeria*. 494
 Parasitol 80:183–187 495
- Vercruyse J (1990) Efficacy of toltrazuril and clazuril against experi- 496
 mental infections with *Eimeria labbeana* and *E. columbarum* in 497
 racing pigeons. Avian Dis 34:73–79 498
- Williams RB, Thebo P, Marshall RN, Marshall JA (2010) Coccidian 499
 oöcysts as type-specimens: long-term storage in aqueous potas- 500
 sium dichromate solution preserves DNA. Syst Parasitol 76:69–76 501
- Yabsley MJ, Bailey K, Adams HC (2015) A new species of *Eimeria* 502
 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the mourning dove, *Zenaida* 503
macroura (Columbiformes: Columbidae). Comp Parasitol 504
 82:231–234 505
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2015) *Isospora serinuse* n. sp. 506
 (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus* 507
canaria forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in West- 508
 ern Australia. Exp Parasitol 159:59–66 509
- Yang R, Brice B, Elliot A, Ryan U (2016) Morphological and 510
 molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like 511
 (Apicomplexa:Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia* 512
domestica, Gmelin, 1789) in Australia. Exp Parasitol 166:124–130 513

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi APROVADO o protocolo de número 021/2019 intitulado “**TAXONOMIA E ECOLOGIA DE COCCÍDIOS: IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES EM AVES SILVESTRES DO SUDESTE BRASILEIRO**”, encaminhado pelo pesquisador **Dr. Bruno Pereira Berto** do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Informamos que este parecer foi emitido em reunião ordinária da CEUA | UNIGRANRIO realizada no dia 28 de agosto de 2019, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Vigência: Setembro/2019 a Agosto/2022
Atividade: Captura e coleta de amostras fecais
Número SISBIO: 42798-2
Grupo animal: Aves silvestres (várias espécies)

DECLARATION OF APPROVAL

We hereby declare that protocol number 021/2019 entitled “**TAXONOMY AND ECOLOGY OF COCCIDIANS: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF SPECIES IN WILD BIRDS IN SOUTHEASTERN BRAZIL**” has been APPROVED. This protocol was sent by **Dr. Bruno Pereira Berto**, Department of Animal Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). Please be informed that this opinion was delivered at the regular meeting of CEUA | UNIGRANRIO held on August 28, 2019, after evaluation by the plenary of that Committee.

Sergian Vianna Cardozo
Coordenador CEUA | UNIGRANRIO

Prof. Sergian V. Cardozo
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
UNIGRANRIO





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras	08/2016	07/2019
2	Estudo estatístico	10/2016	07/2019
3	Captura de aves e coleta de amostras	07/2016	06/2019
4	Publicação em periódicos e trabalhos de congressos	11/2016	07/2019
5	Identificação dos coccídios	09/2016	07/2019

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 1/3

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Nacional do Itatiaia	RJ	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Coleção



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54951-3	Data da Emissão: 20/09/2018 12:43:30	Data da Revalidação*: 20/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bruno Pereira Berto	CPF: 103.532.617-50
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0549510320180920

Página 3/3