

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS BOTUCATU

PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

TESE DE DOUTORADO

**Caracterização morfológica e molecular de trematódeos
(Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da
bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil**

Karina Gabriele Alves Dias

Botucatu – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS BOTUCATU

PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**Caracterização Morfológica e Molecular de trematódeos
(Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da
bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil**

Karina Gabriele Alves Dias

Orientadora: Vanessa Doro Abdallah Koslowiski

Tese apresentada ao Programa de Pós
graduação em Ciências Biológicas
(Zoologia) do Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Câmpus de Botucatu, São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dias, Karina Gabriele Alves.

Caracterização morfológica e molecular de trematódeos (Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil / Karina Gabriele Alves Dias. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vanessa Doro Abdallah Koslowiski

Capes: 21302022

1. Peixes de água doce. 2. Parasitos. 3. Characiformes.
4. Relação hospedeiro-parasito.

Palavras-chave: Digenéticos; Gene 28S; ITS; Peixes de água doce; Região Neotropical.

“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância”

Simone de Beauvoir

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos momentos felizes e difíceis em minha vida, mas essencialmente por me abençoar com saúde e conhecimento.

Aos meus pais Régis e Melita, minha irmã Melissa e minha avó Imperatriz (in memoriam) pelo apoio, me incentivando a nunca desistir e mostrando que a educação sempre foi a melhor herança que eles podiam me proporcionar, além do enorme carinho e amor que sempre me foi dado durante todos os anos da minha vida. Sem vocês eu não seria nada.

Ao meu querido noivo, Arthur (Messi) pelo companheirismo, pelo carinho e amor que sempre me deu quando eu mais precisei, pelos bons conselhos que me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor, por ser meu porto seguro e amor da minha vida. Sem você eu não teria conseguido.

A minha cachorrinha Miki que virou estrelinha recentemente. Você me mostrou o amor mais puro, verdadeiro e altruísta. Obrigada por ter sido a melhor companheira que eu poderia ter.

A minha orientadora, pelas oportunidades, ensinamentos e pela confiança em meu trabalho. Isto contribuiu muito para o meu crescimento e amadurecimento profissional.

Ao Gerardo Pérez-Ponce de León, Maria Isabel Müller e Mariana Ebert Bertoldi que me auxiliaram no árduo aprendizado na área da biologia molecular. Obrigada pela paciência, parceria e pela disposição em me ensinar.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por todos os anos de ensinamentos desde a época de graduação, ao programa de Pós-graduação em Ciências

Biológicas (Zoologia) pelos conhecimentos científicos e a CAPES pelo apoio financeiro concedido durante esses anos.

Aos meus amigos de Laboratório pela convivência diária, pelas histórias malucas e divertidas, por todas as risadas e companheirismos que fizeram o meu dia a dia de pós graduanda muito mais leve. Obrigado pelo apoio e pela amizade, levarei vocês para sempre comigo.

A cidade de Botucatu, por ter me acolhido tão bem durante esses onze anos e por fazer me sentir em minha própria casa. Pela experiência de morar em vários lugares, repúblicas e conviver com pessoas tão diferentes. Pelas amizades que conquistei e por conhecer o amor da minha vida. Foi nela que vivi os melhores anos da minha vida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram direta ou indiretamente para a concretização do meu trabalho.

Sumário

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO GERAL	5
3.1 Rios e seus afluentes	6
3.2 Peixes Characiformes.....	8
3.3 Parasitos de peixes	9
3.4 Digenéticos	10
3.5 Biologia Molecular	14
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Coleta dos hospedeiros.....	21
5.2 Coleta dos parasitos	26
5.3 Análises Morfológicas	26
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	26
5.5 Análises Moleculares.....	27
5.6 Análises Filogenéticas.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. Capítulo: Molecular characterization of <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Digenea: Alloglossidiidae) in <i>Astyanax lacustris</i> (Characiformes: Characidae) from Brazil	41
7.1 Abstract.....	42
7.2 Introduction	43

7.3 Material and Methods.....	46
7.4 Results	52
7.5 Discussion.....	57
7.6 References	59
7.7 Supplementary Material	65
 8. Anexo I: A new species of <i>Creptotrematina</i> (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data	66
8.1 Supplementary Material	68
 9. Anexo II: A new species of <i>Wallinia</i> Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from <i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819) and <i>A. lacustris</i> Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences	71
9.1 Supplementary Material	73
 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

LISTA DE FIGURAS

1. **Figura 1.** Espécies de peixes coletados no rio Batalha, rio Jacaré-Pepira e rio Jacaré-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **(a)** *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016; **(b)** *Astyanax fasciatus* (Cuvier,1819)22
2. **Figura 2.** Rio Tietê e seus afluentes. Pontos de coleta com suas respectivas localidades: rio Jacaré-Guaçu e rio Jacaré-Pepira em Ibitinga e rio Batalha em Bauru, Piratininga e Reginópolis, Estado de São Paulo, Brasil. Imagem adaptada

disponível online no Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SigRH).....	23
3. Figura 3. Locais de coleta dos hospedeiros. (a) rio Batalha, no município de Piratininga (22°24'46''S; 49°05'05''W); (b) rio Jacaré-Pepira, no município de Ibitinga (21°53'30.5''S; 48°48'33.0''W); (c) rio Jacaré Guaçu, no município de Ibitinga (21°49'05.3''S; 48°54'23.7''W).....	24

Capítulo

1. Figure 1. Phylogenetic relationships based on 28S gene sequences from <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil) and some members of the Plagiorchiidae group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512642) was used as an outgroup	53
2. Figure 2. Phylogenetic relationships based on ITS sequences from <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil) and some members of the Plagiorchiidae group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512641) was used as an outgroup	54

Supplementary Material

3. Figure 3. Molecular voucher of <i>Magnivitellinum saltaensis</i> Davies, Liquin, Lauthier, Párraga, Saravia, Davies and Ostrowski de Núñez, 2021 from <i>Astyanax</i>	
---	--

<i>lacustris</i> Lucena and Soares, 2016 collected in the Jacaré-Pepira River, Ibitinga, São Paulo, Brazil.....	65
--	----

Anexo I

Supplementary Material

1. **Figure 1.** Molecular voucher of *Wallinia brasiliensis* n. sp. (number: INPA 784) from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil68
2. **Figure 2.** Ventral view of holotype (number: INPA 782) of *Wallinia brasiliensis* n. sp. collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil69
3. **Figure 3.** Scanning electron microscopy of *Wallinia brasiliensis*.n. sp. collected from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil **a.** Ventral view of the oral sucker and acetabulum.
b. Detail pointed out by the arrows of the oral sucker without papillae70

Anexo II

Supplementary Material

1. **Figure 1.** Molecular voucher of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. (number: INPA 813) from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 collected in the Batalha River, State of São Paulo, Brazil73
2. **Figure 2.** Paratype Ventral view of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. collected from the intestine of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in the Batalha River, Piratininga, State of São Paulo, Brazil.....74

3. **Figure 3.** *Creptotrematina batalhensis* n. sp. from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares 2016 and *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo State, Brazil. Ventral view of the paratype specimen from *Astyanax lacustris* paratype75
4. **Figure 4.** Oral sucker with a pair of ventrolateral muscle papillae from *Creptotrematina batalhensis* n. sp. Scanning electron microscopy: arrow indicating a pair of ventrolateral muscle papillae76

LISTA DE TABELAS

1. **Tabela 1.** Lista da biodiversidade de Trematódeos encontrados em *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) e *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016, organizados em ordem alfabética de acordo com o seu gênero16

Capítulo

1. **Table I.** Record of *Magnivitellinum simplex*, *Magnivitellinum corvitellinum*, and *Magnivitellinum saltaensis* according to their hosts, localities and references ...45
2. **Table II.** Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the 28S rDNA gene phylogenetic analysis49
3. **Table III.** Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the ITS rDNA phylogenetic analysis.....51
4. **Table IV.** Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the partial 28S rDNA gene between specimens from the

Plagiorchioidea group and the external group <i>Ceptotrematina batalhensis</i> (MT512642).....	55
5. Table V. Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the ITS between specimens from the Plagiorchioidea group and the external group <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512641).....	56

1. *Resumo*

RESUMO

O rio Tietê é o curso d'água mais importante do Estado de São Paulo e possui o rio Batalha como um de seus mais importantes afluentes. Apesar disso, o rio Batalha, bem como o rio Jacaré-Guaçu, se encontram cada vez mais poluídos devido a ações antrópicas, enquanto outros afluentes, como o rio Jacaré-Pepira, possuem águas consideradas de boa qualidade. Com isso, atualmente são crescentes os trabalhos que analisam os impactos destes problemas, como, por exemplo, o estudo da fauna parasitária dos peixes destes rios. Os trematódeos digenéticos parasitam todas as classes de vertebrados e são encontrados em vários órgãos e tecidos, sendo sua taxonomia, principalmente para as fases larvais, de reconhecimento extremamente difícil. Além de serem inseridos em diferentes famílias e gêneros marcadas por diversas mudanças na literatura, também são evidenciados por descrições antigas. Com isso, o uso de técnicas moleculares para diagnose pode ser mais eficiente quando comparadas as tradicionais metodologias taxonômicas, principalmente para espécies com pouca variação inter-específica. Deste modo, o uso da biologia molecular como ferramenta adicional aos estudos de caracterização morfológica e para o estudo evolutivo entre os grupos de parasitos, através das hipóteses filogenéticas, são de extrema importância para veracidade da diagnose de gênero e espécie. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi utilizar as técnicas de taxonomia tradicional e de biologia molecular para identificação de novas espécies de digenéticos de peixes da ordem Characiformes em três trechos do rio Tietê. Além disso, evidenciar, através de análises filogenéticas, novas relações parasitos-hospedeiro, a correta alocação dos espécimes dentro de suas respectivas famílias e novos registros de localidade e hospedeiros para a literatura.

Palavras-chave: Digenéticos, gene 28S, ITS, peixes de água doce, região Neotropical.

2. Abstract

ABSTRACT

The Tietê River is the most important river in the São Paulo State and the Batalha River is considered one of the most important tributaries of this River. However, the Batalha River has been increasingly polluted. Other tributaries of the Tietê River, like the Jacaré-Pepira River have good quality waters, while the Jacaré-Guaçu River is well impacted by anthropic actions. Considering this, studies that analyze these problems are increasing, as in the case of fish parasites. Digenean trematodes parasitize all classes of vertebrates and are found in various organs and tissues. The study of their taxonomy, especially for the larval stages, is extremely difficult to recognize. In addition to being inserted in different families and genera with major changes in the literature, they are also evidenced by old descriptions. Thus, the use of molecular techniques may be more efficient for diagnosis when compared to traditional taxonomic methods, especially for species with little intraspecific variation. In this sense, the objective of this study was to use the traditional taxonomy techniques and molecular biology in the identification of digenetic new species of the characiform fishes in three affluent of the Tietê River. As well as, evidencing, through phylogenetic analyses, new parasite-host relationships, the correct allocation of specimens within their respective families and new records of locality and hosts for the literature.

Keywords: Digenetic, 28S gene, ITS, freshwater fish, Neotropical region.

3. Introdução

INTRODUÇÃO

3.1 Rio Tietê e seus afluentes

O Brasil se destaca pela enorme descarga de água doce dos seus rios, apresentando aproximadamente 12% das águas disponíveis no planeta, distribuídos de forma irregular, variando devido aos processos climatológicos que regulam a disponibilidade de água (Agência Nacional de Águas, 2002). Desta forma, o país apresenta um conjunto importante de ecossistemas aquáticos representados por lagos, rios, represas e áreas alagadas com morfologias e morfometrias variadas e valores econômicos, sociais e ecológicos distintos (Tundisi, 2014).

O rio Tietê é um importante curso d'água do Estado de São Paulo, não somente por cortar toda a capital, mas também por atravessar praticamente todo o território paulista. Ele nasce no município de Salesópolis na Serra do Mar e atravessa toda região metropolitana, percorrendo cerca de 1.150 km até encontrar o rio Paraná, fazendo a composição de várias bacias (Ponçano *et al.*, 1981). Dentre estas bacias, encontramos a Bacia Hidrográfica do Tietê-Batalha.

O rio Batalha percorre 167 km e é considerado um dos mais importantes afluentes do rio Tietê. Sua nascente está na cidade de Agudos na Serra da Jacutinga (22°28'59"S 49°03'58"W) e sua Bacia Hidrográfica integra 11 cidades (Agudos, Piratininga, Bauru, Avaí, Duartina, Reginópolis, Presidente Alves, Uru, Pongai, Balbinos e Pirajuí) (Silva *et al.*, 2009).

Segundo a classificação da CETESB, a água do rio Batalha é considerada de boa qualidade, além disso, este rio é responsável por abastecer 45% da população bauruense (CETESB, 2017). Contudo, está ocorrendo um intenso processo de poluição

no rio pela presença de grandes indústrias que o margeiam na maioria das cidades. Estas indústrias tratam apenas uma porcentagem do esgoto e despejam o resto “*in natura*” no rio (Silva *et al.*, 2009). Além disso, a má ocupação e utilização do solo, devido a atividades antrópicas, como agricultura e pecuária contribuem para a redução da mata ripícola e nativa. Com isso, diversos processos prejudiciais ao rio são desencadeados, como a alteração da qualidade e poluição de suas águas e a exposição das áreas das nascentes, que resulta em processos de erosão de áreas adjacentes, contribuindo para o assoreamento do rio (Silva *et al.*, 2009). À vista disso, foram criadas as Áreas de Preservação Ambiental (APA's), unidades de conservação integradas, procurando harmonizar a conservação, recuperação ambiental e as necessidades humanas. Para o rio Batalha, a APA foi criada dia 01 de março de 2001 pela Lei nº 10.773 e abrange 11 municípios.

Outro rio que também se encontra na APA e faz parte da bacia do rio Tietê é o rio Jacaré-Pepira (21°53'30.5''S 48°48'33.0''W). Ele nasce na Serra de Itaqueri, localizado nas *cuestas* de São Pedro e Analândia no interior do Estado de São Paulo. Este rio, onde as matas ciliares se mantem presentes, é considerado um dos poucos do estado livres de poluição e que ainda possuem uma reserva de biodiversidade. Porém, atualmente, a bacia do rio Jacaré-Pepira está sofrendo com atividades antrópicas em seus cursos d'água (Gomiero, 2004). Como consequência dessa degradação ambiental, resultante do uso descontrolado de fertilizantes e pesticidas, desmatamento, introdução de espécies não nativas e construção de barragens, o rio vem sofrendo, cada dia mais, com a redução de sua diversidade de organismos, principalmente nas populações de peixes (Lowe-McConnell, 1990; Tundisi *et al.*, 2008).

O rio Jacaré-Guaçu (21°49'05.3''S 48°54'23.7''W), diferentemente do rio Jacaré-Pepira, se encontra em estado degradado. Suas águas fluem para o reservatório da cidade

de Ibitinga (rio Tietê) e a cabeceira é localizada na Serra de Itaqueri (município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil). Este rio é um dos principais afluentes da margem direita do rio Tietê e um dos maiores afluentes da Bacia do Alto Paraná. O rio Jacaré-Guaçu sofreu grandes impactos pelas ações antrópicas devido ao desenvolvimento industrial. A migração do homem do campo para os centros urbanos ocasionou diversos processos que auxiliaram na má qualidade das águas, como despejo de esgotos domésticos juntamente com a ação da agropecuária e uso de pesticidas (Tundisi *et al.*, 2008). Isto ocorre devido ao rio abranger importantes centros urbanos como os municípios de Analândia, Brotas, Ibaté, Itirapina e São Carlos que desenvolvem diversificadas atividades na área da agropecuária e na área industrial (Lupa, 2008). Quando comparado com o rio Jacaré-Pepira, o rio Jacaré-Guaçu é considerado mais impactado e mais densamente ocupado (Fernández-Sánchez & Novelli, 1996). Como sistema aquífero, esses rios formam duas bacias contíguas sendo tributários do rio Tietê na região central do estado de São Paulo e apresentam elevada extensão, apresentando importância socioeconômica e ambiental (Corrêa, 1995; DAEE, 2003).

3.2 Peixes Characiformes

Essencial para a cadeia alimentar e utilizados economicamente como produto alimentício, encontramos diversas espécies de peixes nesses rios. A ordem Characiformes inclui aproximadamente 478 gêneros e 3.912 espécies válidas (Eschmeyer, 2021) e seus membros vivem exclusivamente em habitats de água doce (Nelson, 2006). Os Characidae são a quarta família mais diversificada (Eschmeyer & Fricke, 2020) e sua distribuição estende-se desde a região da Patagônia na Argentina até a fronteira Estado Unidos - México (Mirande, 2010).

O gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) possui 261 espécies válidas descritas (Eschmeyer, 2020) e é popularmente conhecido como “lambari”. As espécies *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016 e *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) têm diferentes distribuições geográficas. De acordo com FishBase (<http://www.fishbase.org>), *A. fasciatus* é distribuída da Argentina ao México, embora Ornelas-García *et al.* (2008) argumente que a espécie não é encontrada no México; enquanto isso, *A. lacustris* é distribuída exclusivamente pela América do Sul, particularmente no leste do Brasil. Em relação ao hábito alimentar, ambas as espécies são preferencialmente onívoras, se alimentando de plantas aquáticas, sementes, restos de vegetais superiores ou até mesmo de insetos terrestres e peixes como alimentos secundários (Bennemann *et al.*, 2005).

Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000 era considerada válida, mas Lucena & Soares (2016) redescobriram duas espécies nominais no Brasil: *A. lacustris* e *Astyanax abramis* (Jenyns, 1842). A redescoberta dessas duas espécies foi baseada em comparações do diâmetro orbital, do número de raios da nadadeira anal e através de dados morfométricos. Com isso, reconheceram as espécies *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894), *Astyanax asuncionensis* Géry, 1972, e *A. altiparanae* como novos sinônimos juniores de *A. lacustris*. Portanto, neste trabalho, os espécimes até então considerados *A. altiparanae*, foram considerados atualmente como *A. lacustris*.

3.3 Parasitos de peixes

Os peixes são considerados os vertebrados com maiores índices de infecção causados por parasitos e, devido à sua longa história evolutiva, são também os substratos vivos com maior tempo de exposição para a adaptação de organismos simbioses (Malta, 1984). Com isso, as características do ambiente aquático facilitam a propagação, reprodução e complementação do ciclo de vida destes parasitos, o que gera índices

elevados de infestação/infecção nos peixes (Malta, 1984). Esses hospedeiros são de extrema importância tanto economicamente, através do consumo de sua carne, quanto ecologicamente para a manutenção da cadeia alimentar. Porém, devido à ação antrópica, a biodiversidade dos ambientes marinhos e dulcícolas está sendo ameaçada.

O estudo das espécies de parasitos constitui uma parte fundamental na compreensão da biodiversidade global, assunto que vem recebendo bastante destaque atualmente (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015). Apesar disso, este é o grupo menos pesquisado neste sentido, apresentando um déficit nos estudos sobre sistemática e biodiversidade parasitária, com aproximadamente 25% das espécies de parasitos descritas no mundo (Brooks & Hoberg, 2001; Poulin & Morand, 2004; Dobson *et al.* 2008). Esta biodiversidade, conseqüentemente, pode ser abordada, não apenas como uma questão de inventário de espécies, mas também como o estudo das relações hospedeiro-parasito em função de variáveis ecológicas e filogenéticas, sugerindo novas linhas de pesquisa neste sentido (Poulin & Morand, 2004).

3.4 Digenéticos

Os estudos de digenéticos estão crescentes, sobretudo em peixes caracídeos como *A. fasciatus* e *A. lacustris* (Tabela 1). Porém o estudo da taxonomia para indivíduos da Subclasse Digenea Carus, 1983, principalmente para as fases larvais, é extremamente difícil. Os estudos taxonômicos com essa Subclasse além de serem marcados por descrições antigas, também apresentam grandes mudanças na literatura em relação a alocação de família e gênero (Bray *et al.*, 2008).

Devido a esses obstáculos, é muito importante o estudo dessa fauna parasitária de modo a promover maior conhecimento das características morfológicas e biológicas como também na correta identificação taxonômica, já que isto é essencial para obter

conclusões confiáveis a respeito da biologia, ecologia e patogenicidade de qualquer digenético. Sendo assim, a associação de metodologias tradicionais com novas tecnologias pode solucionar problemas evidentes nas espécies já descritas e de novas espécies (Smith *et al.* 2008).

A Classe Trematoda Rudolphi 1808 é subdividida em duas subclasses, Aspidogastrea Faust e Tang, 1936 e Digenea. Segundo Kohn *et al.*, (2007), a América do Sul é a maior região de registros de digenéticos de peixes e desde então o número de descrições e registros vem crescendo. Estes são endoparasitos que podem ser encontrados em todos os tecidos e órgãos, parasitando todas as classes de vertebrados (Thatcher, 1981). Possuem o ciclo de vida complexo (heteróximo) onde dois ou mais hospedeiros são envolvidos, sendo que no primeiro hospedeiro, conhecido como hospedeiro intermediário, geralmente encontramos a fase larval do parasito (metacercária), majoritariamente representado por um peixe e a outra fase larval (cercaria) em gastrópodes. Já a fase adulta do parasito, os hospedeiros definitivos, geralmente são representados por peixes, aves e mamíferos (Niewiadomska, 2002). Sendo que os adultos produzem ovos que são liberados pelas fezes de seu hospedeiro definitivo, os ovos são eclodidos no ambiente liberando uma fase larval de vida livre (miracídeo). Esse miracídeo infecta geralmente gastrópodes onde vão se desenvolver até chegarem a fase de metacercária e as larvas sexuadas cercarias que podem penetrar ativamente ou ser ingeridas pelos hospedeiros definitivos (Kudlai *et al.*, 2018).

Patogenicidade

Em relação ao nível de patogenicidade, os trematódeos podem ser encontrados em qualquer tecido ou órgão. Com isso, alguns gêneros podem causar problemas para pisciculturas, dificultando a venda do pescado ou propriamente pela morte do peixe,

acarretando em perdas econômicas para o piscicultor (Thatcher, 1981). Causadas por metacercárias do gênero *Clinostomum* Leidy, 1856, a doença da mancha amarela, pode acometer as brânquias, pele, nadadeiras e gônadas dos peixes, podendo comprometer sua capacidade reprodutora (Thacher, 1981). Também acometida por diversas espécies de metacercárias, a doença da mancha preta pode ser identificada pela presença de cistos nas nadadeiras dos peixes e o nome da doença se dá, pois, esses cistos induzem a produção de pigmentação por parte dos peixes, deixando assim “manchas pretas” em seu corpo (Thatcher, 1981). Por fim, podemos evidenciar a doença dos olhos, causada pela presença de metacercárias geralmente do gênero *Diplostomum* Nordmann, 1832 nos olhos dos peixes. Estas metacercárias visam a cegueira destes para que possam ser facilmente predados e com isso, o parasito consiga completar o seu ciclo de vida (Thatcher, 1981).

Já em humanos, as zoonoses causadas por trematódeos têm grande destaque na saúde pública, principalmente nos países asiáticos como China e Japão (Santos, 1995). Em altas infecções, as manifestações clínicas podem ser graves, como nos casos de laringofaringite causada pelo digenético *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) Braum, 1899, que pode causar morte por asfixia (Eiras, 1994) e de *Alaria americana* Hall & Wigdor, 1918 causadora de uma morte no Canadá por asfixia e hemorragia pulmonar (Freeman *et al.*, 1976). No Brasil, encontramos registros dos digenéticos *Diplostomum* sp. parasitando os olhos de seres humanos (Travassos *et al.*, 1969) e de *Phagicola longus* (Ransom, 1920) parasitando o intestino de uma mulher na região de Cananéia- SP (Chieffi *et al.*, 1990; Dias & Woiciechowski, 1994).

Famílias dos digenéticos

Como importantes componentes da fauna parasitária do sistema digestivo de peixes teleósteos e de alguns vertebrados como salamandras, serpentes e anuros,

evidenciamos os digenéticos da família Allocreadiidae (Loss, 1902) (Caira & Bogéa, 2005). Estes digenéticos são relativamente pequenos e quando adultos apresentam alguns caracteres morfológicos como tegumento liso, ovos relativamente grandes, testículos em posição tandem, saco do cirro bem desenvolvido, entre outras características. O ciclo de vida envolve hospedeiros intermediários e definitivos comumente encontrados em ambientes de água doce, como insetos aquáticos, crustáceos e peixes, respectivamente (Caira & Bogéa, 2005). Em relação a sistemática dentro do grupo dos trematódeos, várias famílias sofreram diversas modificações ao longo do tempo (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015). Devido à similaridade morfológica dos adultos dos membros da família Allocreadiidae, Lepocreadiidae e Opecoeliidae, a correta identificação morfológica se torna dificultada, com isso, esses parasitos foram inseridos em diversas famílias e diferentes gêneros ao decorrer da história (Caira & Bogéa, 2005).

Outro grupo que também enfrentou diversas alocações sistemáticas foram os membros da família Macroderoididae McMullen, 1937. A identificação errônea, muitas vezes, acompanhada pela escolha de caracteres morfológicos que são muito semelhantes em diversas famílias, como também pela falta de informação do ciclo de vida, acarretaram na dificuldade da correta classificação taxonômica desse grupo de digenéticos (Font & Lotz, 2008). Em relação a esses caracteres morfológicos, geralmente apresentam tegumento espinhoso, são alongados, com cecos cegos e sistema excretor cicloide (Caira & Bogéa, 2005). Também, quando adultos, são majoritariamente encontrados no intestino de peixes de água doce e suas fases larvais já foram descritas em peixes marinhos, crustáceos e até mesmo em sanguessugas (Font & Lotz, 2008). Segundo Font & Lotz, (2008), a família Macroderoididae possuíam pelo menos nove gêneros com problemas em sua identificação taxonômica, entre eles, o gênero *Magnivitellinum* Kloss, 1966. Através de estudos filogenéticos, esse gênero foi realocado para uma nova família

descrita, família Alloglossidiidae Hernández-Mena & Pérez-Ponce de León, 2016 (Hernández-Mena *et al.*, 2016).

3.5 Biologia Molecular

Desta maneira, sugerindo-se novas linhas de pesquisa, o uso da biologia molecular está crescente como nova ferramenta, tanto nos estudos de caracterização taxonômica para diagnósticos de gênero, realocação de gêneros e confirmação de espécies, quanto para estudos da relação evolutiva e populacionais entre grupos de parasitos através de hipóteses filogenéticas (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2016). Segundo Buso (2005), o uso das técnicas moleculares pode ser mais eficiente para diagnose quando comparadas as tradicionais metodologias taxonômicas, principalmente para espécies com pouca variação intra-específica. Adicionalmente, investigações moleculares se mostraram indispensáveis para o estabelecimento das relações no campo da sistemática e filogenética para todos os níveis taxonômicos (Hillis & Moritz, 1990).

Ao longo da história da sistemática e filogenética, os genes nucleares e mitocondriais foram inseridos nos estudos de diversos animais, incluindo os parasitos. Entre o grupo de parasitos, em comparação ao marcador ITS 1-2 e os genes mitocondriais, o gene ribossomal 28S é considerado mais conservado e com pouca variação intra-específica (Blair, 2006). Dessa forma, ele é amplamente utilizado nos estudos de digenéticos para inferir grupos com parentesco próximo e distante em árvores filogenéticas a nível de gênero e família, sendo um gene eficiente para este tipo de análise (Blair, 2006) e contribuindo de maneira efetiva para elucidar a problemática encontrada sobre a diversidade de parasitos de peixes encontrada atualmente (Petkeviciute *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Os espaçadores transcritos internos (ITS 1 e ITS 2), por possuírem regiões altamente variáveis, demonstraram serem marcadores efetivos para delimitação de espécies e até mesmo para o reconhecimento de espécies morfológicamente idênticas (espécies crípticas) em estudos com helmintos (Van Herwerden *et al.*, 1998; Blair, 2006). Comparando-se o ITS 1 e o ITS2, este último, devido ao seu curto comprimento e alta variabilidade, se mostrou mais eficiente para uma rápida diferenciação entre digenéticos com posições sistemáticas incertas (Curran, 2006). Deste modo, para estudos com trematódeos, o gene ribossomal 28S e o marcador ITS-2 são amplamente utilizados atualmente para elucidar problemas de delimitação de espécies e filogenia (Razo-Mendivil *et al.*, 2014; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2018; Hernández-Mena *et al.*, 2018).

Tabela 1. Lista da biodiversidade de Trematódeos encontrados em *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) e *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016, organizados em ordem alfabética de acordo com o seu gênero.

Parasito	Referência
<i>Acanthostomum americanum</i> Pérez-Vigueras, 1956	Salgado-Maldonado, 2008
<i>Acanthostomum</i> sp.	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Allocreadiidae</i> gen. sp	Aguirre-Macedo, 2001
<i>Antorchis lintoni</i> Travassos, Artigas & Pereira, 1928	Eiras <i>et al.</i> , 2010
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	Scholz <i>et al.</i> , 1995
<i>Ascocotyle (Phagicola) longa</i> Ransom, 1920	Violante-González <i>et al.</i> , 2007
<i>Ascocotyle (Phagicola) nana</i> (Ransom, 1920)	Scholz <i>et al.</i> , 1997
<i>Ascocotyle (Ascocotyle) tenuicollis</i> (Price, 1935)	Scholz <i>et al.</i> , 1997
<i>Auricolostoma astyanace</i> Scholz, Aguirre-Macedo & Choudhury, 2004	Scholz & Choudhury, 2004
<i>Auridistomum aguirrepequeno</i> Jiménez, 1970	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Austrodiplostomum compactum</i> Lutz, 1928	Scholz & Choudhury, 2004
<i>Atrophecaecum astorquii</i> (Watson, 1976)	Scholz <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacciger astyanactis</i> Lunaschi, 1998	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> , 2017
<i>Callodistomum caballeroi</i> Jiménez, 1970	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Chalcinotrema ruedasuelensis</i> Thatcher, 1978	Thatcher, 1979
<i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori, 1924)	Salgado-Maldonado, 2001
<i>Clinostomum complanatum</i> (Rudolphi, 1814)	Salgado-Maldonado, 2001
<i>Creptotrematina aguirrepequeno</i> Jimenez, 1973	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Creptotrematina batalhensis</i> Dias & Abdallah, 2020	Alves-Dias <i>et al.</i> , 2020
<i>Dadaytremoides grandistomis</i> Thatcher, 1979	Thatcher, 1979
<i>Dendrochis retrobiloba</i> Volonterio & Ponce de León, 2005	Volonterio & Pérez Ponce de León, 2005
<i>Echinochasmus leopoldinae</i> (Scholz, Ditrich & VargasVazquez, 1996)	Violante-González, 2007
<i>Echinochasmus macrocaudatus</i> Ditrich, Scholz & Vargas-Vasquez, 1997	Scholz & Vargas-Vázquez, 1998

Tabela 1. (Continuação)

<i>Echinochasmus</i> sp.	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Genarchella astyanactis</i> (Watson, 1976)	Scholz <i>et al.</i> , 1995
<i>Genarchella fragilis</i> Lunaschi, 1990	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> , 2017
<i>Genarchella genarchella</i> (Travassos, Artigas & Pereira, 1928)	Eiras <i>et al.</i> , 2010
<i>Genarchella overstreeti</i> (Brooks, Mayes & Thorson, 1979)	Kohn <i>et al.</i> , 1990
<i>Genarchella</i> sp.	Pérez Ponce de León <i>et al.</i> , 1996
<i>Halipegus dubius</i> Klein, 1905	Thatcher, 2006
<i>Halipegus tropicus</i> Manter, 1936	Thatcher, 2006
<i>Herpetodiplostomum</i> sp.	Lizama <i>et al.</i> , 2009
<i>Magnivitellinum simplex</i> Kloss, 1966	Violante-González <i>et al.</i> , 2007
<i>Magnivitellinum saltaensis</i> Davies, 2021	Atual Trabalho
<i>Oligogonotylus manteri</i> Watson, 1976	Salgado-Maldonado, 2008
<i>Olmea laurae</i> Lamothe-Argumedo & Pineda-López, 1990	Salgado-Maldonado, 2008
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	Scholz <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhipidocotyle santanaensis</i> Lunaschi, 2004	Negrelli <i>et al.</i> , 2018
<i>Saccocoelioides chauhani</i> Lamothe-Argumedo, 1974	Aguirre-Macedo <i>et al.</i> , 2001
<i>Saccocoelioides</i> sp.	Aguirre-Macedo, 2001
<i>Tylodelphys</i> sp.	Lizama <i>et al.</i> , 2009
<i>Uvulifer</i> sp.	Salgado-Maldonado, 2005
<i>Zonocotylodes haroltravassossi</i> Padilha, 1978	Camargo <i>et al.</i> , 2016
<i>Wallinia brasiliensis</i> Dias & Abdallah 2018	Dias <i>et al.</i> , 2018

4. Objetivos

OBJETIVOS

- **Objetivo geral:**

Inventariar a biodiversidade de digenéticos adultos de peixes Characiformes da bacia do rio Tietê através da caracterização morfológica e técnicas moleculares.

- **Objetivos específicos:**

- ✓ Identificar e descrever novas espécies de digenéticos adultos em *Astyanax fasciatus* e *Astyanax lacustris* coletados nos rios Batalha, Jacaré-Pepira e Jacaré-Guaçu, baseados em análises morfológicas tradicionais associadas a dados de microscopia eletrônica de varredura e estudos moleculares a partir do sequenciamento dos genes ribossomais (28S, ITS-2);
- ✓ Realizar estudos filogenéticos e evolutivos das espécies de digenéticos adultos a partir dos resultados dos sequenciamentos dos genes ribossomais.

5. Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta dos hospedeiros

O presente estudo foi realizado através das análises de digenéticos parasitos de peixes *A. lacustris* (Figura 1a) e *A. fasciatus* (Figura 1b). As coletas desses hospedeiros foram realizadas no estado de São Paulo em três afluentes do rio Tietê (Figura 2): rio Batalha (Figura 3a), no município de Reginópolis (21°53'22''S; 49°13'41''W), Bauru e Piratininga (22°24'46''S; 49°05'05''W); rio Jacaré–Pepira (Figura 3b), no município de Ibitinga (21°53'30.5''S; 48°48'33.0''W) e rio Jacaré-Guaçu (Figura 3c), no município de Ibitinga (21°49'05.3''S; 48°54'23.7''W).

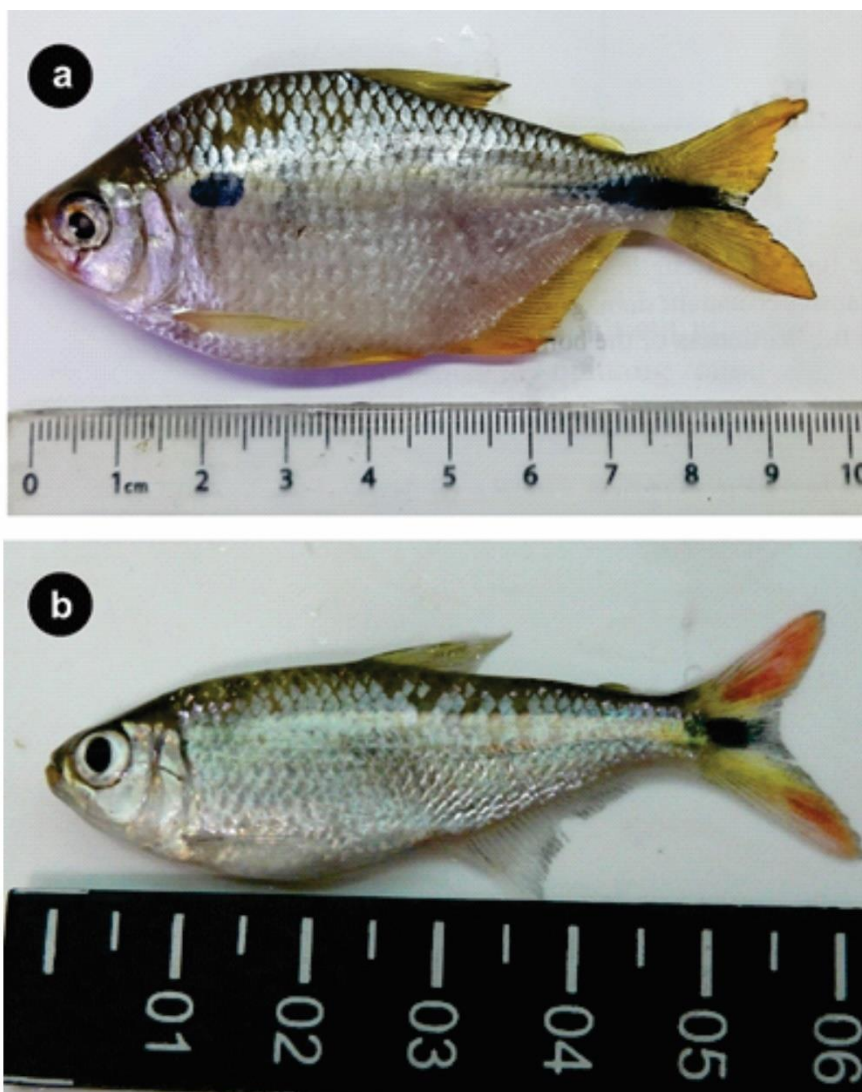


Figura 1. Espécies de peixes coletados no rio Batalha, rio Jacaré-Pepira e rio Jacaré-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **(a)** *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016; **(b)** *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819).

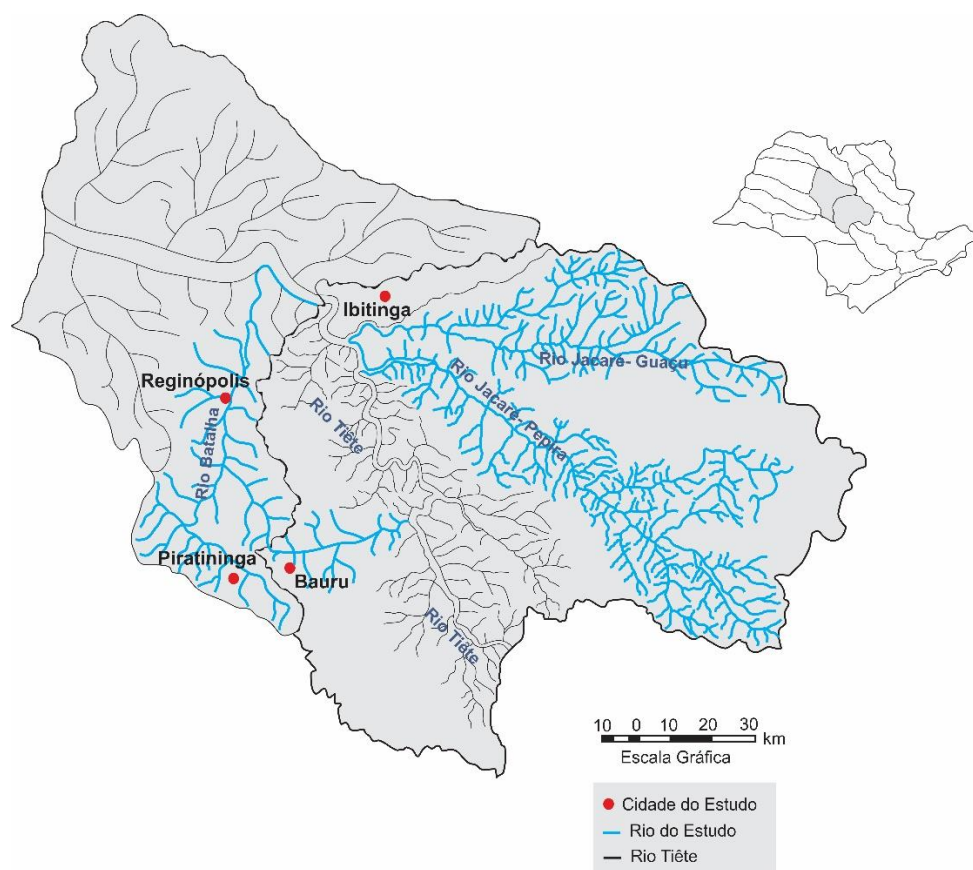


Figura 2. Rio Tietê e seus afluentes. Pontos de coleta com suas respectivas localidades: rio Jacaré-Guaçu e rio Jacaré-Pepira em Ibitinga e rio Batalha em Bauru, Piratininga e Reginópolis, Estado de São Paulo, Brasil. Imagem adaptada disponível online no Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SigRH).

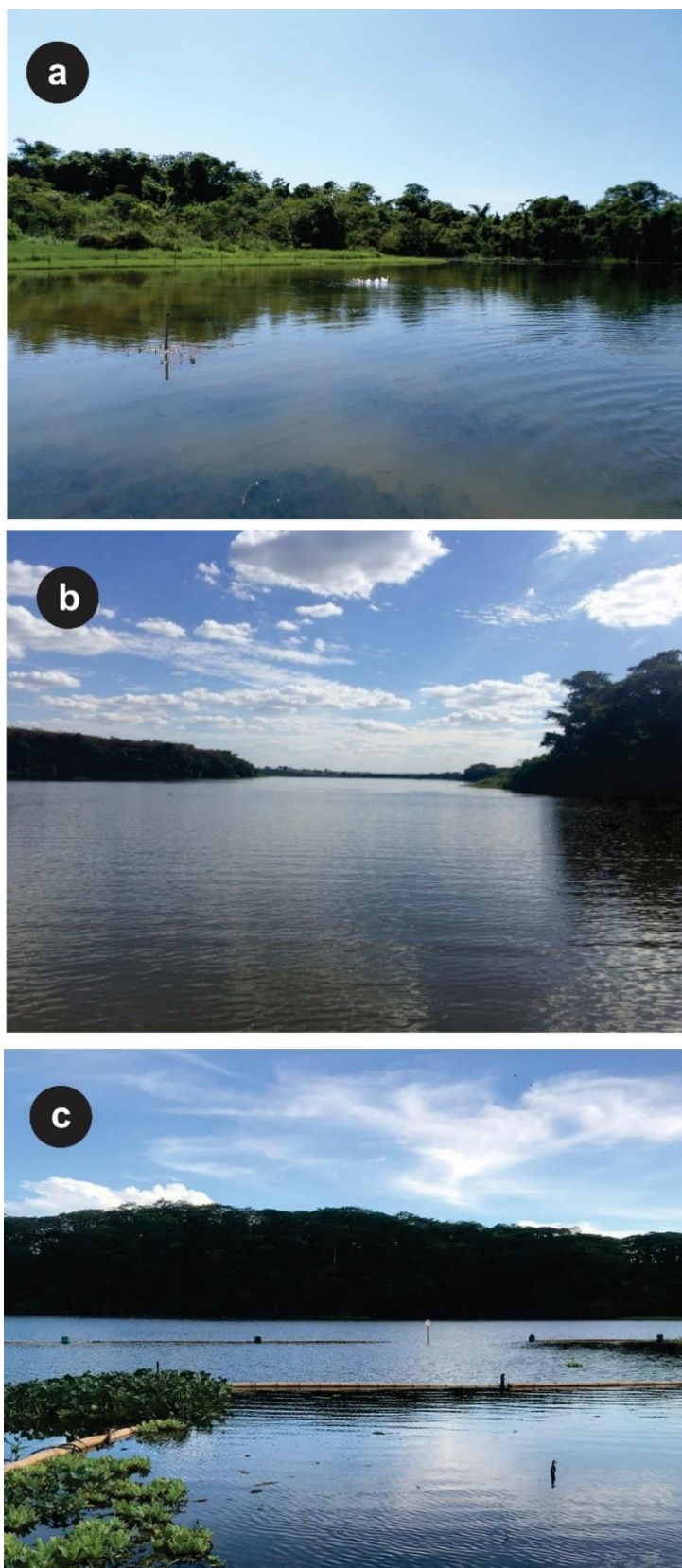


Figura 3. Locais de coleta dos hospedeiros. **(a)** rio Batalha, no município de Piratininga (22°24'46''S; 49°05'05''W); **(b)** rio Jacaré-Pepira, no município de Ibitinga (21°53'30.5''S; 48°48'33.0''W); **(c)** rio Jacaré Guaçu, no município de Ibitinga (21°49'05.3''S; 48°54'23.7''W).

As coletas foram realizadas entre julho de 2014 e junho de 2015 no rio Batalha e entre junho de 2017 a julho de 2019 nos rios Jacaré-Pepira e Jacaré-Guaçu. Foram utilizadas redes de espera com diferentes tamanhos de malhas e estas foram colocadas em diferentes alturas. As redes foram instaladas perpendicularmente e em meia lua, durante o entardecer e foram retiradas ao amanhecer, totalizando doze horas de exposição. Outros métodos de captura foram utilizados, como peneiras grandes, pesca com anzol e linha, e redes de arrasto com 200 m de comprimento.

Cerca de 250 peixes foram coletados e foram anestesiados com solução de eugenol e eutanasiados pela secção da medula espinhal de acordo com os protocolos da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; Número: 3353050417) e devidamente identificados em sacos plásticos individuais para manter inalterada a fauna parasitária e evitar possíveis contaminações de outros materiais do ambiente ou de outras espécies de peixes, separadas por pontos de amostragem. Depois disso, alguns peixes foram necropsiados no momento da coleta e analisados em campo, já os peixes restantes coletados foram congelados, acondicionados em caixa de isopor com gelo e transportados para o setor de Parasitologia, do DBBVPZ, IBB Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, onde foram mantidos congelados em freezer a -20°C até o momento da análise.

Após isso, foram anotados os registros de algumas informações como a data de coleta, a medida do comprimento padrão e total obtidos com o auxílio de um paquímetro metálico (cm), o peso total (g) obtido através de uma balança dinamométrica portátil e por fim a realização da sexagem dos espécimes de peixes.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas de experimentação animal (CEUA n. 3353050417), licença para coleta (SISBio 40998-2) e autorização do Ministério do Meio Ambiente para acesso dos dados genéticos (Sisgen nº A4901A5).

5.2 Coleta dos parasitos

Todos os órgãos dos peixes foram retirados, separados e os conteúdos foram passados com água através de uma peneira de malha de 75 micrometros, separados em placas de Petri e examinados sob microscópio estereoscópico para a coleta dos endoparasitos. Os digenéticos coletados foram separados para três análises: morfológica, microscopia eletrônica de varredura e biologia molecular.

5.3 Análises morfológicas

Para as análises morfológicas, os digenéticos coletados foram preservados em álcool 70% e para montagem das lâminas foram corados em carmim e montados permanentemente em balsamo do Canadá entre lâmina e lamínula. Para as fotomicrografias e morfometria de estruturas de valor sistemático dos parasitos foram utilizados um sistema computadorizado de análise de imagens com contraste diferencial de interferência (DIC) - LAS V3 (Suíte Leica Application V3; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e um microscópio Leica DMLS com óptica de contraste de fase do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, do Instituto de Biociências da UNESP – campus de Botucatu/SP.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram coletados e posteriormente transferidos para um tubo contendo uma solução fixadora que consiste em 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído preparado em tampão cacodilato 0,1 M, pH

7,2. As amostras foram fixadas durante 1 hora à temperatura ambiente e 12 horas a 4° C. Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixado em 1% de OsO₄, 0,8% de K₃F e (CN)₆. Após isso, foram lavados novamente em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e posteriormente desidratados em uma série de etanol graduada (20-100 ° GL) durante uma hora cada passo. O ponto crítico seco foi realizado em CO₂ e montado em tocos metálicos revestido com ouro (20-25 nm depositados). Por fim, as amostras foram examinadas sob os microscópios de elétrons de varrimento Jeol JSM-5310 e FEI Quanta 250, ambos operando a 25-30 kV e com uma pressão de $2-8 \times 10^{-4}$ Pa. Estes procedimentos foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” campus Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

5.5 Análise molecular

Após a coleta dos parasitos, alguns espécimes foram conservados em etanol absoluto para realização da biologia molecular. Para a identificação de cada espécime analisado, os digenéticos foram cortados ao meio, sendo a parte posterior removida do fixador e o DNA genômico total foi extraído utilizando o kit Qiagen Dneasy® Blood and Tissue de acordo com o protocolo do fabricante. A parte anterior do parasito foi corada em carmim e montada permanentemente em balsamo do Canadá para visualização dos caracteres morfológicos, utilizado como voucher molecular (hologenóforo Astrin *et al.*, 2013) e foram depositados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil.

Após a extração, a técnica de PCR convencional foi feita com *primers* ribossomais (Nadler & Hudspeth, 2000) e os kits Pure Taq Ready-to-Go PCR beads

(Amersham Biosciences) e MiFi DNA Polimerase GC Biotech Boline. Em seguida, foi realizado PCR convencional e os resultados foram visualizados em um gel de agarose 1% corados com GelRed para quantificação das bandas e estas foram selecionadas de acordo com sua qualidade. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados através do Kit QIAquick PCR purification (Qiagen) e enviados para sequenciamento na empresa Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI) sediada na cidade de Botucatu, estado de São Paulo. No sequenciamento, as amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2%, corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v) e visualizado sob luz UV. Para realização do sequenciamento foram utilizados os primers de acordo com cada digenético e gene trabalhado. A reação de Sequenciamento foi dada através do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e a reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. O Sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Após o sequenciamento, foram realizadas as análises dos eletroferogramas utilizando os programas EMBOSS/Merger, Chromas Lite, Geneious 4.8.3 para obtenção das sequências *consensus*.

5.6 Análise filogenética

As sequências parciais obtidas foram editadas no software Sequencher® v.5.2 (Gene Codes) e o BLAST foi utilizado para a verificação da genuinidade das mesmas. Após isso, as sequências foram alinhadas com outras sequências escolhidas e retiradas do Genbank. Os alinhamentos foram feitos pelo Muscle implementado no programa Geneious version 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012). As similaridades foram conduzidas utilizando Neighbor Joining (NJ) usando o MEGA 5.0 Software (Tamura *et al.*, 2011)

(Tempe, USA). Como método de confiabilidade foram realizadas as análises de Bootstrap (2000 repetições). Para a análise filogenética foram utilizados os métodos de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) e análise bayesiana (Bayesian Inference - BI). As análises com os softwares Mr. Bayes e RaxML foram realizadas através do CIPRES (Miller *et. al.*, 2010). Para a escolha do melhor modelo de evolução do conjunto de dados foi utilizado o programa jModelTest 2.1.1 (Posada, 2008) adotando o critério de Akaike Information Criteria (AIC). Para análise de confiabilidade dos ramos foram calculados bootstrap para ML, e para BI probabilidade posterior. Para a visualização das árvores filogenéticas foi utilizado o software Figtree v. 1.1.2.

6. Referências

- Acosta, A. A., Queiroz, J., Brandão, H., & Silva, R. J. (2015) Helminth fauna of *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, in two distinct sites of the Taquari River, São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75, 242–250.
- Agência Nacional de Águas (2002) A Evolução da Gestão dos Recursos Hídricos no Brasil. Brasília: ANA.
- Aguirre-Macedo, M. L., Scholz, T., González-Solís, D., Vidal-Martínez, V. M., Posel, P., Arjona-Torres, G., Siu-Estrada, E., & Dumailo, S. (2001) Larval helminths parasitizing freshwater fishes from the Atlantic coast of Nicaragua. *Comparative Parasitology*, 68, 42–51.
- Alves Dias, K.G., Pérez-Ponce de León G., de Almeida Camargo, A., Müller, M.I., da Silva, R.J., Kozłowski de Azevedo, R., Abdallah, V.D. (2020) A new species of *Creptotrematina* (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data. *Journal of Helminthology* 94, 1–9.
- Astrin, J.J., Zhou, X., & Misof, B. (2013) The importance of biobanking in molecular taxonomy, with proposed definitions for vouchers in a molecular context. *ZooKeys*. 365, 67–70.
- Bennemann, S. T., Gealh, A. M., Orsi, M. L., & Souza, L. M. (2005) Ocorrência e ecologia trófica de quatro espécies de *Astyanax* (Characidae) em diferentes rios da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 95, 247–254.
- Blair, D. (2006) Ribosomal DNA variation in parasitic flatworms. In: Maule, A. G., & Marks, N. J. (Eds) *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. King's Lynn: Biddles Ltd., 96–123.
- Blasco-Costa, I., Cuttmore, S.C., Miller, T.L., Nolan, M.J. (2016) Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. *Systematic Parasitology*. 93, 295–306.

- Bray, R. A., Gibson, D. I., & Jones, A. (2008) Keys to the Trematoda. International and Natural History Museum, London, 3, 373.
- Brooks & Hoberg (2001) Parasite systematics in the 21st century: Opportunities and obstacles. *Trends in Parasitology*. 17, 273–275.
- Buso, G. S. C. (2005) Marcadores Moleculares e análise filogenética. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 137).
- Caira, J. N., & Bogéa, T. (2005) Family Allocreadiidae Looss 1902. In: Jones, A., Bray, R.A., Gibson, D.I. (Eds.), Keys to the Trematoda, CABI Publishing and The Natural History Museum, Wallingford and London, UK, 2, 417–436.
- Camargo, A.A., Negrelli, D.C., Pedro, N.H.O., Azevedo, R.K., Silva, R.J., Abdallah, V.D. (2016) Metazoan parasite of lambari *Astyanax altiparanae*, collected from the Peixe river, São Paulo, southeast of Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 46, 876–880.
- CETESB, São Paulo. (2017) Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016 [recurso eletrônico] / CETESB, São Paulo: CETESB.
- Chieffi, P. P., Leite, O. H., Dias, R. M. D. S., Torres, D. M. A. V., (1990) Human parasitism by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in Cananéia, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 32, 285–8.
- Corrêa, U. M. P. (1995) Estudo das águas subterrâneas das bacias hidrográficas dos rios Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira no Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 3, 107.
- Curran, S. S., Tkach, V. V., & Overstreet, R. M. (2006) A review of *Polylekithum* Arnold, 1934 and its familiar affinities using morphological and molecular data, with

- description of *Polylekithum catahoulensis* sp. nov. *Acta Parasitologica*, 51, 238–248.
- DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica (2003) Estudo de Águas Subterrâneas: Região Administrativa no 6, Ribeirão Preto. São Paulo: XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços 15 IPT–Instituto de Pesquisas Tecnológicas 4.
- Dias, E.R.A., Woiciechowski, E. (1994) Ocorrência de *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos e no homem, em Registro e Cananéia, SP. *Higiene Alimentar*.8, 31, 3–6.
- Dias, K.G.A., Müller, M.I., Almeida, A.C., Silva, R.J., Azevedo, R.K., Pérez-Ponce de León, G., & Abdallah, V.D. (2018) A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. *Parasitology Research*, 117, 2847–2854.
- Dobson, A., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., & Jetz, W. (2008) Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (Supplement 1), 11482–11489.
- Eiras, J.C. (1994) *Elementos de ictioparasitologia*. Porto: Fundação Eng. António de Almeida.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., & Pavanelli, G.C. (2010) Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil. *Clichetec*, Maringá. 333.
- Eschmeyer, W.N. (2021) *Catalog of fishes: Genera, Species Reference*. Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (acesso 1 de abril de 2021).

- Eschmeyer, W.N., & Frick, R. (2020) Catalog of Fishes electronic version <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatsearch.html>. (Acesso em 20 de abril de 2020).
- Fernández-Sánchez, M.T., & Novelli, A. (1996) Characterization of neurotoxicity by the amnesic shellfish toxin domoic acid in cultured neurons. *Neurología*, 11, 29–39.
- Freeman, R.S., Stuart, P.F., Cullen, J.B., Ritchie, A.C., Mildon, A., Fernandes, B.J., & Bonin, R. (1976) Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria americana*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25, 803–807.
- Font, W.F., & Lotz, J.M., (2008) Family Macroderoididae McMullen, 1937. In: Bray, R. A., Gibson, D.I. & Jones, A. (Eds). *Keys to the Trematoda*, volume 3. Wallingford: CABI Publishing and the Natural History Museum, 373–380.
- Gomiero, L.M., & Braga, F.M.S., (2004) Reproduction of species of the genus *Cichla* in a reservoir in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 64, 613–624.
- Hernandez-Mena, D.I., Mendoza-Garfias, B., Ornelas-Garcia, C.P., & Pérez-Ponce de León, G. (2016) Phylogenetic position of *Magnivitellinum* Kloss, 1966 and *Perezitrema* Barus & Moravec, 1967 (Trematoda: Plagiorchioidea: Macroderoididae) inferred from partial 28S rDNA sequences, with the establishment of Alloglossidiidae n. fam. *Systematic Parasitology*, 93, 525–538.
- Hernandez-Mena, D.I., Lynggaard, C., Mendoza-Garfias, B., & Pérez-Ponce de Leon, G. (2018) A new species of *Auriculostoma* (Trematoda: Allocreadiidae) from the intestine of *Brycon guatemalensis* (Characiformes: Bryconidae) from the Usumacinta River Basin, Mexico, based on morphology and 28S rDNA sequences, with a key to species of the genus. *Zootaxa*, 2, 261–277.

- Hillis, D.M., & Moritz, C., (1990) Molecular systematics. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Press. 250, 1022–1023.
- Kearse, M., Moir, R., & Wilson, A., (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28, 1647–1649.
- Kohn, A., Fernandes, B.M.M., Gibson, D. I., & Fróes, O. M., (1990) On the Brazilian species of halipegine genera (Trematoda: Derogenidae) from fishes, with new morphological data, hosts and synonyms. *Systematic of Parasitology*, 16, 201–211.
- Kohn, A., Fernandes, B.M.M., & Cohen, S.C. (2007). South American trematodes parasites os fishes. Rio de Janeiro: Imprinta Express, 318.
- Kuchta, R. et al. (2018) Part 4. A systematic survey of the parasites of freshwater fishes in Africa. *ABC TAXA*, 18, 135–360.
- Lizama, M.A.P., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. (2009) ECOLOGICAL ASPECTS OF METAZOAN PARASITES OF *Astyanax altiparanae* GARUTTI & BRITSKI, 2000 (CHARACIDAE) OF THE UPPER PARANÁ RIVER FLOODPLAIN, BRAZIL. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34, 527–533.
- Lowe-Mcconell, R.H., (1990) Summary address: rare fish, problems, progress and prospects for conservation. *Journal of Fish Biology*, 37, 263–269.
- Lucena, C.A., & Soares, H.G., (2016) Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal system of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072, 101–125.
- Lupa, São Paulo (2008) Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola. Levantamento

- censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008. São Paulo: SAA/CATI/IEA. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>> (Acesso 20 de dezembro de 2020).
- Malta, J.C.O., (1984) Os peixes de um lago de várzea da Amazônia Central (Lago Janauacá, rio Solimões) e suas relações com os crustáceos ectoparasitas (Branchiura: Argulidae). *Acta Amazonica*, 14, 355–372.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T., (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. [https://doi: 10.1109/GCE.2010.5676129](https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129).
- Mirande, J.M., (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyologic*, 8, 385–568.
- Nadler, S.A., & Hudspeth, D.S.S., (2000) Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology*, 86, 380–393.
- Nelson, J.S., (2006) *Fishes of the world*. 4ª edição. New York: John Wiley & Sons. 601.
- Negrelli, D.C., Abdallah, V.D., Azevedo, R.K., (2018) Metazoan parasites of the lambari *Astyanax altiparanae* collected in the Batalha River, State of São Paulo, Brazilian *Journal of Biology*, 78, 535–539.
- Niewiadomska, K., (2002) Family Diplostomidae Poirier, 1886. In: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. (Ed.). *Keys to the Trematoda*. Wallingford: CABI Publishing, 1, 167–196.
- Ornelas-Garcia, C.P., Dominguez-Dominguez O., & Doadrio, I., (2008) Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actynopterigii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC. Evolucionary Biology*, 8, 340.

- Pérez-Ponce de León, G., García-Prieto, L., & León-Règagnon, V., (1996) Gastrointestinal digenetic trematodes of Olive Ridley's turtle *Lepidochelys olivacea* from Oaxaca, México. Taxonomy and infracommunity structure. Journal of the Helminthological Society of Washington, 63, 76– 82.
- Pérez-Ponce de León, G., Razo-Mendivil, U., Mendoza-Garfias, B., Rubio-Godoy, M., & Choudhury, A., (2015) A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) in *Astyanax mexicanus* (Characidae) from Mexico revealed by morphology and sequences of the 28S ribosomal RNA gene. Folia Parasitology, 62, 1–6.
- Pérez-Ponce de Leon, G., Pinacho-Pinacho, C.D., Mendoza-Garfias, B., Choudhury, A., & Garcia-Varela, M., (2016) Phylogenetic analysis using the 28S rRNA gene reveals that the genus *Paracreptotrema* Choudhury, Pérez-Ponce de Leon, Brooks and Daverdin, 2006 (Digenea: Allocreadiidae) is not monophyletic; description of two new genera and one new species. Journal of Parasitology, 102, 131–42.
- Petkeviciute, R., Stunzenas, V., Staneviciute, G. & Sokolov, S.G., (2010) Comparison of the developmental stages of some European allocreadiid trematode species and a clarification of their life-cycles based on ITS2 and 28S sequences, Systematic Parasitology, 76, 169–178.
- Ponçano, W.L., Carneiro, C.D.R., Bistrichi, C.A., De Almeida, F.F.M., & Prandini, F.L., (1981) Mapa Geomorfológico do Estado de São Paulo. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo. 94.
- Posada, D., (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution. 25, 1253–1256.

- Poulin, R., & Morand, S., (2004) Parasite Biodiversity. Smithsonian Books, Washington, EUA. 216.
- Razo-Mendivil, U., Mendoza-Garfias, B., Pérez-Ponce de Leon, G. & Rubio-Godoy, M., (2014) A New Species of *Auriculostoma* (Digenea: Allocreadiidae) in the mexican tetra *Astyanax mexicanus* (Actinopterygii: Characidae) from central Veracruz, Mexico, described with the use of morphological and molecular Data. Journal of Parasitology, 100, 331–337.
- Salgado-Maldonado, G., Cabanas-Carranza, E., Soto-Galera, J.M., Caspeta-Mandujano, R.G., Moreno-Navarrete, P., Sanchez-Nava & Aguilar-Aguilar, R., (2001) A checklist of helminth parasites of freshwater fishes from the Lerma-Santiago River basin, Mexico. Comparative Parasitology, 68, 204–218.
- Salgado-Maldonado, G., Aguilar-Aguilar, R., Cabañas-Carranza, G., Soto-Galera, E., & Mendoza-Palmero, C., (2005) Helminth parasites in freshwater fish from the Papaloapan River basin, Mexico. Parasitology Research, 96, 69–89.
- Salgado-Maldonado, G., (2008) Helminth parasites of freshwater fish from Central America. Zootaxa, 1915, 29–53.
- Santos, A.L., (1995) Prevention and contrai of food bome trematodes in cultured fish. INFOFISH International, 2, 57–62.
- Scholz, T., Vargas-Vázquez, J., Moravec, F., Vivas-Rodríguez, C., & Mendoza-Franco, E., (1995) Metacercariae of trematodes of fishes from cenotes (= sinkholes) of the Yucatan Peninsula, Mexico. Folia Parasitologica, 42, 173–192.
- Scholz, T., Vargas-Vázquez, J., Vidal-Martínez, V.M., & Aguirre-Macedo, L., (1997) *Ascocotyle nunezae* n. sp. (Digenea: Heterophyidae), from Yucatan, Mexico. The Journal of Parasitology, 83, 141–147.

- Scholz, T., & Vargas-Vázquez, J., (1998) Trematodes parasitizing fishes of the rio Hondo River and freshwater lakes of Quintana Roo, Mexico. *Systematic Parasitology*, 49, 23–39.
- Scholz, T., Aguirre-Macedo, M.L., & Choudhury, A., (2004) *Auriculostoma astyanace* n. gen., n. sp. (Digenea: Allocreadiidae), from the banded *Astyanax*, *Astyanax fasciatus* (Characiformes: Characidae), from Nicaragua, with a reevaluation of Neotropical *Crepidostomum* spp. *Journal of Parasitology* 90, 1128–1132.
- Silva, F.L., Talamoni, J.L.B., Bochini, G.L., Ruiz, S.S., & Moreira, D.C., (2009) Macroinvertebrados aquáticos do reservatório do rio Batalha para a captação das águas e abastecimento do Município de Bauru, SP, Brasil. *Revista Ambiente e Água*, 4, 66–74.
- Smith, P.J., Mcvegh, S.M., & Steinke, D., (2008) DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464–471.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Masatoshi, N., & Kumar, S., (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Thatcher, V.E., (1979) Paramphistomidae (Trematoda: Digenea) de peixes de água doce: dois novos gêneros da Colômbia e uma redescrição de *Dadaytrema oxycephala* (Desing, 1836) Travassos, 1934, da Amazônia. *Acta Amazonica*, 9, 203–208.
- Thatcher, V.E., (1981) Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. *Acta Amazonica*, Manaus, 11, 125–140.
- Thatcher, V.E., (2006) Amazon fish parasites. Sofia-Moscow: Pensoft, 508.
- Travassos, L., Teixeira de Freitas, J. F., & Kohn, A., (1969) Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 67, 1–886.

- Tundisi, J.G., (2008) Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções, estudos avançados, 22.
- Tundisi, J.G., (2014) Recursos hídricos no Brasil: problemas, desafios e estratégias para o futuro / José Galizia Tundisi (coordenador). – Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 26.
- Van Herwerden, L., Blair, D., & Agatsuma, T., (1998) Intra- and inter-individual variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *S. japonicum* species complex. *Parasitology*, 116, 311–7.
- Violante-González, J., Aguirre-Macedo, M.L., & Mendoza-Franco, E.F., (2007) A checklist of metazoan parasites of fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Parasitology Research*, 102, 151–161.
- Volonterio, O., & Ponce de León, R., (2005) Description of *Dendrorchis retrobiloba* n. sp. (Digenea: Gorgoderidae) from *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characidae) from southern Uruguay, with an emended diagnosis of the genus *Dendorchis*. *Journal of Parasitology*, 91, 1204–1207.

7. Capítulo

Molecular characterization of *Magnivitellinum saltaensis* (Digenea: Alloglossidiidae) in *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) from Brazil

7.1 ABSTRACT

The Plagiorchioidea Luhe, 1901 superfamily is characterized by its diversity of trematodes and by being a paraphyletic and polyphyletic group. Through morphological characters analysis, the genus *Magnivitellinum* Kloss, 1966 was first inserted within the Allocreadiidae family (Looss, 1902), but with the advances in molecular techniques, the genus was later included in the Alloglossidiidae family. In the present work, only molecular analyses were performed, using data from the 28S gene and the ITS2 internal spacer, for investigation and phylogenetic position in the context of the Plagiorchioidea phylogeny. Two specimens were sequenced from *Astyanax lacustris* in the Jacaré-Pepira river, São Paulo, Brazil, and was identified as *Magnivitellinum saltaensis* Davies, Liquin, Lauthier, Párraga, Saravia, Davies and Ostrowski de Núñez, 2021, a species described in the characiform fish *Psalidodon endy* (Mirande, Aguilera and Azpelicueta, 2006) Terán, Benitez, and Mirande, 2020 from Argentina. Our analysis also showed that they are a sister taxon to *Magnivitellinum simplex*, members found in *Astyanax mexicanus*, in Mexico. Therefore, our work describes new data on molecular sequences for the *M. saltaensis* and a new record of host and locality.

Keywords: 28S rDNA, Characidae, ITS, Jacaré-Pepira River, Trematode.

7.2 INTRODUCTION

The Plagiorchioidea Luhe, 1901 superfamily is characterized by being a paraphyletic or polyphyletic group and its diversity of trematodes (Bray et al. 2008). The family Macroderoididae McMullen, 1937 consists of digeneans found mostly in freshwater fish, and their phylogenetic relationships have been highlighted among researchers, which has led to several changes over time. Due to the choices of some morphological characters and the lack of their life cycle clarification, the diagnosis of members of this family was not elucidated and accepted for years (Font & Lotz 2008).

Through the analysis of morphological characters, the genus *Magnivitellinum* Kloss, 1966 was first inserted into the Allocreadiidae family (Looss 1902), but with advances in molecular techniques, Hernández-Mena 2016 proposed the inclusion of this genus in the family Alloglossidiidae Hernández-Mena, Mendoza-Garfias, Ornelas-García & Pérez-Ponce de León, 2016. Thus, the use of molecular biology for the study of evolution among groups of parasites, through phylogenetic hypothesis, is extremely important (Pérez-Ponce de León, et al. 2015; Hernández-Mena et al. 2016; Dias et al. 2018).

To date, three species of the genus have been described: first, the type species, *Magnivitellinum simplex* Kloss, 1966, which was found in the intestine of a freshwater characid fish, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus 1758), from Mogi-Guaçu river, in Brazil (Kloss 1966); the second species described was *Magnivitellinum corvitellinum* Lacerda, Takemoto & Pavanelli, 2009 found in the intestine of freshwater siluriformes fish, *Hoplosternum littorale* (Hancock 1828), from Paraná River, Brazil (Lacerda et al. 2009); and the third recently described is *Magnivitellinum saltaensis* Davies, Liquin, Lauthier, Párraga, Saravia, Davies, and Ostrowski de Núñez 2021, found in a characiform fish,

Psolidodon endy (Mirande, Aguilera and Azpelicueta 2006) Terán, Benitez and Mirande 2020 from Argentina.

Several studies recorded these three species in numerous hosts and locations (Table I). However, only two species of the genus, *M. simplex* and *M. saltaensis*, have molecular sequences deposited in Genbank.

In the present study, we carried out molecular analysis using the 28S gene and the ITS2 internal spacer to investigate and determine the phylogenetic position in the context of the Plagiorchioidea phylogeny. We describe a new host and locality record of *M. saltaensis*, and provide new molecular sequence data for this species. Due to the limited number of specimens found, we did not perform morphological analyses.

Table I. Records of *Magnivitellinum simplex*, *Magnivitellinum corvitellinum*, and *Magnivitellinum saltaensis* according to their hosts, localities and references.

Parasite	Host	Locality	Reference
<i>Magnivitellinum simplex</i>	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	Scholz et al. 1995
	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	Pérez-Ponce de León et al. 2010
	<i>Astyanax. mexicanus</i>	Mexico	Pérez-Ponce de León et al. 2015
	<i>Astyanax. mexicanus</i>	Mexico	Hernandez-mena et al. 2016
	<i>Astyanax. mexicanus</i>	Nicaragua	Aguirre-Macedo et al. 2001
	<i>Astyanax aeneus</i>	Mexico	Hernandez-mena et al. 2016
	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Argentina	Lunaschi, 1989
	<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	Argentina	Lunaschi, 1989
	<i>Arius felis</i>	Mexico	Scholz et al. 1997
	<i>Roeboides paranaensis</i>	Brazil	Kohn et al. 2007
	<i>Oligosarcus jenynsii</i>	Argentina	Lunaschi, 1989
	<i>Ilyodon furcoides</i>	Mexico	Salgado-Maldonado et al. 2004
	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Brazil	Tchatcher, V.E 1991
	<i>Hoplosternum littorale</i>	Argentina	Ostrowski de Núñez et al. 2017
<i>Magnivitellinum corvitellinum</i>	<i>Hoplosternum littorale</i>	Brazil	Lacerda et al. 2009
	<i>Hoplosternum littorale</i>	Brazil	Azevedo et al. 2010
	<i>Hoplosternum littorale</i>	Brazil	Azevedo et al. 2011
	<i>Hoplosternum littorale</i>	Brazil	Dias et. al. 2017
	<i>Hoplosternum littorale</i>	Argentina	Ostrowski de Núñez et al. 2017
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Psalidodon endy</i>	Argentina	Davies et. al. 2021
	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil	Present work

7.3 MATERIAL AND METHODS

Fifty *A. lacustris* were collected between June 2017 and July 2018 in the Jacaré-Pepira River, Ibitinga, State of São Paulo, Brazil. After being collected, fish were anesthetized with a eugenol-based solution and euthanized by spinal section. The hosts were dissected, and two specimens of *M. saltaensis* were found in the intestine. The parasites were conserved in absolute ethanol for DNA extraction and medially cut to obtain the molecular voucher (Astrin et al. 2013). The prevalence was 2% and the mean intensities were 2 digeneans per infected host and the samples were deposited with the National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil (Astrin et al. 2013).

For 28S gene and the ITS 2 internal spacer molecular characterization, the specimens were cut medially and the anterior portion was stained with carmine and mounted in Canada balsam. The posterior region was used for genomic DNA extraction following the Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit protocols, totaling 30 µl of solution. For the 28S rRNA gene, DNA fragments were amplified from the D1-D3 domains with the forward 28dig12 (5'-AAGCATATCACTAAGCGG-3'; Curran et al. 2011) and reverse 1500R (5'-GCTATCCTGAGGGAACTTCG-3' ; Olson et al. 2003) primers. For the ITS2 spacer, the primers used were forward Glyp1 (5'-GCTGAGAAGACGACCAAACCTTGAT-3'; Razo-Mendivil et al. 2010) and reverse BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'; Bowles et al. 1995).

The PCR solution volume for both reactions were 25 µL, with 5 µL of extracted DNA, 1 µL of each primer, 12.5 µL of Mifi PCR and 5.5 µL of water. The amplification cycle used for the 28S gene was 94 °C for 3 min (denaturation); 45 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s and 72 °C for 90 s; and a final extension of 72°C for 10 min. The ITS

amplification cycle was the same, modifying only the annealing temperature (55°C) and the number of cycles (35). PCR products were visualized on agarose gel (1%) using 2 µl of PCR product, carrier buffer and GelRed, and then sent for sequencing.

For the phylogenetic analyses, 23 sequences of the 28S rDNA gene were obtained from GenBank from specimens of the Macroderoididae, Alloglossidiidae and Leptophallidae families, phylogenetically close and included within the Plagiorchioidea group (Table II). For the tree rooting, *Ceptotrematina batalhensis* (MT512642) of the Allocreadiidae family was used as an outgroup with the alignment final size of 1098 bp. For the ITS, 13 sequences were retrieved from GenBank, from the Macroderoidiidae and Alloglossidiidae families and, as an outgroup, the species *Creptotrematina batalhensis* (MT512641) from the Allocreadiidae family (Table III) with the final alignment size of 778 bp.

The sequences were aligned, using the MUSCLE software (Edgar 2004), implemented within the Geneious Server database, version 7.1.3 program using the default settings and had their extremes trimmed (Kearse et al. 2012). To assess the occurrence of saturation replacement, the replacement saturation index (ISS) was estimated using the DAMBE5 (Xia 2013). The number of base substitutions per site between sequences was calculated. Standard error estimations were obtained using the bootstrap procedure (1000 replicates). The analyses were performed using the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980) with MEGA6 (Tamura et. al. 2013). The evolutionary model used to estimate the ultrametric tree was GTR + I+ G.

Maximum Likelihood (ML) analyses were performed with RaxML v.8 (Stamatakis 2014). The model parameters and bootstrap value (1,000 repetitions) were estimated with RaxML. RaxML analyzes were performed using CIPRES (Miller et. al.

2010). The phylogenetic trees were generated and edited with FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Table II. Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the 28S rDNA gene phylogenetic analysis.

Parasite	Host	Locality	Genbank	Reference
Allocreadiidae Looss, 1902			MT512642	
<i>Creptotrematina batalhensis</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil		Dias et al., 2020
Auridistomidae Stunkard, 1924				
<i>Auridistomum chelydrae</i>	<i>Chelydra serpentina</i>	United States	AY116872	Olson et al., 2003
Aloglossidiidae Hernandez-Mena, 2016				
<i>Alloglossidium geminum</i>	<i>Ameiurus melas</i>	United States	JF440779	Tkach 2011
<i>Alloglossidium kenti</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	United States	JF440809	Tkach 2011
<i>Alloglossidium corti</i>	<i>Ameiurus natalis</i>	United States	JF440798	Tkach 2011
<i>Magnivitellinum simplex</i>	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	KU535683	Hernandez-Mena et al., 2016
<i>Magnivitellinum simplex</i>	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	KU535680	Hernandez-Mena et al., 2016
<i>Magnivitellinum simplex</i>	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	KU535681	Hernandez-Mena et al., 2016
<i>Magnivitellinum simplex</i>	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	KU535679	Hernandez-Mena et al., 2016
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Psalidodon endy</i>	Argentina	MN744313	Davies et al., 2021
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Psalidodon endy</i>	Argentina	MN744314	Davies et al., 2021
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil	*	Present Work
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil	*	Present Work
Macroderoididae McMullen, 1937				
<i>Paramacroderoides kinsellai</i>	<i>Lepisosteus oculatus</i>	United States	HM137661	Tkach 2011
<i>Paramacroderoides kinsellai</i>	<i>Lepisosteus platyrhincus</i>	United States	HM137662	Tkach 2010
<i>Macroderoides texanus</i>	<i>Atractosteus spatula</i>	United States	EU850398	Tkach 2011
<i>Macroderoides typicus</i>	<i>Amia calva</i>	United States	HQ680849	Tkach 2011
<i>Macroderoides flavus</i>	<i>Esox niger</i>	United States	HQ680851	Tkach 2011

Table II. (Continuation)

<i>Macroderoides trilobatus</i>	<i>Amia calva</i>	United States	EU850410	Tkach 2008
<i>Perezitrema bychowskyi</i>	<i>Atractosteus tropicus</i>	Mexico	KU535686	Hernandez-Mena et al.,2016
Leptophallidae Dayal, 1938				
<i>Leptophallus nigrovenosus</i>	<i>Natrix natrix</i>	Ukraine	AF151914	Tkach 2000
<i>Paralepoderma cloacicola</i>	<i>Natrix natrix</i>	Ukraine	AF151910	Tkach 1999
<i>Metaleptophallus gracillimus</i>	Snake	Ukraine	AF151912	Tkach 2000

*Genbank number will be available after article acceptance

Table III. Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the ITS rDNA phylogenetic analysis.

Parasite	Host	Locality	Genbank	Reference
Allocreadiidae Looss, 1902				
<i>Creptotrematina batalhensis</i>	<i>Astyanax fasciatus</i>	Brazil	MT512641	Alves-Dias et al. 2020
Aloglossidiidae Hernandez-Mena, 2016				
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil	*	Present work
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Astyanax lacustris</i>	Brazil	*	Present work
<i>Alloglossidium corti</i>	<i>Ameiurus natalis</i>	United States	JF440798	Tkach 2011
<i>Alloglossidium geminum</i>	<i>Ameiurus melas</i>	United States	JF440779	Tkach 2011
<i>Alloglossidium kenti</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	United States	JF440809	Tkach 2011
Macroderoididae McMullen, 1937				
<i>Macroderoides trilobatus</i>	<i>Amia calva</i>	United States	EU850410	Tkach 2008
<i>Macroderoides flavus</i>	<i>Esox niger</i>	United States	HQ680851	Tkach 2011
<i>Macroderoides typicus</i>	<i>Amia calva</i>	United States	HQ680849	Tkach 2011
<i>Macroderoides texanus</i>	<i>Atractosteus spatula</i>	United States	EU850399	Tkach 2008
<i>Macroderoides spiniferus</i>	<i>Lepisosteus osseus</i>	United States	EU850404	Tkach 2008
<i>Macroderoides minutus</i>	<i>Lepisosteus platyrhincus</i>	United States	HQ680850	Tkach 2011
<i>Paramacroderoides kinsellai</i>	<i>Lepisosteus platyrhincus</i>	United States	HM137662	Tkach 2010

* Genbank number will be available after article acceptance

7.4 RESULTS

The topologies obtained revealed that the species found was *M. saltaensis*. The topology found by the analysis of the 28S gene showed that this species is a sister taxon of *M. simplex* (Figure 1), while the phylogenetic analysis of the ITS demonstrated it to be a sister taxon of *Alloglossidium geminum* (Mueller, 1930) from *Ameiurus melas* (Rafinesque, 1820), *A. corti* (Lamont, 1921) from *Ameiurus natalis* (Lesueur, 1819) and *A. kenti* (Simer, 1929) from *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818), all of them found in the United States and belonging to Alloglossidiidae family (Figure 2).

Genetic divergences were not highlighted for the 28S gene analysis between the species of this work and the specimens of *M. saltaensis* from Argentina, while, for its sister species, *M. simplex*, we observed a genetic distance of 1 to 2% (Table IV). Regarding the internal spacer (ITS), the specimens of this work obtained 11 to 12% genetic divergence in relation to the sister taxon for the species *A. geminum*, *A. corti* and *A. kenti* (Table V).

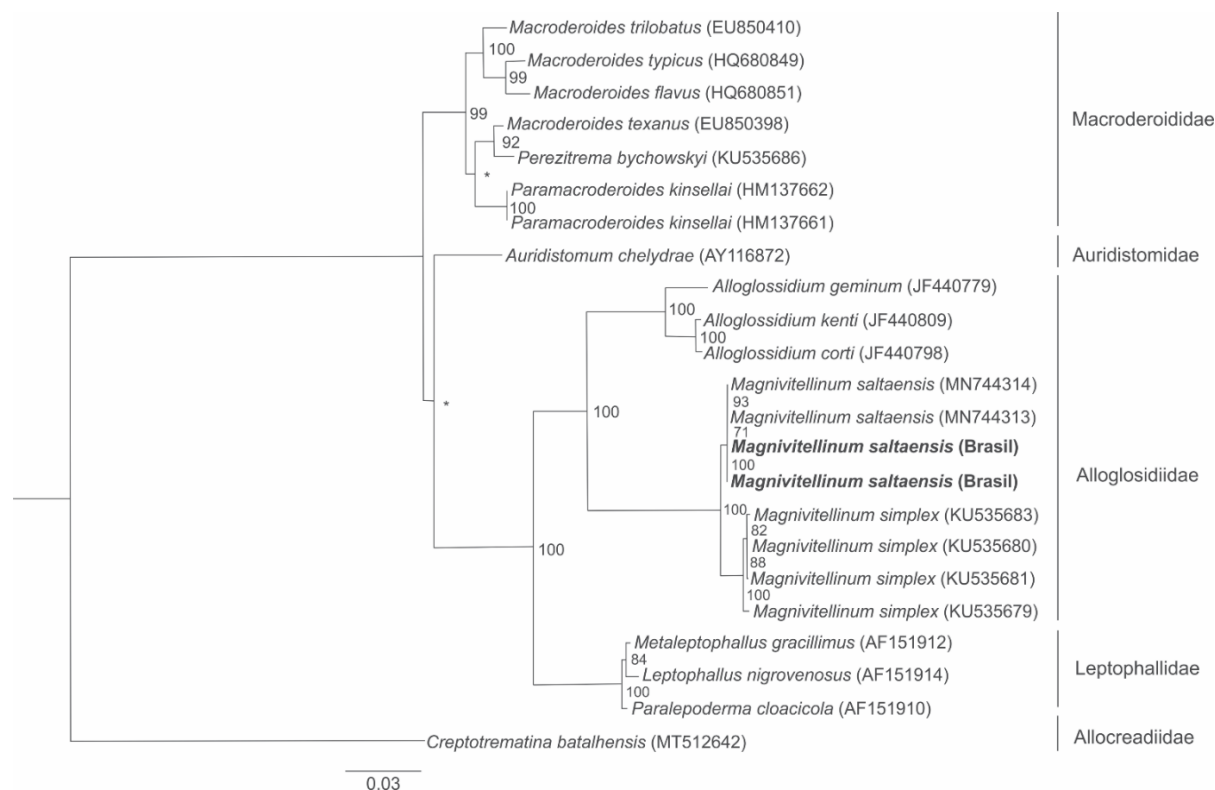


Figure 1. Phylogenetic relationships based on 28S gene sequences from *Magnivitellinum saltaensis* (Brazil) and some members of the Plagiorchioidea group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species *Creptotrematina batalhensis* (MT512642) was used as an outgroup.

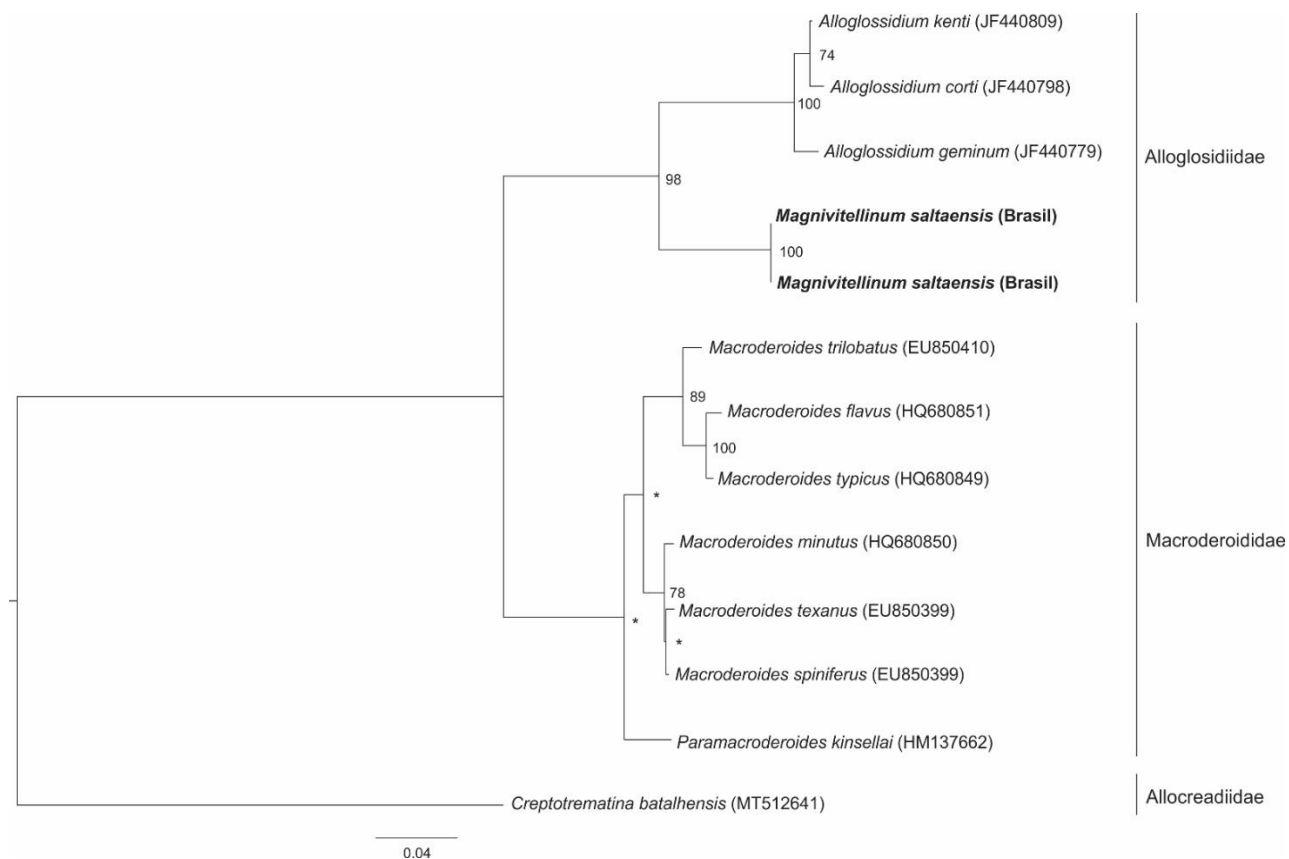


Figure 2. Phylogenetic relationships based on ITS sequences from *Magnivitellinum saltaensis* (Brazil) and some members of the Plagiorchioidea group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species *Creptotrematina batalhensis* (MT512641) was used as an outgroup.

Table IV. Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the partial 28S rDNA gene between specimens from the Plagiorchioidea group and the external group *Creptotrematina batalhensis* (MT512642).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1- <i>Creptotrematina batalhensis</i>																						
2- <i>Auridistomum chelydrae</i>	26																					
3- <i>Paramacroderoides kinsellai</i>	25	6																				
4- <i>Paramacroderoides kinsellai</i>	25	6	0																			
5- <i>Macroderoides texanus</i>	25	6	2	2																		
6- <i>Perezitrema bychowskyi</i>	25	5	3	3	1																	
7- <i>Macroderoides trilobatus</i>	26	6	3	3	3	3																
8- <i>Macroderoides flavus</i>	27	8	4	4	4	4	3															
9- <i>Macroderoides typicus</i>	27	7	4	4	3	3	2	2														
10- <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil)	29	13	14	14	14	14	15	14	15													
11- <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Argentina)	29	13	14	14	14	14	15	14	15	0												
12- <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Argentina)	29	13	14	14	14	14	15	14	15	0	0											
13- <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil)	31	15	16	16	16	16	17	16	17	0	0	0										
14- <i>Magnivitellinum simplex</i>	30	14	14	14	15	14	16	15	16	1	1	1	2									
15- <i>Magnivitellinum simplex</i>	29	14	14	14	15	14	15	15	15	1	1	1	2	0								
16- <i>Magnivitellinum simplex</i>	29	14	14	14	15	14	15	15	15	2	2	2	2	0	0							
17- <i>Magnivitellinum simplex</i>	29	14	14	14	15	14	15	15	15	1	1	1	2	0	0	0						
18- <i>Paralepoderma cloacicola</i>	26	10	10	10	10	10	11	10	10	10	10	10	11	11	10	11	10					
19- <i>Leptophallus nigrovenosus</i>	27	11	10	10	11	11	11	11	11	10	10	10	11	11	11	11	11	1				
20- <i>Metaleptophallus gracillimus</i>	26	10	10	10	10	11	11	11	11	9	9	9	11	10	10	10	10	1	1			
21- <i>Alloglossidium geminum</i>	29	12	11	11	12	12	12	12	12	9	9	9	10	10	10	10	10	9	10	10		
22- <i>Alloglossidium kenti</i>	30	12	11	11	12	12	13	12	12	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	3	
23- <i>Alloglossidium corti</i>	29	12	11	11	11	12	12	12	12	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	9	3	0

Table V. Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the ITS between specimens from the Plagiorchioidea group and the external group *Creptotrematina batalhensis* (MT512641).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1- <i>Creptotrematina batalhensis</i>												
2- <i>Macroderoides trilobatus</i>	36											
3- <i>Macroderoides flavus</i>	36	3										
4- <i>Macroderoides typicus</i>	35	2	1									
5- <i>Paramacroderoides kinsellai</i>	36	5	6	5								
6- <i>Macroderoides texanus</i>	35	3	4	3	3							
7- <i>Macroderoides minutus</i>	34	3	4	3	4	1						
8- <i>Macroderoides spiniferus</i>	35	3	4	3	3	0	1					
9-<i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil)	38	17	18	18	17	16	16	16				
10-<i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil)	38	17	18	18	17	16	16	16	0			
11- <i>Alloglossidium geminum</i>	39	19	20	19	19	18	18	18	11	11		
12- <i>Alloglossidium kenti</i>	39	18	21	20	19	18	18	17	11	11	2	
13- <i>Alloglossidium corti</i>	39	19	21	20	19	18	18	18	12	12	2	1

7.5 DISCUSSION

For years, the genera *Magnivitellinum* and *Alloglossidium* did not have a well-clarified phylogenetic systematics and were inserted within the families Allocreadiidae and Macroderoidiidae (Pérez-Ponce de León et al. 2007). Then, Hernández-Mena et al., 2016, through molecular techniques, proposed the inclusion of these two genres in the family Alloglossidiidae. With the molecular analyses of gene 28S and ITS in the present work, we evidence the allocation of the genus *Magnivitellinum* as a sister taxon of *Alloglossidium*, corroborating its systematic position within the family Alloglossidiidae.

The first species of the genus was *M. simplex*, found in *A. bimaculatus* in the Mogi-Guaçu River, state of São Paulo, Brazil, and was later recorded in various localities and hosts in several countries in the Americas (Lunaschi, 1989; Aguirre- Macedo et al. 2001; Kohn et al. 2007; Pérez-Ponce de León et al. 2015). The relationship between this parasite and characid fishes is highlighted as the majority of this species was found in fishes of the *Astyanax* genus (Scholz et al. 1995; Kohn et al. 2007; Pérez-Ponce de León and Choudhury A. 2010), despite having few records in fishes of the orders Siluriform and Cyprinodontiforms (Scholz et al. 1997; Salgado-Maldonado et al. 2004).

The species *M. corvitellinum* was described only with morphological data and was found for the first time in *H. littorale*, in the Paraná River, in the state of Paraná, (Lacerda et al. 2009). Until then, this species had been registered only in Brazil, in the same host, but in different Rivers: the Peixe River from São Paulo (Dias et. al. 2017) and the Guandu River from Rio de Janeiro (Azevedo et al. 2010 and Azevedo et al. 2011). However, Ostrowski de Núñez et al. 2017, also registered this digenetic in the same host, but in Argentina.

In 2021, Davies et al., in addition to describing the third species of the genus through integrative taxonomy, also reported the life cycle of *M. saltaensis*, with the snail *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) being the natural intermediate host and *P. endy* the definitive host, work reported in the city of Salta, Argentina. The phylogenetic analyses of the present study showed 100% similarity with *M. saltaensis* described in Argentina.

For the 28S gene, we did not observe genetic divergence between the specimens in this work with *M. saltaensis* described in Argentina, whereas for *M. simplex* from Mexico, the distance found was 1 to 2%. In comparison with species of *Alloglossium*, the divergence was 9 to 10%. For the ITS, due to the lack of sequences deposited in the GenBank of other members of the Alloglosiidae family, the phylogeny compared *M. saltanesis* specimens with some species of *Alloglossium*, whose genetic distance was 11 to 12%. For ITS, the genetic divergence between the reference and the *Alloglossidium* was higher than the one observed from 28S gene. This occurs once the internal spacers (ITS 1 and 2) have highly variable regions, making them effective markers for species delimitation, even for the recognition of morphologically identical species in helminths (van Herwerden et al. 1998; Blair 2006).

Our analysis, demonstrated a new location record, in the Jacaré-Pepira River, from state of São Paulo, Brazil as well as a new host record, *A. lacustris* of *M. saltaensis*. Also, we provided new sequences of ITS, deposited in the GenBank database, in which are still restricted to some genera.

7.6 REFERENCES

- AGUIRRE-MACEDO ML, SCHOLZ T, GONZÁLEZ-SOLÍS D. 2001. Larval helminths parasitizing freshwater fish from the Atlantic coast of Nicaragua. *Comp Parasitol* 68: 42–51.
- ALVES DIAS KG, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, DE ALMEIDA CAMARGO A, MÜLLER MI, DA SILVA RJ, KOZLOWISKI DE AZEVEDO R, ABDALLAH VD. 2020. A new species of *Creptotrematina* (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data. *J Helminthol* 163: 1–9.
- ASTRIN JJ, ZHOU X AND MISOF B. 2013. The importance of biobanking in molecular taxonomy, with proposed definitions for vouchers in a molecular context. *ZooKeys* 365:67–70.
- AZEVEDO RK, ABDALLAH VD AND LUQUE JL. 2010. Acanthocephala, Annelida, Arthropoda, Myxozoa, Nematoda and Platyhelminthes parasites of fishes from the Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 6: 659–667.
- AZEVEDO RK, ABDALLAH VD AND LUQUE JL. 2011. Biodiversity of fish parasites from Guandu River, Southeastern Brazil: an ecological approach. *Neotrop. Helminthol* 5: 185-199.
- BLAIR D. 2006. Ribosomal DNA variation in parasitic flatworms. In: Maule, A. G., & Marks, N. J. (Eds) *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. King's Lynn: Biddles Ltd., 96–123.
- BRAY RA, GIBSON DI AND JONES A. 2008. Keys to the Trematoda. International and Natural History Museum, London, 3: 373.

- BOWLES J, BLAIR D AND MCMANUS DP. 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 103–109.
- CURRAN SS, TKACH VV AND OVERSTREET RM. 2011. Phylogenetic affinities of *Auriculostoma* (Digenea: Allocreadiidae), with descriptions of two new species from peru. *J Parasitol* 97: 661–670.
- DAVIES D, LIQUIN F, LAUTHIER JJ, PÁRRAGAL R, SARAVIAL J, DAVIES C. ABD OSTROWSKI DE NÚÑEZ M. 2021. The life cycle of *Magnivitellinum saltaensis* n. sp. (Digenea: Alloglossidiidae) in Salta Province, Argentina. *Parasitol Res*, 120, 1233–1245.
- DIAS KGA, ALVES CA, SILVA RJ, ABDALLAH VD, AZEVEDO RK. 2017 Parasitic communities of *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) as indicators of environmental impact. *An Acad Bras Cienc* 89: 2317–2325.
- DIAS KGA, MÜLLER MI, ALMEIDA AC, SILVA RJ, AZEVEDO RK, PÉREZ-PONCE DE LEON G AND ABDALLAH VD. 2018. A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. *Parasitol Res* 117: 2847–2854.
- EDGAR RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
- FONT WF AND LOTZ JM. 2008. Family Macroderoididae McMullen, 1937. In: Bray, R. A., Gibson, D. I. & Jones, A. (Eds). *Keys to the Trematoda*, volume 3. Wallingford: CABI Publishing and the Natural History Museum, 373–380.
- HERNANDEZ-MENA DI, MENDOZA-GARFIAS B, ORNELAS-GARCIA CP AND PÉREZ-PONCE DE LÉON G. 2016. Phylogenetic position of *Magnivitellinum*

- Kloss, 1966 and *Perezitrema* Barus & Moravec, 1967 (Trematoda: Plagiorchioidea: Macroderoididae) inferred from partial 28S rDNA sequences, with the establishment of Alloglossidiidae n. fam. Sys Parasitol 93: 525–538.
- KEARSE M ET AL., 2012 Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinform, 28:1647–1649.
- KIMURA M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111–120
- KOHN A, FERNANDES BMM AND COHEN SC. 2007 South American trematodes parasites os fishes. 318. Rio de Janeiro: Imprinta Express.
- LACERDA ACF, TAKEMOTO RM AND PAVANELLI GC. 2009. A new trematode species parasitizing the catfish *Hoplosternum littorale* (Osteichthyes, Callichthyidae) from Paraná River, Brazil, with an emendation of the diagnosis of *Magnivitellinum* (Trematoda, Macroderoididae). Acta Parasitol, 54: 37–40.
- LUNASCHI LI. 1989. Helminths parasitos de água dulce de la Argentina. X. Tres nuevas especies del género *Thometrema* Amato, 1968 (Trematoda Derogenidae). Neotropica, 34: 23–32.
- MILLER MA, PFEIFFER W AND SCHWARTZ T. 2010 Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. <https://doi:10.1109/GCE.2010.5676129>.
- OLSON PD, CRIBB TH, TKACH VV, BRAY RA AND LITTLEWOOD DT. 2003 Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int J Parasitol 33:733–755.

- OSTROWSKI DE NÚÑEZ M, ARREDONDO N AND GIL DE PERTIERRA AA. 2017. Adult trematodes (Platyhelminthes) of freshwater fishes from Argentina: a checklist. *Rev Sui Zool* 124: 91–113.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, CHOUDHURY A, ROSAS-VALDEZ R AND MEJÍA-MADRID H. 2007. The systematic position of *Wallinia* spp. and *Margotrema* spp. (Digenea), parasites of Middle-American and neotropical freshwater fishes, based on the 28S ribosomal RNA gene. *Syst Parasitol* 68: 49–55.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN G AND CHOUDHURY A. 2010. Parasite inventories and DNA-based taxonomy: lessons from helminths of freshwater fishes in a megadiverse country. *J Parasitol* 96: 236–244.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, RAZO-MENDIVIL U, MENDOZA-GARFIAS B, RUBIO-GODOY M. AND CHOUDHURY A. 2015. A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) in *Astyanax mexicanus* (Characidae) from Mexico revealed by morphology and sequences of the 28S ribosomal RNA gene. *Folia Parasit* 62: 1–6.
- RAMBAUT A. 2009. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: fig-tree. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/Figtree>.
- RAZO-MENDIVIL U, VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ E, ROSAS-VALDEZ R, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G AND NADLER SA. 2010. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial DNA reveals a complex of cryptic species in *Crassicutis cichlasomae* (Digenea: Apocreadiidae), a parasite of Middle-American cichlids, *Int J Parasitol* 70: 471–486.
- SALGADO-MALDONADO G, MERCADO-SILVA N, CABAÑAS-CARRANZA G, CASPETA-MANDUJANO JM, AGUILAR-AGUILAR R, ÍNIGUEZ-DÁVALOS LI. 2004. Helminth Parasites of Freshwater Fishes of the Ayuquila

- River, Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, West Central Mexico. *Comp Parasitol* 71: 67–72.
- SCHOLZ T, VARGAS-VASQUEZ J, MORAVEC F, VIVAS-RODRIGUEZ C, MENDOZA-FRANCO E. 1995. Metacercariae of trematodes of fish from cenotes (=sinkholes) of the Yucatan Península, México. *Fol Parasitol* 42: 173–192.
- SCHOLZ T, VARGAS-VÁZQUEZ J, VIDAL-MARTÍNEZ VM AND AGUIRRE-MACEDO L. 1997. *Ascocotyle nunezae* n. sp. (Digenea: Heterophyidae), from Yucatan, Mexico. *J Parasitol* 83: 141–147.
- STAMATAKIS A. 2014. RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies, *Bioinfo* 30.
- THATCHER, VE., 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana* 11: 263–572.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 12: 2725–2729.
- TKACH V, GRABDA-KAZUBSKA B, PAWLOWSKI J AND SWIDERSKI Z. 1999. Molecular and morphological evidences for close phylogenetic affinities of the genera *Macrodera*, *Leptophallus*, *Metaleptophallus* and *Paralepoderma* (Digenea, Plagiorchioidea). *Acta Parasitol.*
- TKACH V, PAWLOWSKI J AND MARIAUX J. 2000. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial *lsrDNA* sequences. *J Parasitol Res* 30:83–93.
- TKACH VV, STRAND EJ AND FROESE L. 2008. *Macroderoides texanus* n. sp. (Digenea: Macroderoididae) from alligator gar, *Atractosteus spatula* in Texas. *Parasitol Res* 104: 27–33.

- TKACH VV, PULIS EE AND OVERSTREET RM. 2010. A new Paramacroderoides species (Digenea: Macroderoididae) from two species of gar in the southeastern United States. J Parasitol 96: 1002–1006.
- TKACH VV AND KINSELLA JM. 2011. New Macroderoides (Digenea: Macroderoididae) from Florida gar, with molecular phylogeny of the genus. J Parasitol 97: 920–923.
- VAN HERWERDEN L, BLAIR D AND AGATSUMA T. 1998. Intra- and inter-individual variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *S. japonicum* species complex. Parasitol 116: 311–7.
- XIA X. 2013. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. Mol Biol Evol 30: 1720–1728.

7.7 Supplementary Material

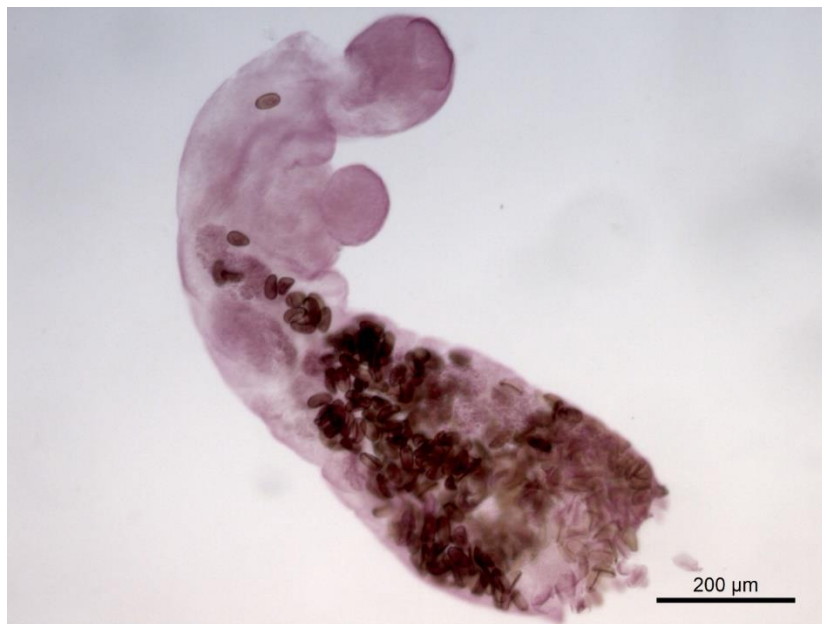


Figure 3. Molecular voucher of *Magnivitellinum saltaensis* Davies, Liquin, Lauthier, Párraga, Saravia, Davies and Ostrowski de Núñez, 2021 from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 collected in the Jacaré-Pepira River, Ibitinga, São Paulo, Brazil.

8. Anexo I



A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences

Karina G. A. Dias¹ · Maria I. Müller¹ · Aline C. de Almeida¹ · Reinaldo J. da Silva¹ · Rodney K. de Azevedo² · Gerardo Pérez-Ponce de León³ · Vanessa D. Abdallah² 

Received: 13 September 2017 / Accepted: 15 June 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Wallinia brasiliensis n. sp. is described from the intestine of two species of tetras—*Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016—collected from the Batalha River in São Paulo State, Brazil. The new species can be clearly distinguished from the other three congeneric species by its vitelline follicles extending from the genital pore to the end of the caeca, eggs lacking operculum, a larger egg size with a consequently lower number relative to the other three species, and the ovary located opposite the anterior testis. The validity of the new species was confirmed through a phylogenetic analysis of the 28S rRNA gene which showed that the new species is the sister taxon to *Wallinia mexicana* Pérez-Ponce de León, Razo-Mendivil, Mendoza-Garfía, Rubio-Godoy and Choudhury, 2015, a species infecting *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853) in Mexico.

Keywords *Astyanax fasciatus* · *Astyanax lacustris* · *Wallinia* · South America · 28S rDNA

Introduction

The order Characiformes includes 210 genera and 1674 species, and its members inhabit exclusively freshwater habitats (Nelson 2006). The Characidae is the fourth most diversified family (Eschmeyer and Fricke 2009), and its distribution range extends from the Patagonia region of Argentina to the US-Mexico border (Mirande 2010). The two species of

characids studied herein have different distributional ranges; according to FishBase (<http://www.fishbase.org>), *Astyanax fasciatus* is distributed from Argentina to Mexico, though Ornelas-García et al. (2008) argues that the species is not found in Mexico; meanwhile, *A. lacustris* is exclusively distributed across South America, particularly in eastern Brazil. Both species are preferentially omnivorous (Bennemann et al. 2005). At the time of this study, the species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 was considered valid, but Lucena and Soares (2016) redescribed two nominal species in Brazil: *Astyanax lacustris* and *A. abramis* (Jenyns, 1842), through comparisons of orbit diameter, the number of anal fin rays and other meristic and morphometric results and recognized the species *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894); *A. asuncionensis* Géry, 1972; and *A. altiparanae* as new junior synonyms of *A. lacustris*. Therefore, in this study, specimens of *A. altiparanae* have been considered *A. lacustris*.

The trematode fauna of the two characid species in Brazil includes species from five genera *Zonocotyloides* Padilha, 1978; *Genarchella* Travassos, Artigas & Pereira, 1928; *Proserhynchus* Odhner, 1905; *Prosthenhystera* Travassos, 1922; and *Halipegus* Looss, 1899 and also

Section Editor: Simonetta Mattiucci

✉ Vanessa D. Abdallah
vanessaabdallahusc@gmail.com

¹ Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus Botucatu, Botucatu, São Paulo 13618-689, Brazil

² Laboratório de Ictoparasitologia, Pré-reitoria de pesquisa e pós-graduação, Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauri, São Paulo 17011-160, Brazil

³ Laboratorio de Helminthología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

8.1 Supplementary Material

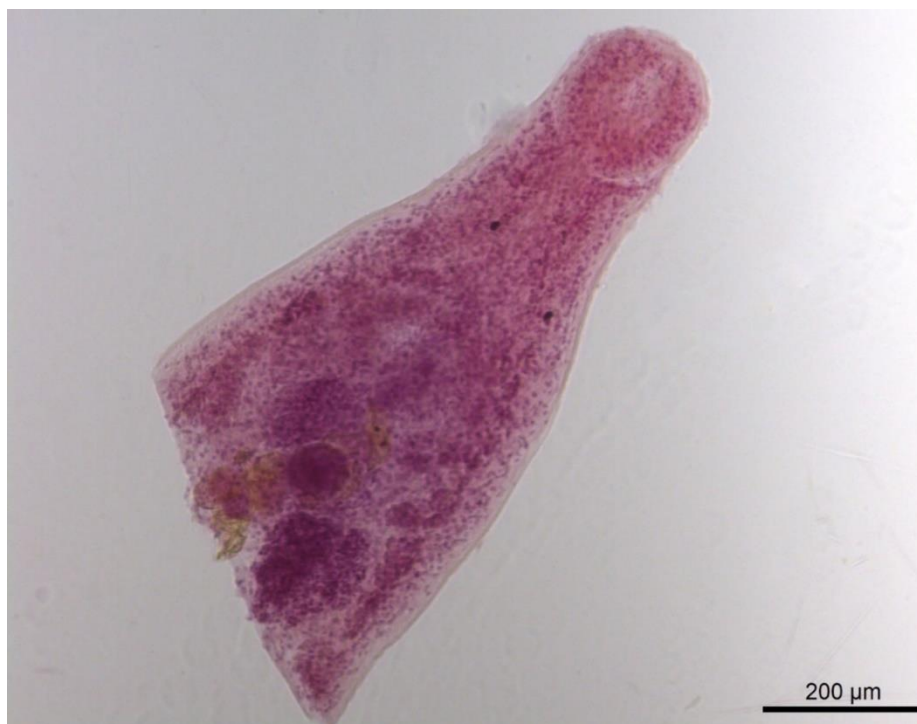


Figure 1. Molecular voucher of *Wallinia brasiliensis* n. sp. (number: INPA 784) from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil.



Figure 2. Ventral view of holotype (number: INPA 782) of *Wallinia brasiliensis* n. sp. collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil.

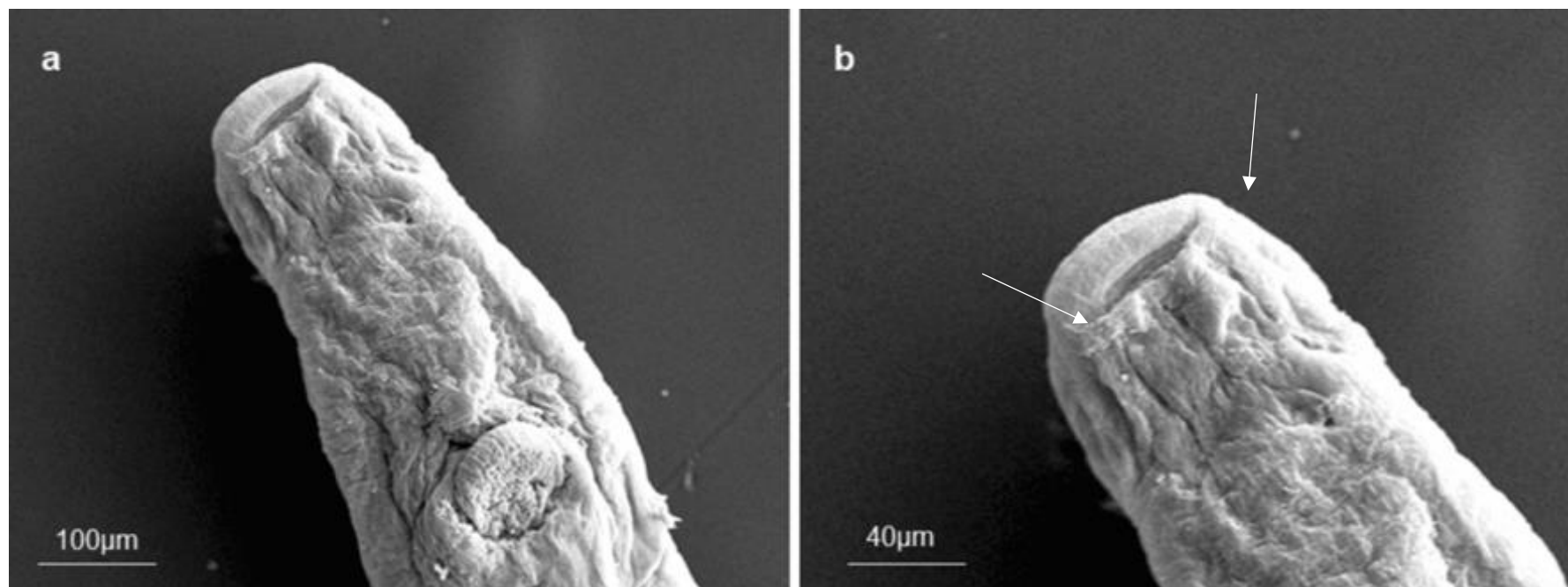


Figure 3. Scanning electron microscopy of *Wallinia brasiliensis*.n. sp. collected from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil **a.** Ventral view of the oral sucker and acetabulum. **b.** Detail pointed out by the arrows of the oral sucker without papillae.

9. Anexo II

Research Paper

Cite this article: Alves Dias KG, Pérez-Ponce de León G, de Almeida Camargo A, Müller MI, da Silva RJ, Kozłowski de Azevedo R, Abdallah VD (2020). A new species of *Creptotrematina* (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data. *Journal of Helminthology* 94, e163, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000474>

Received: 30 March 2020

Accepted: 19 May 2020

Key words:

ITS rDNA; 28S rDNA; South America; freshwater fishes; integrative taxonomy; digeneans

Author for correspondence:

K.G. Alves Dias, E-mail: karinanuros@gmail.com

A new species of *Creptotrematina* (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data

K.G. Alves Dias¹ , G. Pérez-Ponce de León^{2,3}, A. de Almeida Camargo¹, M.I. Müller⁴, R.J. da Silva¹, R. Kozłowski de Azevedo⁵ and V.D. Abdallah⁵

¹Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP) – Campus Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brazil; ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México; ³Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Mérida (ENES)-UNAM, Km 4.5 Carretera Mérida-Tetiz, Ucu, Yucatán, México; ⁴Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁵Docente do Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais, Centro Universitário CESMAC, Maceió, Alagoas, Brazil

Abstract

A new species of *Creptotrematina* Yamaguti, 1954 was collected from characid fishes, *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *Astyanax lacustris* Lucerna & Soares, 2016 from the Batalha River in the State of São Paulo, Brazil. The new species most closely resembles *Creptotrematina aguierrepequeñoi*, but differs by the elongated shape of vitelline follicles, the extension of these follicles in the posterior end of body and the fact that they are not confluent. The morphological differences were confirmed through molecular data. Three specimens were sequenced, and molecular analyses were based on the internal transcribed spacers 2 and D1–D3 domains of the 28S ribosomal RNA gene. The obtained topologies showed the new species as a sister taxon of *C. aguierrepequeñoi*, a species originally described from *Astyanax mexicanus* in Mexico, and later found in *Astyanax aeneus* in Costa Rica. Isolates of the new species are reciprocally monophyletic, and genetic distance values are similar to those observed in other species pairs within Allocreadiidae. These findings corroborate that the genus *Creptotrematina* is mostly a parasite of characids, and widely extended across the Americas, with representative species occurring between Argentina and northern Mexico.

Introduction

Members of the Family Allocreadiidae include trematodes commonly found in the digestive tract of freshwater fishes (Caira & Bogea, 2005); however, two species – *Caudouterina rhyacotritoni* and *Bunoderella metteri* – are parasites of salamanders or frogs, respectively (Schell, 1964; Martin, 1966). Species composition, validity of genera and taxonomic arrangement in subfamilies has fluctuated over time and the taxonomic history of the Family has been controversial, and its placement within the Trematoda was unstable (Looss, 1902; Yamaguti, 1958, 1971) until recently (Choudhury *et al.*, 2007; Pérez-Ponce de León & Hernández-Mena, 2019). Currently, the family is composed of 14 valid genera and approximately 130 species (unpublished data). Due to the morphological similarity of the larval and adult stages of the allocreadiids, in addition to the morphological study, it was also necessary to assess the systematic, ecological and biological analysis for correct taxonomic determination (Caira & Bogea, 2005). However, in recent years, molecular phylogenetic studies have emerged as a fundamental approach to help the allocation of the species in their taxonomic groups (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2010; Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010).

Among teleosts, Characiformes possess a highly diverse parasite fauna with approximately 270 genera and 2258 species (Eschmeyer, 2020). These fish are mainly distributed in freshwater environments across the Neotropical region (Baumgartner *et al.*, 2012). *Astyanax* spp., described as the most diverse genus (Ornelas-García *et al.*, 2008), with approximately 261 described species (Eschmeyer, 2020), have feeding habits ranging from herbivores, insectivores (Uieda *et al.*, 1997) to omnivores (Silva *et al.*, 2012). Two species of the genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 were studied herein – *Astyanax lacustris* and *Astyanax fasciatus* – and, until this moment, only one species of the allocreadiid genus *Wallinia* Pearse, 1920 has been recorded parasitizing *A. lacustris* (Dias *et al.*, 2018). The genus *Creptotrematina* Yamaguti, 1954 was erected to include two species of allocreadiids originally described by Freitas (1941) as belonging to the genus *Creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 from Brazil and Argentina, as parasites of characid fish: *Creptotrematina dissimilis* (Freitas, 1941)

© The Author(s), 2020. Published by Cambridge University Press

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

9.1 Supplementary Material



Figure 1. Molecular voucher of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. (number: INPA 813) from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 collected in the Batalha River, State of São Paulo, Brazil.



Figure 2. Paratype Ventral view of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. collected from the intestine of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in the Batalha River, Piratininga, State of São Paulo, Brazil.



Figure 3. *Creptotrematina batalhensis* n. sp. from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares 2016 and *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo State, Brazil, Ventral view of the holotype specimen from *Astyanax fasciatus*.

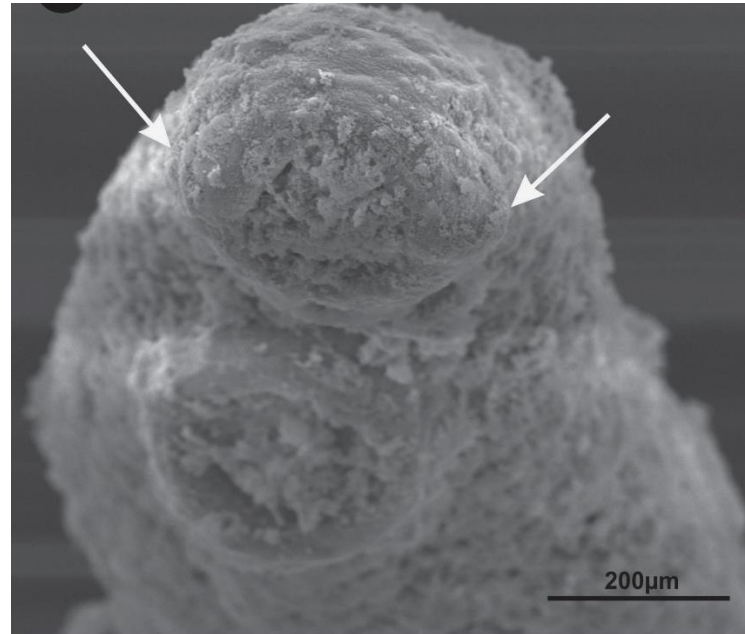


Figure 4. Oral sucker with a pair of ventrolateral muscle papillae from *Creptotrematina batalhensis* n. sp. Scanning electron microscopy: arrow indicating a pair of ventrolateral muscle papillae.

10. *Considerações*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos advindos desta tese nos permitiram descrever duas novas espécies de digenéticos, novos registros de hospedeiros para *Astyanax fasciatus* e *Astyanax lacustris* e novos registros de localidade provenientes de dois afluentes do rio Tiête: rio Batalha e rio Jacaré-Pepira.

Os espécimes de peixes coletados no rio Batalha, *A. fasciatus* e *A. lacustris* estavam parasitados em seus intestinos com *Wallinia brasiliensis* e *Creptotrematina batalhensis*. Estas foram novas espécies de digenéticos descritas através de taxonomia integrativa, sendo que ambas espécies foram a quarta descritas para o gênero e *W. brasiliensis* foi primeira espécie do gênero registrada no Brasil.

Em relação a *Magnivitellinum saltaensis*, utilizando o gene ribossomal 28S e o espaçador interno ITS, foi possível a identificação da espécie aqui estudada como sendo a mesma espécie descrita na Argentina. Também podemos evidenciar o primeiro registro desse digenético parasitando o intestino de *A. lacustris* e um novo registro de localidade: rio Jacaré-Pepira, no Município de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil.

Através das análises filogenéticas do gene 28S e o ITS, podemos corroborar as características mais conservadoras para o gene 28S e mais variáveis para o espaçador interno ITS, demonstrando serem bons marcadores genéticos para as famílias Allocreadiidae e Aloglossidiidae.

No rio Jacaré-Guaçu em todos os espécimes coletados de *A. fasciatus* e *A. lacustris* não foram encontrados parasitos trematódeos.

Com isso, este estudo contribuiu agregando novos conhecimentos para o banco de dados moleculares os quais carecem de informações nessa área, principalmente para

algumas famílias de trematódeos e para alguns marcadores genéticos. Além disso, contribuímos para ampliar o conhecimento da biodiversidade de espécies de digenéticos encontradas infectando peixes de importância comercial oriundos de ambiente natural.