

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA) -
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

ELEN JULIANA DE OLIVEIRA FURTADO

**Taxonomia, Morfologia e Filogenia molecular de ciliados
tricodinídeos (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) ectoparasitos
de copéodos e peixes encontrados em ecossistemas dulcícolas
neotropicais**

Juiz de Fora, 2019

ELEN JULIANA DE OLIVEIRA FURTADO

Taxonomia, Morfologia e Filogenia molecular de ciliados tricotrínicos (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) ectoparasitos de copépodos e peixes encontrados em ecossistemas dulcícolas neotropicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Co-orientador: Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra

Colaboradora: Profa. Dra. Marta D'Agosto

Juiz de Fora, 2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Furtado, Elen Juliana de Oliveira.

Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de ciliados tricodinídeos (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) ectoparasitos de copépodos e peixes encontrados em ecossistemas dulcícolas neotropicais

/ Elen Juliana de Oliveira Furtado. -- 2019.

49 f. : il.

Orientador: Roberto Júnio Pedroso Dias

Coorientadores: Marcus Vinícius Xavier Senra, Marta D'Agosto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2019.

1. zooplâncton. 2. aquicultura. 3. Protozoários parasitos. 4. morfologia de tricodinídeos. 5. biologia molecular. I. Dias, Roberto Júnio Pedroso, orient. II. Senra, Marcus Vinícius Xavier, coorient. III. D'Agosto, Marta , coorient. IV. Título.

Elen Juliana de Oliveira Furtado

**Taxonomia, Morfologia e Filogenia molecular de ciliados tricodinídeos
(Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) ectoparasitos de copépodos e peixes
encontrados em ecossistemas dulcícolas neotropicais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^o Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.^a Dra. Mariana Fonseca Rossi
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr.^a Michaela Ladeira de Melo
Universidade Federal de São Carlos

“Tudo posso naquele que me fortalece ” (Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele eu nada poderia fazer.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Neusa que sempre com doçura me ensinou os preceitos dessa vida, minha irmã Vitória por me ajudar a enxergar a leveza da vida e meu pai Edson. Vocês sempre me trazem alegria, obrigada por me incentivarem e acreditarem em mim.

Agradeço aos professores Roberto Dias, Marcus Senra e professora Marta D'agosto pela oportunidade de abrirem as portas do laboratório para mim desde cedo, além da orientação, amizade, dedicação e por serem exemplos de profissionais.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo companheirismo, pelos ensinamentos e auxílios.

Agradeço a colega de trabalho e amiga Ive Muzitano pelo material concedido para a realização de parte dessa dissertação, pelos incríveis momentos de muito aprendizado nas coletas e pelo suporte nas análises ecológicas.

Agradeço ao professor Nathan Barros pelos momentos em que precisei de auxílio nas análises ecológicas e por todo suporte que me deu durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço a todos os profissionais do Museu Mariano Procópio (Juiz de Fora) por sempre me receberem neste espaço e em especial ao diretor Dirceu False que sempre deixou as portas do museu abertas para mim.

Agradeço aos profissionais da Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Rene Rachou, em especial a professora Marta Caldeira por ter sido tão atenciosa comigo quando precisei visitar a coleção do museu de malacologia médica.

Agradeço em especial aos meus amigos mais chegados Franciane Cedrola (minha mãe científica), Jéssica Andrade (amiga de fé e para todas as horas) e Marcus Senra (exemplo de mansidão), pelos vários momentos de desconstração e muitos ensinamentos nesses momentos, por serem os “bocós” da minha vida.

Agradeço com muito carinho ao meu companheiro de todas as horas Lucas Lima que sempre me ajudou e incentivou nessa jornada. Obrigada pelas milhares ajudas, pela paciência e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Comportamento e Biologia Animal por todos os ensinamentos e por tudo que aprendi durante esses dois anos.

Agradeço a Marlú e a Dayane, secretárias do PPG, por tudo o que fizeram por mim. Parabéns pela dedicação e profissionalismo.

FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Espécies de ciliados tricodinídeos (Ciliophora, Peritrichia) ectoparasitos de tilápias em dois tanques de pisciculturas no estado do Rio de Janeiro, evidenciando disco adesivo após impregnação com nitrato de prata 24

Capítulo 2

Figura 1. Fotomicrografias *in vivo* dos ciliados da espécie *Trichodina diaptomi*..... 48

Figura 2. Fotomicrografia dos ciliados da espécie *Trichodina diaptomi* impregnados pelo nitrato de prata 49

Figura 3. Árvore filogenética da ordem Mobilida inferida pelo gene 18SrRNA recuperadas pelas análise de Máxima Verossimilhança 50

TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Espécies de ciliados tricodinídeos ectoparasitos de tilápias encontradas em duas pisciculturas (A e B) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, evidenciando sítio de infestação e prevalência durante as estações seca e chuvosa 25

Tabela 2. Dados físico-químicos do afluente e efluente das duas pisciculturas. Piscicultura A localizada no município de Rio das Flores e piscicultura B localizada no município de Valença 25

Tabela S1. Registros recentes de tricodinídeos infestando pele e brânquias de *Oreochromis niloticus* em diferentes regiões no Brasil..... 32

Capítulo 2

Tabela 1. Dados morfométricos (em μm) de populações de *Trichodina diaptomi* em diferentes localidades 51

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA	12
INTRODUÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1. Alta riqueza atípica de espécies de tricodinídeos (Ciliophora, Mobilida) de <i>Oreochromis niloticus</i> cultivados no Brasil: novo registro e notas ecológicas.....	19
CAPÍTULO 2. Morfologia e filogenia molecular de <i>Trichodina diaptomi</i> (Ciliophora, Mobilida) em copépodos calanóides no Brasil, com novos insights sobre evolução e especificidade	33

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como objetivo principal ampliar conhecimento sobre morfologia, taxonomia, sistemática e evolução de ciliados ectocomesais da família Trichodinidae (Peritrichia, Mobilida) coletados na região do sudeste brasileiro, incorporando informações sobre registros destes ciliados em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a caracterização morfológica e molecular de uma espécie de tricodinídeo associada a copépodos da ordem Calanoida. Este documento possui uma introdução ao tema proposto e dois capítulos que serão enviados para publicação nos seguintes periódicos, Diseases of Aquatic Organisms e The Journal of Eukaryotic Microbiology, respectivamente.

No capítulo 1 foram indentificados, com base em dados morfológicos, oito espécies de ciliados de tricodinídeos ectoparasitos de *Oreochromis niloticus* em duas pisciculturas continentais no sudeste do Brasil, sendo relatado o primeiro registro do gênero *Trichodinella* em tilápias no Brasil e, ainda, o estudo com maior riqueza de espécies de tricodinídeos em tilápias já registrado no Brasil.

No capítulo 2 foi realizada a caracterização morfológica e molecular de uma população de *Trichodina diaptomi* encontrada infestando copépodes calanóides em um lago artificial urbano de Juiz de Fora, Minas Gerais. Estudos anteriores relatavam que *T. diaptomi* é um tricodinídeo ectocomensal de copépodos planctônicos da ordem Calanoida, entretanto, nossos dados sugerem que essa espécie também parasita peixes e, desta forma, apresenta baixa especificidade e um possível polimorfismo corporal conforme muda de hospedeiros.

RESUMO

A família Trichodinidae (Peritrichia: Mobilida) é composta por ciliados aquáticos ectoparasitos de peixes, anfíbios, crustáceos, moluscos e cnidários e são amplamente distribuídos pelo globo terrestre. Possuem cerca de 300 espécies descritas distribuídas em 11 gêneros. O gênero mais representativo é *Trichodina*, com 270 espécies descritas e são reconhecidos por causarem danos aos seus hospedeiros, como, crescimento retardado, hiperplasia lamelar e em muitos casos levá-los à morte. Os tricodinídeos aderem-se aos seus hospedeiros através da sucção de um complexo disco adesivo localizado na região aboral de seu corpo. Um componente importante desse complexo disco adesivo são os dentículos, que são estruturas proteínicas e que tem importante valor taxonômico para a família. Poucos são os trabalhos com esse grupo de ciliados, dessa forma, sua diversidade é desconhecida. O presente trabalho inclui no capítulo 1, registros de oito espécies de tricodinídeos em região não antes amostrada no sudeste do Brasil; além do relato de alta riqueza inédita em poucos peixes da espécie *Oreochromis niloticus*; um novo registro do gênero *Trichodinella* em águas brasileiras; segundo registro de *Trichodina migala* no país; além da ocorrência de tricodinídeos em peixes adultos, algo não recorrente. O capítulo 2 traz a primeira caracterização molecular da espécie *Trichodina diaptomi* encontrada em copépodos da ordem Calanoida. Adicionalmente, acreditamos que essa espécie ocorra em peixes e discutimos a influência do tipo de hospedeiro sobre a morfologia dos tricodinídeos, com isso, sugerimos um possível polimorfismo corporal na mudança de hospedeiro.

Palavras-chave: Mobilida, tricodinídeos, peixes, copépodos, 18SrRNA, morfologia.

ABSTRACT

The trichodinids ciliates (Mobilida: Trichodinidae) have about 300 species. They are aquatic, ectocomensal organisms that may eventually parasitize fish, molluscs, amphibians, crustaceans and cnidarians. Trichodinids attach to their hosts by a complex adhesive disk located in the aboral region of their body. An important component of this adhesive disk complex are the denticles, which are proteinaceous structures and have important taxonomic value for the family. The most representative genus of this family is *Trichodina*, with about 270 described species and it has the most derived denticle, composed by blade, central part and radius. The major number of trichodinids studies were performed in fishes, due to the due to their economic value, once trichodinids parasites damage their hosts causing weakness, growth reducing, lamellar hyperplasia, erratic swimming and in many cases may lead to death. Few are the works with other groups of hosts and the diversity of these ciliates remains unknown. Recently work with molecular characterization of these microeucariotos has grown, increasing a little our knowledge about the phylogenetic relationships between its species. The present work includes, in section I, trichodinid records from a poor sampled area in southeastern Brazil, in addition a high unprecedented richness of those parasites in few *Oreochromis niloticus* specimens, a new record of the genus *Trichodinella* to Brazilian waters, besides the occurrence of trichodinids in adult fish, wich is not recurrent. Session II brings the first molecular characterization of the species *Trichodina diaptomi*, and a discussion on the influence of host type on morphology of trichodinid.

Key-words: Mobilida, trichodinids, fishes, copepods, 18SrRNA, morphology.

RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Os protozoários são micro-organismos (invisíveis a olho nu) unicelulares, com tamanhos e formas variados, e podem tanto ser autotróficos (produzem seu próprio alimento) ou heterótrofos (não produzem seu próprio alimento). Esses organismos podem ser encontrados em ambientes de água doce, marinho, terrestre, bem como em associações ecológicas diversas com outros organismos, tais como plantas, invertebrados e vertebrados. Dentre os protozoários, destacam-se os protozoários ciliados dentro dos quais uma parcela significativa vive em simbiose com hospedeiros diversos.

Os ciliados tricodinídeos (uma família de Trichodinidae) são micro-organismos ectoparasitos e ectocomensais de diversos grupos de invertebrados (moluscos e crustáceos) e vertebrados (peixes e anuros), em formato de disco, podendo causar danos severos aos seus hospedeiros, abrindo porta para entrada de infecções bacterianas secundárias. Esses ciliados possuem, na parte ventral do corpo, estruturas denominadas dentículos que servem para se fixarem aos seus hospedeiros, e na parte dorsal do corpo encontra-se a boca, usada na alimentação (bactérias).

São conhecidas mais de 300 espécies desses micro-organismos associadas a hospedeiros diversos ao redor do mundo, sendo escasso número de espécies registradas em nosso país. Como possuem ainda grande número potencial de espécies novas a serem descobertas destes organismos e devido à sua importância como parasitos e causadores de danos em grupos de animais cultiváveis, como peixes e girinos, destacamos a relevância da formação de especialistas dedicados ao estudo desses micro-organismos.

Este estudo teve como objetivo ampliar conhecimento sobre morfologia, sistemática e evolução de ciliados ectocomensais da família Trichodinidae (Peritrichia, Mobilida) coletados na região do sudeste brasileiro, incorporando informações sobre registros destes ciliados em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletas em dois tanques de pisciculturas no Estado do Rio de Janeiro, e a caracterização morfológica e genética de uma espécie de tricodinídeo vivendo sobre copépodos (crustáceos microscópicos) em um lago urbano poluído na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Palavras-chaves: protozoários, ciliados, parastologia, doenças, peixes, crustáceos.

INTRODUÇÃO

Os protozoários ciliados (Alveolata, Ciliophora) são organismos eucariontes unicelulares com cerca de 8.000 espécies descritas distribuídas em 14 classes (GAO *et al.*, 2016). Dentro da classe Oligohymenophorea, os ciliados da subclasse Peritrichia Stein, 1859, com mais de 1000 espécies válidas, se agrupam em duas ordens, Sessilida Kahl, 1933 e Mobilida Kahl, 1933, cuja sinapomorfia principal é a organização da infraciliatura oral. Os ciliados da ordem Mobilida Kahl, 1933 constituem um grupo de organismos com formato cônico, corpo em forma de cilindro e com complexos dentículos no disco adesivo, localizado na região aboral do corpo e ciliatura somática composta por uma banda telotrocal permanente na região adoral do corpo (BASSON & VAN AS, 2006). Os mobilídeos são comensais ou parasitos de uma ampla gama de hospedeiros invertebrados e vertebrados em ambientes aquáticos e terrestres. Esta ordem possui cinco famílias, 17 gêneros e mais de 300 espécies (ZHAN *et al.*, 2009).

A família Trichodinidae (Mobilida) compreende um grupo de organismos composto por dez gêneros e 270 espécies descritas (VALLADÃO *et al.*, 2016), tendo sido registrada em diversos hospedeiros invertebrados e vertebrados em distintas localidades zoogeográficas (LOM & DYKOVA, 1992).

Dados sobre tricodinídeos no Brasil são relativamente escassos e a maioria destes registros identificam estes ciliados como *Trichodina* sp. (MACIEL *et al.*, 2017). Nos últimos anos, os estudos com tricodinídeos estão voltados para a taxonomia e redescritção de espécies usando técnicas modernas de impregnação pela prata que revelam as principais estruturas utilizadas para a taxonomia do grupo, as estruturas que compõe o disco adesivo (LOM, 1958; VAN AS & BASSON, 1989; ÖZER, 2003; MITRA & HALDAR 2004). Entre os poucos estudos no Brasil que utilizaram técnicas de impregnação pela prata, que propiciam a correta identificação destes protistas, destacam-se àqueles realizados por KATTAR (1975), GHIRALDELI & MARTINS (2006), PINTO *et al.* (2006), MARTINS & GHIRALDELLI (2008), MARTINS *et al.* (2010), VALLADÃO *et al.*, (2016).

Estudos recentes tem revelado que o uso de apenas caracteres morfológicos, tais como grânulos centrais no disco adesivo, forma e morfometria dos dentículos, são insuficientes para a reconstrução da história evolutiva dos tricodinídeos (TANG *et al.*, 2013). Dados moleculares são cada vez mais explorados para melhor elucidar as relações filogenéticas em Ciliophora, sendo raros, portanto, estudos sobre filogenia interna da ordem Mobilida (ZHAN *et al.*, 2009, TANG *et al.*, 2013), havendo sequencias de 18SrRNA de cerca de 45 espécies

nominais de tricodinídeos, dentre as quase 300 espécies válidas para o grupo (TANG *et al.*, 2013).

O crescente interesse nestes ciliados no país advém dos danos que podem causar à piscicultura, com estudos abordando prevenção e controle destes parasitos (VARGAS *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2002). A tricodiníase é uma doença que acomete principalmente culturas de criação de animais aquáticos, mais comumente em pisciculturas, porém algumas espécies estabelecem relações ecológicas com moluscos, estágios larvais de anfíbios e crustáceos (ISHIKAWA *et al.*, 2012). Essa doença se desenvolve quando há um crescimento populacional exacerbado de tricodinídeos que são fortemente dependentes e influenciados pela qualidade da água (ÖZER & YILMAZ KIRCA, 2013). Os tricodinídeos podem causar diminuição do crescimento, e alterações na visão e comportamento natatório dos hospedeiros, havendo registros de mortalidade crônica e aguda em criações de peixes (EKANEM & OBLEKEZIE, 1996; VALLADÃO *et al.*, 2013; VALLADÃO *et al.*, 2014). Esses ciliados podem deixar seus hospedeiros suscetíveis a outras doenças infecciosas (EVANS *et al.*, 2007), causando assim consideráveis perdas econômicas em criações de animais aquáticos (MARTINS *et al.*, 2010).

Ciliados ectoparasitos tricodinídeos também são importantes como bioindicadores da qualidade da água. Segundo KHAN (2004), a abundância média de *Trichodina* sp. infectando brânquias de peixes foi significativamente maior em ponto amostral contaminado quando comparado com outros três pontos amostrais de referência, ou seja, não contaminados. As lesões causadas por esses ectoparasitos levam também à uma direta exposição dos hospedeiro aos contaminantes aquáticos (HINTON *et al.*, 1992, SCHWAIGER *et al.*, 1997), o que ressaltam necessidade de um abordagem mais abrangente nos estudos sobre diversidade de ciliados tricodinídeos.

Outro grupo pouco explorado são os tricodinídeos que ocorrem em invertebrados, tais como moluscos, equinodermos, cnidários, crustáceos e tunicados, e ainda em anuros (BASSON & VAN AS, 2006; MACIEL *et al.*, 2017). Poucos são os estudos que relataram a ocorrência desses tricodinídeos nesses hospedeiros (BASSON & VAN AS, 1992; XU *et al.*, 2000; BASSON & VAN AS, 2006; DIAS *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2009, SILVA- BRIANO *et al.*, 2011; WEST *et al.*, 2016; PALA *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS

- BASSON, L; & VAN AS, J.G. A redescription on *Trichodina oxystelis* Sandon, 1965 (Ciliophora: Peritrichida), a parasite of the marine prosobranch Oxysteles from southern Africa. **Systematic Parasitology**, v.22, p. 231-237, 1992.
- BASSON L; & VAN AS J. Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora) in P T K Woo (ed.): **Fish diseases and disorders**, v. 1, cap. 2, p. 154-180, 2006.
- DA SILVA, W.M; ROCHE, K.F; VICENTE, F.S; DELBEN, A.A.S.T. First Record of the Peritrich *Trichodina diaptomi* Basson and Van As, 1991 (Protozoa: Ciliophora) on a South American Calanoid *Notodiaptomus deitersi* (Poppe, 1890) (Crustacea: Copepoda). **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.56, p.385, 2009.
- DIAS, R. J. P; FERNANDES, N. M; SARTINI, B; DA SILVA-NETO, I. D; D'AGOSTO, M. Occurrence of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) infesting tadpoles of *Rhinella pombali* (Anura: Bufonidae) in the Neotropical area. **Parasitology International**, v. 58(4), p. 471- 474. 2009.
- EKANEM, D. A; & OBLEKEZIE, A. I. Growth reduction in African catfish fry infected with *Trichodina maritinkae* Basson & Van as, 1991 (Ciliophora: Peritrichida). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 11, p. 91-96. 1996.
- EVANS, J. J; KLESIOUS, P. H; SHOEMAKER, C. A. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. **Aquaculture Health International**, v.7, p.10-14. 2007.
- GAO, F; WARREN, A; ZHANG, Q; GONG, J; MIAO, M; SUN, P; XU, D; HUANG, J; YI, Z; SONG, W. The All-Data-Based Evolutionary Hypothesis of Ciliated Protists with a Revised Classification of the Phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). **Nature/Scientific Reports**, v. 29(6), p.1-14. 2016.
- GHIRALDELLI, L; MARTINS, M.L; ADAMANTE, W.B; YAMASHITA, M.M. First record of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from cultured Nile tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Zoological Research**, v. 2(4), p. 369-375, 2006.
- HINTON, D.E; BAUMANN P.C; GARDNER G.R; HAWKINS W.E; HENDRICKS J.D; MURCHELANO R.A; OKIHIRO M.S. Histopathologic biomarkers. In: R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle, Jr. & H.L. Bergman (eds), *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. **SETAC Publication, Lewis Publishers**, p.155–209, 1992.
- ISHIKAWA, M. M; PÁDUA, S. B; VENTURA, A. S; JERÔNIMO, G. T; RUSSO, M. R;

- CARRIJO-MAUAD, J. R; MARTINS, M. L. Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros. **Embrapa Agropecuária Oeste**, p. 1-35, 2012.
- KATTAR, M.R. Sobre *Trichodina steini* Claparède and Lachmann (Protozoa, Urceolariidae) encontrada em girino de *Bufo Ictericus* do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 35(2), p. 253-258, 1975.
- KHAN, R. A. Parasites of fish as biomarkers of environmental degradation: a field study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.72 (2), p.394-400, 2004.
- KLEIN, B.M. The *seca* silver method and its proper use. **Journal of Protozoology**, v.5, p. 99–103, 1958.
- LOM, J. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics. **Journal of Protozoology** 5, 251–263. 1958.
- LOM, J. & DYKOVA, I. Protozoan Parasites of Fishes. **Development in Aquaculture and Fisheries Science** 26, 1992.
- MACIEL P.O; GARCIA F; CHAGAS E.C; FUJIMOTO R.Y; TAVARES-DIAS M. Trichodinidae in comercial fish in South America. **Ver Fish Biol Fisheries**, v. 28 (1), p. 33-56, 2017.
- MARTINS, L.M; ONAKA, E.M; MORAES, F.R; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 24(4), p. 981-986, 2002.
- MARTINS, M.L. & GHIRALDELLI, L. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68(1) p. 169-172, 2008.
- MARTINS, M; MARCHIORI, N; NUNES, G; RODRIGUES, M. First record of *Trichodina heterodontata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v. 70 (3), p. 637-644, 2010.
- MITRA, A. K. & HALDAR, D. P. First record of *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Šramek-Hušek, 1953, with description of *Trichodina notopteridae* sp. n. (Ciliophora: Peritrichida) from freshwater fishes of India. **Acta Protozoologica**, v.43, p. 269-274, 2004.
- ÖZER, A. The Occurrence of *Trichodina domerguei* Wallengren, 1897 and *Trichodina tenuidens* Fauré-Fremiet, 1944 (Peritrichia) on Three-spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., 1758 Found in a Brackish and Freshwater Environment. **Acta Protozoologica**, v.42, p.41-46, 2003.

- ÖZER, A. & YILMAZ KIRCA D. Parasite fauna of golden grey mullet *Liza aurata* (Risso, 1810) collected from Lower Kızılırmak Delta in Samsun, Turkey. **Helminthologia**, v.50, p. 269-280, 2013.
- PALA G; G.M.R. VALLADÃO; ALVES L.O, PILARSKI F, LUX HOPPE E.G. Tadpoles of *Rhinella schneideri* as reservoirs of trichodinids in continental aquaculture. **Aquaculture** v.488, p. 17-21, 2018.
- PINTO, H.A; WIELOCH, A.H; & MELO, A.L. Uma nova espécie de *Trichodina* Ehrenberg, 1838 (Ciliophora: Trichodinidae) em *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864) (Mollusca: Planorbidae). **Lundiana** v.7, p.121–124, 2006.
- SCHWAIGER, J; WANKE, R; ADAM, S; PAWERT, M; HONNEN, W; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)**, v. 6 (1), p. 75-86, 1997.
- SILVA-BRIANO, M; SUÁREZ-MORALES, E; ADABACHE ORTIZ, A; REYES-FLORES, M. Two species of *Mastigodiptomus* (Copepoda: Diaptomidae), hosts of the epibiotic ciliate *Trichodina diaptomi* (Peritricha) in North America. **Journal of Limnology**, v. 70, p. 329–333, 2011.
- TANG, F. H; ZHAO, Y. J; WARREN, A. Phylogenetic analyses of trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophora) inferred from 18S rRNA gene sequence data. **Current Microbiology**, v. 66(3), p. 306-313, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; PÁDUA, S.B; GALLANI, S.U; MENEZES-FILHO, R.N; DIAS-NETO, J; MARTINS, M.L; & PILARSKI, F. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 705–710, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; GALLANI, S.U; PÁDUA, S.B; MARTINS, M.L; & PILARSKI, F. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host parasite relationship study. **Parasitology**, v.141, p. 662–669, 2014.
- VALLADÃO, G.M.R; ALVES, L.O; PILARSKI, F. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. **Aquaculture**, v. 451, p.444–450, 2016.
- VAN AS, J.G; & BASSON, L. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids. **Systematic Parasitology**, v. 14, p. 157–179, 1989.
- VARGAS, L; POVH, J.A; RIBEIRO, R.P; MOREIRA, H.L.M. Prevalência de ectoparasitos

en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) de origen tailandesa de Maringá, Paraná.

Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 3(1), p. 32-37, 2000.

XU, K; SONG, W; WARREN, A. Observations on trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichia) from the gills of maricultured molluscs in China, with descriptions of three new species of *Trichodina* Ehrenberg, 1838. **Systematic Parasitology**, v. 45(1), p. 17-24, 2000.

WEST, D; BASSON, L; VAN AS, J. *Trichodina diaptomi* (Ciliophora: Peritrichia) from two calanoid copepods from Botswana and South Africa, with notes on its life history. **Acta Protozoologica**, v. 55, p. 161–171, 2016.

ZHAN, Z; XU, K; WARREN, A; GONG, Y. Reconsideration of phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences, with the establishment of a new subclass Mobilia Kahl, 1933. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56(6), p. 552-558, 2009.

CAPÍTULO 1

Alta riqueza atípica de espécies de ciliados tricodinídeos (Ciliophora, Mobilida) e primeiro registro de *Trichodinella* em *Oreochromis niloticus* cultivadas no Brasil

RESUMO

Tricodinídeos ciliados (Peritricha: Trichodinidae) são organismos ectocomensais ou parasitos de uma variedade de organismos, entre eles, destacam-se os peixes. Este trabalho teve como objetivo realizar inventário de ciliados tricodinídeos de *Oreochromis niloticus* em duas propriedades rurais no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, nas estações seca e chuvosa. Foram registradas oito espécies de tricodinídeos, distribuídas em quatro gêneros, parasitando *Oreochromis niloticus* (n = 22) em duas pisciculturas, pela primeira vez, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Este é o primeiro registro do gênero *Trichodinella* em tilápias-do-Nilo no Brasil, e o segundo registro de *Trichodina migala* para América do Sul. Na piscicultura A foram registradas cinco espécies em co-infestação: *T. centrostrigeata*, *T. compacta*, *T. heterodentata*, *T. magna*, *T. migala*. Houve 100% de infestação por tricodinídeos na estação seca (n = 5) e 42% na estação chuvosa (n = 7). Na piscicultura B foram registrados três gêneros da família Trichodinidae: *Paratrichodina*, *Tripartiella* e *Trichodinella*. Na estação seca, não houve registro de peixes parasitados (n = 5), diferente do período chuvoso, em que 100% dos peixes (n = 5) foram infestados por *P. africana*. O sítio de localização dos ciliados tricodinídeos variou conforme as espécies de ciliados encontradas. Foram registrados tricodinídeos em peixes no final da fase juvenil e nos adultos, algo incomum para tilápias-do-Nilo. Os dados físicos e químicos dos corpos hídricos usados como afluentes e efluentes dos tanques foram monitorados. A presente proposta apresenta novos dados de registro, sítio de localização, infestação em peixes adultos e ainda sucita necessidade de uma investigação futura mais acurada dos dados ambientais e da saúde animal para melhor entendimento da dinâmica e patogenicidade da tricodiníase em tilápias no Brasil.

Palavras-chave: aquicultura, tilápia-do-Nilo, *Paratrichodina*, *Trichodina*, *Trichodinella*, *Tripartiella*.

INTRODUÇÃO

A América do Sul é conhecida por ser um marco histórico na aquicultura no mundo. *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (tilápia-do-Nilo) é um dos organismos mais amplamente cultivados em pisciculturas continentais devido às suas boas taxas de crescimento e rápida adaptação às pisciculturas, tornando-se uma das espécies alvo para o desenvolvimento na aquicultura da América do Sul (BITTENCOURT *et al.*, 2014, VALLADÃO *et al.*, 2016b). Entre os países da América do Sul, o Brasil destaca-se pelo rápido desenvolvimento da aquicultura (MARTINS *et al.*, 2001, GHIRALDELLI *et al.*, 2006) e por ser um dos maiores importadores de pesca e aquicultura deste continente. No entanto, apesar das grandes quantidades de produção de pescado, quando comparado com outros países, o Brasil ainda possui enormes demandas de produtos aquícolas, que endossem o crescimento da produção nacional (VALLADÃO *et al.*, 2016b).

Dentre os parasitos que acometem cultivo de peixes, destacam-se os ciliados tricodinídeos (Mobilida: Trichodinidae), com mais de 300 espécies conhecidas (MITRA *et al.*, 2013, VALLADÃO *et al.*, 2016a). Esses ciliados possuem um disco adesivo complexo na superfície aboral de seu corpo, que funciona como uma ventosa para se fixar ao hospedeiro (LOM, 1958; VAN AS & BASSON, 1989). Altas infestações desses organismos trazem danos aos seus hospedeiros como, natação errática, comprometimento da visão, hiperplasia lamelar, além de morte crônica e aguda em peixes (VALLADÃO *et al.*, 2013, VALLADÃO *et al.*, 2014).

Há relatos diversos sobre infestações por tricodinídeos em tilápias-do-Nilo em todo o mundo (MACIEL *et al.*, 2017). No Brasil, os primeiros registros de tricodinídeos identificados em nível específico são recentes, tais como *Trichodina compacta* (GHIRALDELLI *et al.*, 2006), *Trichodina centrostrigeata* (BITTENCOURT *et al.*, 2014), *Trichodina heterodentata* (DIAS *et al.*, 2009, VALLADÃO *et al.*, 2016a), *Trichodina magna* (GHIRALDELLI *et al.*, 2006), *Trichodina migala* (VALLADÃO *et al.*, 2016a), *Paratrichodina africana* (PANTOJA *et al.*, 2012) e *Tripartiella* spp. (PINTO *et al.*, 2009; VALLADÃO *et al.*, 2016a). Grande parte dos estudos é sobre inventários taxonômicos bem como sobre efeitos desses parasitos sobre seus hospedeiros, tais como disfunção das brânquias, necrose do tecido epitelial, crescimento retardado e até a morte (KHAN, 2004; VALLADÃO *et al.*, 2014).

Dentre os estudos envolvendo tricodinídeos e peixes no continente americano, poucos realizam a caracterização morfológica detalhada dos parasitos, usando técnicas de

impregnação pela prata adequadas para correta identificação dos ciliados, que auxilia em um melhor tratamento da tricodiníase. Os obstáculos atuais para correta identificação dos tricodinídeos está na complexidade e polimorfismo dos denticulos e outras estruturas que compõem o disco adesivo (LOM, 1958; VAN AS & BASSON, 1989). Embora os estudos moleculares estejam avançando para o grupo, a identificação ainda é realizada principalmente pelas características morfológicas e morfométricas do disco adesivo.

O presente trabalho apresenta novos registros de tricodinídeos em tilápias para o estado do Rio de Janeiro e para o Brasil, investigou sítio de localização das espécies de tridodinídeos, a riqueza de espécies em peixes juvenis e adultos, bem como parâmetros limnológicos dos afluentes e efluentes dos tanques amostrados, suscitando futura discussão sobre taxa de infestação e carga orgânica dos tanques.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante um estudo intensivo de amostragem de pisciculturas comerciais no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, duas pisciculturas de duas propriedades rurais distintas foram selecionadas, nos municípios de Rio das Flores (A) (-22.17583333; -43.58888889) e Valença (B) (-22,70583333; -43,98333333), em tanques de cultura de 572,1792m² e 1000m², respectivamente. Vinte e dois peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, variedade Tilamax (do Programa de Melhoramento da Tilápia do Nilo da Universidade Estadual de Maringá-PR), foram coletados durante as estações seca (Junho e Julho/2016) e chuvosa (Fevereiro/2017), sendo 12 peixes coletados na localidade A e 10 peixes na localidade B.

Com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo número 002/2016), os peixes foram coletados com o auxílio de uma rede de fundição e medidos em paquímetro universal e pesados em balança digital de precisão. Em seguida, foram realizados esfregaços do muco proveniente da pele e brânquia das tilápias. As lâminas contendo os esfregaços foram secas ao ar e impregnadas pela técnica do “prata a seco” (LOM 1958), analisadas em microscópio Olympus® BX 41 com aumento de 1000x, e os ciliados foram quantificados (abundância relativa) nas brânquias e na pele. Os tricodinídeos foram fotografados e a morfometria, usada apenas para identificação, foi realizada utilizando o software Image-Pro Plus® 5.0 (Olympus).

A identificação taxonômica dos tricodinídeos foi baseada em caracteres morfológicos e morfométricos sugeridos por LOM (1958) e VAN AS & BASSON (1989), e, ainda, utilizando bibliografia especializada (LOM, 1963; KAZUBSKI *et al.*, 1986; DAS *et al.*, 1987; MITRA *et al.*, 2004; VALLADÃO *et al.*, 2013; VALLADÃO *et al.*, 2016a).

Com o intuito de caracterizar a qualidade da água dos afluentes e efluentes dos tanques nas áreas estudadas, foram coletadas amostras de água para caracterização limno-ecológica. Os seguintes parâmetros da água nas duas localidades (afluente e efluente) foram medidos através de sonda multiparâmetros e análise laboratorial para caracterizar a área: sólidos totais, sólidos dissolvidos, temperatura, turbidez, amônia (NH₄), pH, oxigênio dissolvido, nitrato, dióxido de nitrogênio, fosfato, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), condutividade elétrica e taxa de lotação de peixes. Estes dados estão apresentados na tabela 2.

RESULTADOS

Foram registradas oito espécies de tricodinídeos, distribuídas em quatro gêneros, parasitando *Oreochromis niloticus* (n = 22) em duas pisciculturas, pela primeira vez, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Este é o primeiro registro do gênero *Trichodinella* em tilápias-do-Nilo no Brasil, e o segundo registro de *T. migala* para América do Sul.

Na piscicultura A foram registradas cinco espécies em co-infestação: *Trichodina centrostrigeata* Basson *et al.*, 1983; *Trichodina compacta* Van As & Basson, 1989; *Trichodina heterodentata* Duncan, 1977; *Trichodina magna*, Van As & Basson, 1989; e *Trichodina migala* Van As & Basson, 1989. Embora não tenha sido realizada quantificação detalhada por espécie, *T. compacta* foi a espécie dominante e com maior abundância em todos os peixes analisados. Houve 100% de infestação por tricodinídeos na estação seca (n = 5) e 42% na estação chuvosa (n = 7). Na piscicultura B foram registrados três gêneros da família Trichodinidae: *Paratrichodina*, *Tripartiella* e *Trichodinella* (Tabela 1). A espécie dominante e mais abundante neste tanque de piscicultura foi *Paratrichodina africana* Kazubski & El- Tantawy 1986. Na estação seca, não houve registro de peixes parasitados (n = 5), diferente do período chuvoso, em que 100% dos peixes (n = 5) foram infestados por *P. africana* (Tabela 1). Foi observada co-infestação por *Tripartiella* sp. e *Trichodinella* sp. em um animal na estação chuvosa nessa piscicultura, entretanto, como a abundância de ambas espécies foi rara não foi possível identificação em nível específico desses tricodinídeos. Embora não tenham sido relatados danos severos nos peixes infestados, todos animais, nas duas pisciculturas, possuíam excessiva quantidade de muco na superfície do corpo e nas brânquias.

O sítio de localização dos ciliados tricodinídeos variou conforme as espécies de ciliados encontradas, sendo registrados tricodinídeos maiores (*T. centrostrigeata*, *T. compacta*, *T. heterodentata*, *T. magna*, e *T. migala*) na pele (piscicultura A) e tricodinídeos menores (*Paratrichodina*, *Tripartiella* e *Trichodinella*) nas brânquias (Tabela 1).

O tamanho corporal e peso dos peixes variaram entre as pisciculturas e entre as estações seca e chuvosa durante as coletas, sendo considerados juvenis os animais coletados na estação seca (tamanho médio: 16,14cm e peso médio: 178g) na piscicultura A, e adultos os animais coletados na estação chuvosa (tamanho médio: 15,4cm e peso médio: 80g) na mesma piscicultura e nas estações seca (tamanho médio: 24,7cm e peso médio: 344g) e chuvosa (tamanho médio: 23,1cm e peso médio: 280g) na piscicultura B.

Foram analisados os dados físicos e químicos dos corpos hídricos usados como afluentes, bem como aqueles efluentes dos dois tanques de pisciculturas investigados neste estudo (Tabela 2). Estes dados estão sendo compilados em mais de 30 tanques de pisciculturas no estado do Rio de Janeiro, Brasil, com a finalidade de entender o impacto da produção animal na qualidade da água dos efluentes destes tanques na região.



Figura 1: Espécies de ciliados tricodinídeos (Ciliophora, Peritrichia) ectoparasitos de tilápias em dois tanques de pisciculturas no estado do Rio de Janeiro, evidenciando disco adesivo após impregnação com nitrato de prata. a. *Trichodina centrostrigata*, b. *Trichodina compacta*, c. morfogênese de *Trichodina compacta*, d. *Trichodina heterodentata*, e. *Trichodina magna*, f. *Trichodina migala*, g. morfogênese de *Trichodina migala*, h. *Paratrichodina africana*, i. *Tripartiella* sp. j. *Trichodinella* sp. Barras: 10 µm.

Tabela 1. Espécies de ciliados tricodinídeos ectoparasitos de tilápias encontradas em duas pisciculturas (A e B) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, evidenciando sítio de infestação e prevalência durante as estações seca e chuvosa.

	Sítio	A (n=12)		B (n=10)	
		seca (n=5)	chuva (n=7)	seca (n=5)	chuva (n=5)
<i>Trichodina heterodentata</i>	B e P	100%	42.85%		
<i>Trichodina compacta</i>	P	100%	42.85%		
<i>Trichodina migala</i>	B e P	100%	42.85%		
<i>Trichodina magna</i>	B e P	100%	42.85%		
<i>Trichodina centrostrigeata</i>	B e P	100%	42.85%		
<i>Paratrichodina africana</i>	B				100%
<i>Tripartiella</i> sp.	B				20%
<i>Trichodinella</i> sp.	B				20%

Legenda. B = brânquias, P = pele, n = número de hospedeiros analisados.

Tabela 2. Dados físico-químicos do afluente e efluente das duas pisciculturas. Piscicultura A localizada no município de Rio das Flores e piscicultura B localizada no município de Valença.

Corpo hídrico	P	Estação	ST (mg/L)	SS (mg/l)	T (°C)	pH	O ₂ (mg/L)	SDT (mg/L)	Turbidez (NTU)	PO ₄ ⁻ (µg L ⁻¹)	NO ₃ (µg L ⁻¹)	NO ₂ (µg L ⁻¹)	NH ₄ (µg L ⁻¹)	CE (µS/cm)	TE (peixe/L)	TE (gramas/m ²)
Afluente	A	seca	26	6.92E+14	19.7	7.19	7.44	0.049	35.2	31.34	279.50	7.47	345.36	0.075	2.621556	209.72451
Efluente	A	seca	39.5	5.84E+08	21.41	7.23	6.27	0.039	53.8	14.39	383.18	6.44	121.86	0.06		
Afluente	A	cheia	50.5	5.20E+00	25.28	7.75	2.64	0.05	3.3	25.06	427.21	10.76	263.57	0.077	2.621556	467.76429
Efluente	A	cheia	52	1.56E+01	27.69	7.59	1.74	0.033	20.8	19.36	444.57	5.98	60.50	0.051		
Afluente	B	seca	120.4	1.27E+09	17.65	6.9	3.36	0.05	56.4	13.92	2022.43	10.28	800.00	0.08	4	1376
Efluente	B	seca	262	3.28E+10	17.64	7.3	7.62	0.072	312	23.20	1533.14	38.10	62.42	0.11	*	*
Afluente	B	cheia	220.5	1.53E+02	24.4	7.28	6.87	53.3	*	11.38	1049.28	575.07	53.68	81.9	4	1161.6
Efluente	B	cheia	247	2.06E+02	23.9	7.01	4.34	52.65	*	11.08	1019.39	601.99	60.04	81.3	*	*

Legenda. * = dados não aferidos, P = piscicultura A ou B, ST = sólidos totais, SS = sólidos em suspensão, T = temperatura da água, SDT = sólidos dissolvidos totais, CE = condutividade elétrica, TE = taxa de estocagem.

DISCUSSÃO

Das oito espécies de ciliados tricodinídeos encontradas neste estudo sete foram registradas recentemente em *Oreochromis niloticus* no Brasil (Tabela suplementar S1), sendo este o primeiro registro do gênero *Trichodinella* em tilápias-do-Nilo no Brasil, e o segundo registro de *T. migala* para América do Sul. A riqueza de espécies de tricodinídeos encontradas nestes dois tanques pode ser considerada alta e atípica visto que analisando apenas 22 animais, foi encontrada toda diversidade de espécies destes ciliados já registrada em estudos pelo país, bem como um novo importante registro.

Novos registros de ciliados tricodinídeos ectoparasitos de peixes e anuros, com identificação em nível específico, vem sendo realizados recentemente no Brasil, tais com as espécies *Trichodina compacta* (GHIRALDELLI *et al.*, 2006), *Trichodina centrostrigeata* (BITTENCOURT *et al.*, 2014), *Trichodina heterodentata* (DIAS *et al.*, 2009; VALLADÃO *et*

al., 2016a), *Trichodina magna* (GHIRALDELLI *et al.*, 2006), *Trichodina migala* (VALLADÃO *et al.*, 2016a), *Paratrichodina africana* (PANTOJA *et al.*, 2012) e *Tripartiella* spp. (PINTO *et al.*, 2009; VALLADÃO *et al.*, 2016a). Esses estudos são em sua maioria inventários taxonômicos e investigações sobre tratamento e danos causados aos hospedeiros.

Os tanques de piscicultura têm recebido atenção especial nas últimas décadas visto que funcionam como reservatórios naturais de parasitos de animais cultivados (exóticos) que podem acometer espécies de peixes e outros animais nativos. A diversidade e dinâmica do parasitismo por tricodinídeos em tilápias devem ser investigadas em detalhe, uma vez que as espécies detectadas no presente estudo são comumente encontradas na Europa, Ásia, África, México, Estados Unidos e Filipinas. Uma das possíveis rotas de entrada desses tricodinídeos na América do Sul foi através da introdução da espécie *Oreochromis niloticus* há cerca de 40 anos, quando a prática da aquicultura cresceu neste continente. Essa atividade favoreceu a transmissão de diferentes patógenos por diferentes grupos de animais (BASSON & VAN AS, 2006, ARECHAVALA-LOPEZ *et al.*, 2013, BITTENCOURT *et al.*, 2014, MACIEL *et al.*, 2017).

A alta prevalência de infestação relatada no presente estudo, bem como as altas taxas de armazenamento de peixes (KUBTZA, 2011) nos tanques de piscicultura analisados (tanque A: 2,62 peixes/m², tanque B: 4 peixes m²) ressaltam a importância destes criadouros como potenciais reservatórios de tricodinídeos em piscicultura neotropical. Os novos parasitos trazidos pela tilápia-do-Nilo foram capazes de se estabelecer em águas brasileiras, devido às várias tentativas de adaptações que estes organismos buscavam na natureza para sua sobrevivência. Essas tentativas são baseadas em um conjunto de condições inerentes ao próprio parasito e/ou inerentes ao ambiente, tais como: complexidade do ciclo de vida do parasito, fatores abióticos do ambiente e condições dos novos hospedeiros (GALLI *et al.*, 2005).

Visto a grande diversidade de peixes nos ecossistemas da América do Sul, os fatos relatados configuram risco potencial às espécies nativas. Recentemente, foi registrada, na região norte do Brasil, a ocorrência de *Trichodina nobilis*, já relatada em tilápias na região, um parasito originário da China, infestando o peixe amazônico nativo *Aequidens tetramerus* (BITTENCOURT *et al.*, 2014). Na mesma região também já havia sido observada a ocorrência de *Paratrichodina africana* em tilápias e em peixes selvagens (TAVARES-DIAS *et al.*, 2013). A partir dos registros de tricodinídeos em peixes nativos, parasitando tanto

tilápias silvestres como em cativeiro e a ocorrência destes tricodinídeos em novas regiões, como neste estudo, atenção especial deve ser dada, pois esses parasitos são oportunistas e estão amplamente distribuídos em todo o mundo, o que sugere necessidade de se entender a real distribuição destes parasitos nos ecossistemas naturais, bem como mapear os criadouros e sua proximidades com os corpos hídricos.

Além dos peixes nativos, existem outros potenciais reservatórios desses parasitos na natureza, tais como os anuros que podem transportá-los para as pisciculturas (PALA *et al.*, 2018). Esses casos de invasões biológicas são uma ameaça ao funcionamento e integridade dos ecossistemas naturais (POULIN *et al.*, 2011; BITTENCOURT *et al.*, 2014). Apesar dos relatos sobre o tema, existem poucos estudos que apontam o risco de introdução de animais silvestres e a consequente introdução de patógenos na aquicultura (PALA *et al.*, 2018).

Embora não tenham sido relatadas alterações morfológicas e danos nos peixes infestados pelos tricodinídeos, foi observada excessiva produção de muco em todos peixes parasitados, fato também relatado em outras pisciculturas por HASSAN (1999). Este sintoma é comum em animais infestados por tricodinídeos, bem como a outros parasitos, tal como relatado por ZILBERG & MUNDAY (2006), em peixes infestados por amebas da espécie *Neoparamoeba pemaquidensis*. Esses autores hipotetizaram que o muco produzido pelos peixes é rico em componentes imunológicos contra patógenos. Acreditamos que a alta produção de muco é resultado da defesa pela alta infestação de tricodinídeos nessas culturas de peixes.

O sítio de localização das espécies de tricodinídeos registradas nesse estudo é semelhante aos relatos realizados em outros trabalhos (VAN AS & BASSON, 1989, GHIRALDELLI *et al.*, 2006, BITTENCOURT *et al.*, 2014, VALLADÃO *et al.*, 2016a). Os ciliados parasitos classificados como grandes tricodinídeos registrados nesse estudo (*T. centrostrigeata*, *T. compacta*, *T. heterodontata*, *T. magna*, e *T. migala*), conforme classificação de VAN AS & BASSON (1987), tiveram preferência pela pele dos peixes, enquanto aquelas espécies consideradas tricodinídeos pequenos (*Paratrichodina*, *Tripartiella* e *Trichodinella*) tiveram preferência pelas brânquias, provavelmente por possuírem menor potencial de adesão ao seu hospedeiro.

Os peixes analisados estavam na fase adulta ou no final da fase juvenil. No entanto, vale ressaltar que não são comuns altas taxas de infestações em peixes adultos, uma vez que as infestações por tricodinídeos são melhor estabelecidas em peixes juvenis (KHAN, 2004; BASSON & VAN AS, 2006). Esta atípica alta riqueza de espécies nesses peixes adultos representa novidade para estudos sobre tricodinídeos em tilápias de pisciculturas.

As altas infestações por tricodinídeos podem ocorrer quando o equilíbrio parasito-hospedeiro-ambiente é rompido, por exemplo, quando ocorre acúmulo de matéria orgânica favorecendo crescimento de populações bacterianas, visto que os tricodinídeos são bacterívoros. O aumento exponencial dos tricodinídeos pode gerar danos aos seus hospedeiros, causando baixo apetite, hiperplasia e potencial necrose das células epiteliais, podendo levar à morte maciça das populações de hospedeiros (KHAN, 2004, SILVA- BRIANO *et al.*, 2011, VALLADÃO *et al.*, 2013 , VALLADÃO *et al.*, 2014). Os dados limnológicos apresentados na tabela 2, sugerem diminuição da qualidade da água, comparando água coletada nos afluentes e efluentes dos tanques de pisciculturas, o que ressalta necessidade futura de investigação acurada sobre a relação entre as condições tróficas das pisciculturas e a dinâmica parasitária por tricodinídeos.

CONCLUSÃO

O presente estudo ressaltou a necessidade de novos inventários de tricodinídeos em pisciculturas brasileiras visto baixo número de localidades investigadas, bem como contribuiu com o novo registro de *Trichodinella* em tilápias cultivadas no Brasil. A alta diversidade encontrada (oito espécies de tricodinídeos) em apenas dois tanques analisados no estado do Rio de Janeiro, elucida bem a necessidade de novos inventários. O sítio de localização na pele para os tricodinídeos com tamanho corporal maior e nas brânquias para os ciliados com tamanho corporal menor foram corroborados na presente proposta. A alta infestação em tilápias no final da fase juvenil e fase adulta relatada neste estudo constitui informação diferente daquela contida na literatura. Foram apresentados ainda que as condições do ambiente (qualidade da água e densidade bacteriana) e de saúde geral do hospedeiro (produção de muco) podem contribuir para a proliferação de tricodinídeos, sendo proposta uma investigação mais acurada destes tópicos em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ARECHAVALA-LOPEZ, P; SANCHEZ-JEREZ, P; BAYLE-SEMPERE, J.T; UGLEM, I; MLADINEO I. Reared fish, farmed escapes and wild fish stocks- a triangle of pathogen transmission on of concern to Mediterranean aquaculture management. **Aquaculture Environment Interactions**, v.3, p. 153-161, 2013.
- BASSON, L; VAN AS, J. Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora) *in* P T K

- Woo (ed.): **Fish diseases and disorders**, v. 1, cap. 2, p. 154-180, 2006.
- BITTENCOURT, L.S; PINHEIRO, D.A; CÁRDENAS, M.Q; FERNANDES, B.M; TAVARES-DIAS, M. Parasites of native Cichlidae populations and invasive *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in tributary of Amazonas River (Brazil). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p.44–54, 2014.
- DAS, M.K; & HALDAR D.P. Urceolariid ciliates of the genus *Tripartiella* invading gills of freshwater cultured carps in India. **Arch Protistenkd**, v. 134 p. 169-178, 1987.
- DIAS, R.J.P; FERNANDES, N.M; SARTINI, B; SILVA-NETO, I.D; D’AGOSTO, M. Occurrence of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora:Trichodinidae) infesting tadpoles of *Rhinella pombali* (Anura: Bufonidae) in the Neotropical area. **Parasitology International**, v. 58 p.471–474, 2009.
- HASSAN, M.A.E.H. Trichodiniasis in farmed freshwater tilapia in eastern Saudi Arabia. **JKAU: Eng. Sci**, v. 11 (1) p. 3-17, 1999.
- GALLI, P; STEFANI, F; BENZONI, F; ZULLINI, A. Introduction of alien host– parasite complexes in a natural environment and the symbiota concept. **Hydrobiologia** v. 548(1) p. 293-299, 2005.
- GHIRALDELLI, L; MARTINS, M.L; JERÔNIMO, G.T; YAMASHITA, M.M; ADAMANTE, W.B. Ectoparasites communities from *Oreochromis niloticus* cultivated in the State of Santa Catarina, Brazil. **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 1 p.181–190, 2006.
- KAZUBSKI, S.L; & EL-TANTAWY, S.A.M. The ciliate *Paratrichodina africana* sp. N. (Peritricha, Trichodinidae) from Tilapia fish (Cichlidae from Africa). **Acta Protozoologica**, v. 25(4), p. 433-438, 1986.
- KHAN, R.A. Diseases outbreaks and mass mortality in culture Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with *Trichodina murmanica* (Ciliophora). **Journal of Fish Diseases**, v. 27 p.181-184, 2004.
- KLEIN, B.M. The “*seca*” silver method and its proper use. **Journal of Protozoology**, v. 5, p.99–103, 1958.
- KUBTZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2 ed. ISBN 978-85-98545-06-6, 2011.
- LOM J. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics. **Journal of Protozoology**, v. 5, p.251–263, 1958.
- LOM, J. Discovery of a *Tripartiella* in the urinary tract of *Phoxinus phoxinus* L. **Acta**

- Protozoologica**, v.1, p. 1-5, 1963.
- MACIEL, P.O; GARCIA, F; CHAGAS, E.C; FUJIMOTO, R.Y; TAVARES-DIAS, M.
Trichodinidae in comercial fish in South America. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28 (1), p. 33–56, 2017.
- MARTINS, M.L; MORAES J.R.E; ANDRADE, P.M; SCHALCH, S.H.C; MORAES, F.R.
Piscinoodinium pillulare (Schaperclaus, 1954) Lom, 1981 (Dinoflagellida) infection in cultivated freshwater fish from the northeast region of São Paulo, state Brazil. Parasitological and pathological aspects. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61(4), p. 639- 644, 2001.
- MARTINS, M.L; & GHIRALDELLI, L. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilápia in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68(1), p. 169-172, 2008.
- MITRA, A.K & HALDAR D.P. First record of *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950) Sramek-Husek, 1953, with Description of *Trichodina notopteridae* sp. n. (Ciliophora: Peritrichida) from freshwater fishes of India. **Acta Protozoologica**, v. 43, p. 269-274, 2004.
- MITRA, A.K; BANDYOPADHYAY, P.K; GONG Y. Studies on Trichodinid and Chilodonellid Ciliophorans (Protozoa: Ciliophora) in the Indian freshwater and estuarine fishes with description of *Trichodinella sunderbanensis* sp. nov. and *Trichodina nandusi* sp. nov. **Parasitology Research**, v. 112 (3), p. 1077–1085, 2013.
- PALA, G; VALLADÃO, G.M.R; ALVES L.O; PILARSKI, F; LUX HOPPE, E.G. Tadpoles of *Rhinella schneideri* as reservoirs of trichodinids in continental aquaculture. **Aquaculture** v. 488, p. 17-21, 2018.
- PANTOJA, W.M.F; NEVES, L.R; DIAS, M.R.D; MARINHO, R.G.B; MONTAGNER, D; TAVARES-DIAS, M. Protozoan and metazoan parasites of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. **Revista MVZ Córdoba**, v. 17, p.2812–2819, 2012.
- PINTO, E; GARCIA, A.M; FIGUEIREDO, H.C; RODRIGUES, M.P; MARTINS, M.L.
Primeiro Relato de *Tripartiella* sp. (Ciliophora: Peritrichia) em *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes: Pimelodidae) cultivado no estado de Mato Grosso do Sul, com descrição de nova espécie. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35(1), p. 91-97, 2009.
- POULIN, R; PATERSON, R.A; TOWNSEND, C.R; TOMPKINS, D.M; KELLY, W.
Biological invasions and the dynamics of endemic diseases in freshwater ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 56(4), p. 676-688, 2011.
- ROCHE, D.G; LEUNG, B; MENDOZA-FRANCO, E.F; TORCHIN, M.E. Higher parasite

- richness, abundance and impact in native versus introduced cichlid fishes. **International Journal for Parasitology**, v. 40(13), p. 1525-1530, 2006.
- TAVARES-DIAS, M; MARCHIORI, N.C; MARTINS, M.L. *Paratrichodina africana* (Ciliophora: Trichodinidae) of wild and cultured Nile tilapia in the Northern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 248–252, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; PÁDUA, S.B; GALLANI, S.U; MENEZES-FILHO, R.N; DIAS-NETO, J; MARTINS, M.L; ISHIKAWA, M.M; PILARSKI, F. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. **Veterinary Parasitology**, v. 197 p.705–710, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; GALLANI, S.U; PÁDUA, S.B; MARTINS, M.L; PILARSKI, F. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. **Parasitology**, v. 141, p. 662–669, 2014.
- VALLADÃO, G.M.R; ALVES, L.O; PILARSKI, F. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. **Aquaculture**, v. 451, p.444–450, 2016a.
- VALLADÃO, G.M.R; GALLANI, S.U; PILARSKI F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 0, p. 1–19, 2016b.
- VAN AS, J.G; & BASSON L. Host specificity of trichodinid ectoparasites of freshwater fish. **Parasitology Today**, v. 3, p.88–90, 1987.
- VAN AS, J.G; & BASSON L. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids. **Systematic Parasitology**, v.14, p.157–179, 1989.
- ZAGO, A.C; FRANCESCHINI, L; GARCIA, F; SCHALCH, S.H.C; GOZI, K.S; SILVA, R.J. Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p.171–178, 2014.
- ZILBERG, D; & MUNDAY, B.L. **Phylum Amoebozoa**. In: P. T. K. Woo (ed.) *Fish Diseases and Disorders*, v. 3: viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing. Cap. 1, p. 1- 15, 2006.

Espécies	Sítio de infestação	Hospedeiro	Localização Geográfica	Referências
<i>Trichodina compacta</i>	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Santa Catarina	1
	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Santa Catarina	2
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	São Paulo	3
	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Minas Gerais	4
	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Trichodina centrostrigeata</i>	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Amapá	6
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	São Paulo e Minas Gerais	4
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Trichodina heterodontata</i>	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Minas Gerais	4
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Trichodina magna</i>	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Santa Catarina	1
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Santa Catarina	7
	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	Santa Catarina	2
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	São Paulo	3
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Trichodina migala</i>	pele	<i>Oreochromis niloticus</i>	São Paulo	4
	pele e brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Paratrichodina africana</i>	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Amapá	8
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Amapá	9
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Minas Gerais, São Paulo e Bahia	10
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Amapá	6
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Minas Gerais	4
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5
<i>Tripartiella</i> spp.	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Minas Gerais	4
	brânquias	<i>Oreochromis niloticus</i>	Rio de Janeiro	5

Tabela suplementar S1: Registros recentes de tricodinídeos infestando pele e brânquias de *Oreochromis niloticus* em diferentes regiões no Brasil. 1- Ghiraldelli L, Martins ML, Jerônimo GT, Yamashita MM, Adamante WB (2006) Ectoparasites communities from *Oreochromis niloticus* cultivated in the State of Santa Catarina, Brazil. J Fish Aquat Sci 1:181–190. doi:10.1590/S1984-29612014041. 2- Jerônimo GT, Speck GM, Cechinel MM, Gonçalves ELT, Martins ML (2011) Seasonal variation on the ectoparasitic communities of Nile tilapia cultured in three regions in southern Brazil. Braz J Biol 71:365–373. doi:10.1590/S1519-69842011000300005. 3- Zago AC, Franceschini L, Garcia F, Schalch SHC, Gozi KS, Silva RJ (2014) Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 23:171–178. doi:10.1590/S1984-29612014041. 4- Valladão GMR, Alves LO, Pilarski F (2016a). Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. Aquaculture 451:444–450. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.030. 5- Presente estudo. 6- Bittencourt LS, Pinheiro DA, Cárdenas MQ, Fernandes BM, Tavares-Dias M (2014). Parasites of native Cichlidae populations and invasive *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in tributary of Amazonas River (Brazil). Braz J Vet Parasitol 23:44–54. 7- Martins ML., Ghiraldelli L (2008). *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. Braz. J. Biol., 68(1): 169-172. 8- Pantoja WMF, Neves LR, Dias MRD, Marinho RGB, Montagner D, Tavares-Dias M (2012). Protozoan and metazoan parasites of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. Rev MVZ Córdoba 17:2812–2819. 9- Tavares-Dias M, Marchiori NC, Martins ML (2013). *Paratrichodina africana* (Ciliophora: Trichodinidae) of wild and cultured Nile tilapia in the Northern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 22:248–252. doi:10.1590/S1984-29612013005000025. 10- Valladão, G.M.R., Pádua, S.B., Gallani, S.U., Menezes-Filho, R.N., Dias-Neto, J., Martins, M.L., Pilarski, F., 2013. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. Vet. Parasitol. 197, 705–710

CAPÍTULO 2

Morfologia e filogenia molecular de *Trichodina diaptomi* (Ciliophora, Mobilida) em copépodos calanóides no Brasil, com novos insights sobre evolução e especificidade

RESUMO

Ciliados tricodinídeos são organismos aquáticos, ectocomensais ou parasitos de animais vertebrados e invertebrados, distribuídos em todo globo terrestre. Quando presente em peixes podem causar danos aos seus hospedeiros como crescimento retardado, hiperplasia lamelar e morte aguda. Poucos são os registros de tricodinídeos em outros hospedeiros como em copépodos calanoideos, desta forma, o conhecimento sobre a diversidade desses organismos é escasso. Este estudo realizou caracterização morfológica (impregnação por nitrato de prata e, pela primeira vez, caracterização *in vivo*) e a primeira caracterização molecular (gene 18srRNA) de uma população de *Trichodina diaptomi* encontrada infestando copépodos calanóides em um lago artificial urbano na região sudeste do Brasil. A sequência obtida da população do nosso estudo mostrou 100% de identidade com a sequência de *T. acuta* isolada do peixe *Misgurnus anguillicaudatus*, na China, porém a morfologia apresentou leves diferenças entre as duas espécies. A população brasileira apresenta proporções corporais menores do que a população chinesa. Nossa espécie agrupou no clado de espécies de parasitos de peixes de água doce. Acreditamos que a espécie *T. acuta* isolada do peixe asiático Dojô, trata-se na verdade de uma possível forma polimórfica de *T. diaptomi* e que, o hospedeiro influencia as alterações morfológicas de tricodinídeos. Quando tricodinídeos estão sobre peixes suas proporções corporais são maiores do que os que estão sobre copépodos, pois em peixes a área de contato, alimentos e nichos disponíveis são maiores do que naqueles crustáceos, além de que a competição por espaço em um hospedeiro muito pequeno é maior. Estudos anteriores relatavam que *T. diaptomi* é um tricodinídeo ectocomensal de copépodos planctônicos da ordem Calanoida, entretanto, nossos dados sugerem que essa espécie também parasita peixes e, desta forma, apresenta baixa especificidade e um possível polimorfismo corporal conforme muda de hospedeiros.

Palavras-chave: tricodinídeos, copépodos, peixes, biologia molecular.

INTRODUÇÃO

O gênero *Trichodina* Ehrenberg, 1830 (Trichodinidae: Mobilida) inclui microeucariotos ciliados ectocomensais ou parasitos de vasta gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados aquáticos tais como peixes, celenterados, anfíbios, equinodermos, moluscos e crustáceos (MACIEL *et al.*, 2017), totalizando, aproximadamente, 270 espécies descritas e que possuem ampla distribuição geográfica (MITRA *et al.*, 2013; VALLADÃO *et al.*, 2016). Aderem-se aos seus hospedeiros por meio de um complexo disco adesivo, constituído por dentículos proteicos. Altas infestações desses ciliados, causam debilidades em seus hospedeiros, como natação errática, crescimento retardado, hiperplasia lamelar e morte aguda (EKANEM & OBLEKEZIE, 1996; VALLADÃO *et al.*, 2013, 2014), além de deixar seus hospedeiros susceptíveis a outras doenças infecciosas (EVANS *et al.*, 2007). Apesar da ampla diversidade descrita até o momento, grande parte dos estudos se concentram em tricodinídeos associados a peixes. Assim, pouco se sabe sobre a diversidade destes ciliados em outros grupos de organismos, como por exemplo, em copéodos calanoides (BASSON & VAN AS, 1991, XU *et al.*, 2000; BASSON & VAN AS, 2006; DIAS *et al.*, 2009, DA SILVA *et al.*, 2009, SILVA- BRIANO *et al.*, 2011).

Historicamente, estudos com tricodinídeos tem se limitado a registros e caracterizações morfológicas dos indivíduos (KATTAR, 1975; GHIRALDELI & MARTINS, 2006; PINTO *et al.*, 2006; MARTINS & GHIRALDELI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010; VALLADÃO *et al.*, 2016) sobretudo por meio de técnicas de microscopia óptica, essencialmente de espécimes impregnados pela prata. Entretanto, recentemente, estudos envolvendo a caracterização molecular destes ciliados vem sendo difundidos, porém, estes ainda são incipientes, e incluem, basicamente, sequências de tricodinídeos associados a peixes, sendo baixa a amostragem em outros grupos de hospedeiros (GONG *et al.*, 2006; ZHAN *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2013, 2016; WANG *et al.*, 2017, MARCOTEGUI *et al.*, 2018). Apesar disso, estes trabalhos tem auxiliado na compreensão da sistemática do grupo, trazendo novos dados que permitem a reinterpretação dos caracteres tradicionalmente utilizados na taxonomia.

O polimorfismo e a plasticidade fenotípica tem sido relatado em vários grupos de microeucariotos unicelulares (CLAMP & COATS, 2000; LOGARES *et al.*, 2007; MARTINELE & D'AGOSTO, 2008; LEMOS *et al.*, 2015, KOSAKYAN *et al.*, 2016; CEDROLA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019), e tem sido trazidos à luz por meio da análise morfológica juntamente com análises moleculares dos espécimes, porém, este

fenômeno ainda é pouco conhecido em representantes da ordem Mobilida (GAZE & WOOTTEN, 1998; WANG *et al.*, 2017).

O presente estudo realiza a caracterização morfológica (técnica “prata a seco” e *in vivo*) e, pela primeira vez, molecular, da espécie *Trichodina diaptomi*, isolada de copépodos calanoides na região neotropical e discute a ocorrência de polimorfismos em ciliados tricodinídeos que infestam diferentes hospedeiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo e Amostragem

Amostras de água contendo copépodos infestados por *T. diaptomi* foram coletadas no mês de março nos anos de 2015 e 2018 e em julho no ano de 2018 de diferentes pontos de um pequeno lago artificial situado no Museu Mariano Procópio, Município de Juiz de Fora Minas Gerais-Brasil (21°44'S, 43°21'W, altitude 648 m). Os crustáceos foram coletados com auxílio de rede de plâncton de malha (seine) de 50 µm. As amostras foram alocadas em frascos para posterior análise. Os copépodos foram triados com auxílio de microscópio estereoscópio e quando estavam positivos para a infestação por tricodinídeos foram separados em placa de petri contendo água mineral. Os ciliados foram raspados da superfície corporal de seus hospedeiros com auxílio de micropipetas de vidro. Uma parte dos espécimes isolados foram depositados em lâminas de vidro e secos ao ar, para análise morfológica e a outra parte alocada em microtubos de 1,5 mL, contendo etanol 95%, para posterior análise molecular.

Caracterização morfológica

Indivíduos da espécie *T. diaptomi* foram registrados *in vivo* com auxílio de microscópio de campo claro e com contraste interferencial diferencial (DIC) para adicionalmente serem evidenciadas estruturas jamais vistas dessa espécie quando submetidas a técnicas de impregnações (FOISSNER, 2014). As lâminas contendo tricodinídeos foram submetidas à impregnação pelo nitrato de prata à seco (KLEIN, 1958) e analisadas em microscópio fotônico BX 41 Olympus® no aumento de 1000X. Em seguida, os espécimes impregnados foram fotografados e a caracterização morfométrica foi realizada com auxílio do software Image Pró-Plus® 6.0 (Media cybernetics 1993). A identificação taxonômica foi realizada por meio dos dados morfométricos, dando atenção especial aos componentes do disco adesivo. Todas as medidas foram dadas em micrômetros e seguiu-se o sistema de uniformidade de caracteres de LOM (1958) e VAN AS & BASSON (1989).

Extração do DNA genômico, PCR e Sequenciamento

Para a caracterização molecular, 20 espécimes foram isolados em microtubo de 1,5 mL contendo etanol 95% e submetidos a extração de DNA genômico, utilizando o Kit Qiagen DNAeasy Blood and Tissue (Qiagen, São Paulo, Brasil), segundo as orientações do fabricante para extração de tecidos animais. O DNA genômico extraído foi submetido a nested-PCR utilizando os primers EUKA/B (MEDLIN *et al.*, 1988) na primeira reação, e para a segunda reação foram utilizados primers elaborados no presente estudo, específicos para organismos pertencentes à ordem Mobilida, Mob 54F 5' (CAT GCA TGT GTA AGT ATA AGT G) e Mob1385R 5' (GGG CGG TGT GTA CAA AGG GC). As condições utilizadas durante a amplificação foram as mesmas em ambas as reações, e seguiram o seguinte padrão: 1 passo a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos a 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 2 minutos; e um passo a 72° C por 7 minutos. O produto das reações foi purificado utilizando o kit Qiagen QIAquick PCR purification (Qiagen, São Paulo, Brasil), seguindo as orientações do fabricante. Após, os produtos purificados foram enviados ao sequenciamento, utilizando primers específicos para ordem Mobilida, elaborados no presente estudo, Mob 54F 5' (CAT GCA TGT GTA AGT ATA AGT G), Mob144F 5' (CAT GGA TAA CCG TGG CAA TTC), Mob396R 5' (CCG AGT TGT TAT TTC TTG TC), Mob975F 5' (GGA AAC TTA CCA GGT CAA) e Mob1385R 5' (GGG CGG TGT GTA CAA AGG GC).

Análises Filogenéticas

Nosso *dataset* foi gerado usando dados de organismos previamente caracterizados (n=41), disponíveis no banco de dados Silva versão 123 (PRUESSE *et al.*, 2007), bem como da sequência produzida no presente estudo, incluindo representantes das ordens: Mobilida and Sessilida. O alinhamento foi realizado no programa ARB (LUDWIG *et al.*, 2004), e após inspeção manual, regiões de natureza ambígua e sequências correspondentes aos primers foram removidas. Finalmente, o *dataset* foi aparado, produzindo um alinhamento contendo sequências de mesmo comprimento. Subsequentemente, o alinhamento foi analisado no programa JModel-Test 2.1.4 (GUINDON & GASCUEL, 2003; DARRIBA *et al.*, 2012) para a identificação do modelo evolutivo. A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada no programa MrBayes v. 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) usando o modelo GTR+G+I. Duas simulações simultâneas e independentes de Monte Carlo da Corrente de Markov estavam em andamento até o desvio padrão médio das frequências divididas ficar abaixo de 0,01, indicando a convergência das duas corridas independentes. Todas as árvores remanescentes

após o descarte do *burn-in* (25%) foram utilizadas no cálculo das probabilidades posteriores utilizando o consenso da maioria. A análise de máxima verossimilhança (ML) foi realizada utilizando-se o software RAxML (GUINDON *et al.*, 2010) aplicado ao modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I e a confiabilidade dos ramos internos foi avaliada pelo método bootstrap não paramétrico com 1.000 repetições.

RESULTADOS

Caracterização morfológica

Trichodina diaptomi

Hospedeiro e localidade: Calanoida, Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil (21°44'S, 43°21'W, altitude 648 m).

Sítio: Carapaça (Fig. 1)

Material referência: lâminas 2015/03 na coleção do Laboratório de Protozoologia (LabProto), Departamento de Zoologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Descrição geral: Tricodinídeos em forma arredondada e com corpo em formato de prato, tricodinídeos com tamanho médio. Disco adesivo côncavo. Presença de marcado círculo no disco adesivo. O tricodinídeo é rodeado por uma fina e estriada borda de membrana.

Descrição do denticulo: Denticulo robusto, lâmina em forma de foice. Lâmina preenchendo grande parte da área entre os eixos y. Ponto tangente muitas das vezes no mesmo nível e raramente acima da superfície distal. Superfície distal da lâmina marcadamente arredondada e com leve curva em direção ao ápice da lâmina, a superfície distal compreende do eixo y-1 e eixo y. Ápice da lâmina perpassando este eixo. Superfície distal muito arredondada, superior ao ponto tangente. Em muitos casos, abaixo da margem da lâmina anterior, há uma fina curvatura que se estende até a apófise do raio. Margem posterior forma uma curva semi-lunar com ponto mais profundo abaixo do ápice da lâmina. Todos os denticulos mostraram proeminente apófise na lâmina. Seção conectante da lâmina e parte central robusta. Parte central afunila-se bastante até o ponto de encontro com a seção central do denticulo subsequente, ligado frouxamente ao denticulo subsequente. Parte central estende-se além do eixo y-1. Seção acima do eixo x triangular, enquanto a seção abaixo é paralela a metade da distância e inclina-se em direção ao raio. Algumas partes centrais dos denticulos mostraram leve proeminência, correspondente a apófise do raio, que são fortemente desenvolvidos na maioria dos denticulos. Parte central fortemente conectada ao raio e bem desenvolvida. Raio

fortemente desenvolvido e de mesma espessura ou afunilados nas pontas, tornando-as arredondadas e, em muitos casos, com o final pontiagudo. Raios paralelos aos eixos y em alguns espécimes, enquanto levemente curvado para o eixo y+1 em alguns dentículos. Círculo central em alguns espécimes levemente granular com borda bem definida em alguns espécimes e com diferentes tamanhos de círculos. Os caracteres observados nos indivíduos impregnados pela técnica de nitrato de prata são observados nos indivíduos *in vivo* (Fig 1.), como a lâmina em forma de foice, os raios robustos, pinos radiais, ciliatura adoral e macronúcleo.

Nós observamos estágios de morfogênese em alguns espécimes (Fig. 2).

Observações

Os tricodinídeos do presente estudo pertencem, sem dúvidas, a espécie *T. diaptomi*. Os dados morfométricos obtidos são condizentes aos intervalos de medidas esperados para esta espécie. Adicionalmente, pode-se observar nas fotografias *in vivo* as estruturas que compõe o disco adesivo que confirmam se tratar de *T. diaptomi*. Nesta população, nas partes centrais de alguns dentículos, houve uma suave projeção correspondendo a apófise do raio e um demarcado círculo na parte central do disco adesivo, como também relatado por WEST *et al.*, (2016). No entanto, a população isolada no presente estudo difere, ligeiramente, em alguns aspectos das populações africanas caracterizadas anteriormente por BASSON & VAN AS (1991) e WEST *et al.*, (2016). Nesta população, por vezes, abaixo da margem anterior da lâmina do dentículo, observou-se delicada curvatura que se estendia até a apófise do raio e em alguns espécimes, as pontas dos raios tornaram-se pontiagudas. Não foram observados tricodinídeos nadando livremente nas amostras de água.

Análises Filogenéticas

Ambas as análises filogenéticas realizadas neste estudo, inferência Bayesiana e máxima verossimilhança, recuperaram a mesma topologia (Figura 3), na qual duas famílias pertencentes à ordem Mobilida, Urceolariidae e Trichodinidae, emergiram como agrupamentos naturais (X BI/ 100 ML).

A sequência de *Trichodina diaptomi*, obtida no presente estudo possui 1455 pb e emergiu em um agrupamento monofilético com a sequência de *T. acuta* (X BI/ 100 ML) (Figura 3). Este clado, por sua vez, emergiu como grupo-irmão do clado composto por *T. pseudoheterodentata*, *T. paranigra* e *T. hiperparasitis*, com elevados valores de suporte e

grupo-irmão do clado constituído por *T. heterodentata* e *T. nobilis* (X BI/ 87 ML).

Ao lado direito da árvore filogenética recuperada no presente estudo estão ilustrados os hospedeiros de cada espécie de tricodinídeo. Esta é a primeira vez que um crustáceo copépodo aparece como hospedeiro em análises filogenéticas. A sequência do presente estudo agrupou-se com espécies que ocorrem em peixes de água doce e está distante daquelas que ocorrem em hospedeiros marinhos.

DISCUSSÃO

A espécie *Trichodina diaptomi* foi proposta por BASSON & VAN AS (1991), associada à copépodos pertencentes à espécie *Metadiaptomus meridianus*. Este ciliado tem sido registrado em várias localidades geográficas, associado a crustáceos calanóides (WEST *et al.*, 2016) e foi registrado, pela primeira vez, no Brasil, por DA SILVA *et al.*, (2009) em *Notodiaptomus deitersi*, em um lago urbano eutrofizado no estado de Mato Grosso do Sul. Desta forma, este é o segundo registro de *Trichodina diaptomi* no país. Contudo, devido à ausência de caracterização morfométrica completa da população encontrada por DA SILVA *et al.*, (2009), é difícil determinar se as duas populações são morfologicamente similares. Apesar disso, a população caracterizada neste estudo se assemelha à população registrada na África do Sul, na região de Rustfontein Dam e de Botswana por WEST *et al.* (2016) (Tabela 1).

Os caracteres morfológicos mais importantes na taxonomia do grupo são os componentes do disco adesivo, como pinos radiais, dentículos e centro do disco adesivo e a estrutura mais utilizada para separar espécies são os dentículos. O registro de maior número de dentículos para a espécie *T. diaptomi* permanece o de SILVA- BRIANO *et al.*, (2011), com 22 dentículos para a população mexicana, enquanto a deste estudo permanece com a média de 19 dentículos, como é observado em outros trabalhos. Em geral esta população se assemelha com a encontrada por BASSON & VAN AS (1991), cujo estudo foi conduzido na África do Sul, porém na região de Bloemfontein. Os dados morfométricos contemplam os intervalos de medidas descritos para a população sul africana por estes autores.

As reconstruções filogenéticas demonstram que a sequência de *T. diaptomi*, obtida no presente estudo, emergiu como grupo irmão da sequência correspondente à espécie *T. acuta*, isolada em peixes da espécie *Misgurnus anguillicaudatus* por WANG *et al.* (2017). Tais sequências possuem 100% de identidade, porém, apesar da similaridade gênica, as populações diferem, ligeiramente, nos dados morfométricos, apresentando maiores dimensões corporais que espécimes de *T. diaptomi* anteriormente caracterizados, inclusive o do presente estudo

(Tabela 1). Entretanto, é necessário destacar que os principais caracteres taxonômicos para identificação específica de ciliados tricodinídeos estão relacionados a estruturas que compõem o disco adesivo, caracteres, estes, não evidenciados na descrição proposta por WANG *et al.*, (2017). Assim, levando em consideração os consistentes dados morfológicos produzidos neste trabalho, bem como a similaridade gênica entre as sequências, nós sugerimos que os espécimes encontrados por WANG *et al.* (2017) pertençam à espécie *Trichodina diaptomi*.

Segundo IRWIN *et al.* (2017), o tipo de hospedeiro ao qual os tricodinídeos se associam, invertebrado ou vertebrado, não reflete divergência evolutiva, visto que espécies de tricodinídeos associadas a mesmo tipo de hospedeiro não constituem agrupamentos naturais. Algo que também foi recuperado em nossas análises filogenéticas.

Vários estudos sugerem que a espécie *T. diaptomi* possua alta especificidade por hospedeiros da ordem Calanoida (LOM, 1960; BASSON & VAN AS, 1991; WEST *et al.*, 2016), o que pode ter enviesado a identificação realizada por WANG *et al.*, (2017), ao encontrá-lo associado a peixes da espécie *Misgurnus anguillicaudatus*. Entretanto, o olhar cuidadoso para o histórico taxonômico desta espécie demonstra que ela pode estar associada a outros hospedeiros. LOM (1960), ao analisar fotomicrografias obtidas de tricodinídeos associados à crustáceos calanoideos, identificou-os como *Trichodina domerguei f. latispina* Dogiel, 1940. Nesta mesma ocasião, o autor encontrou esta espécie associada à peixes, girinos e copépodos, e destacou que os espécimes associados aos copépodos possuíam menores dimensões corporais que os associados aos demais taxa de hospedeiros analisados, sugerindo a existência de polimorfismo nestes tricodinídeos.

Mais tarde, CHEN (1963) encontrou a mesma espécie infestando vários hospedeiros, como peixes, girinos e copépodos calanoideos, conduzindo experimento de transferência de tricodinídeos de copépodos para carpas das espécies *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cyprinus carpio* e *Ctenopharyngodon idella*, obtendo sucesso.

BASSON & VAN AS (1991) revisaram a taxonomia de espécies de tricodinídeos associadas a copépodos. Conforme dito anteriormente, o nome dado a essa espécie era *T. domerguei f. latispina*, porém existiam diversas controvérsias em torno desse nome, devido ao registro dessa espécie em vários hospedeiros. Assim, os autores resolveram designar um novo nome a esta espécie, justificando que a mesma somente ocorria em copépodos, propondo o nome *T. diaptomi*. Os autores destacaram, ainda, que uma característica marcante desta espécie é possuir um marcado círculo central no disco adesivo. Entretanto, um fato interessante que deve ser destacado, é que os autores encontraram a espécie *T. diaptomi* não só em crustáceos, mas também em larvas do peixe *Clarias gariepinus*, porém observaram que

as populações de tricodinídeos declinavam com o passar dos dias em ambos hospedeiros e concluíram que *T. diaptomi* não se estabeleciam nas larvas e novamente alegaram que esse tricodinídeo é específico de copépodos.

Nossos dados moleculares corroboram estes achados anteriores, visto que a sequência de *T. diaptomi*, neste estudo, agrupou-se com espécies de tricodinídeos que parasitam peixes e é 100 % idêntica à sequência do parasito isolado por WANG *et al.* (2017).

Mais tarde, ASMAT (2004) encontrou *T. diaptomi* em peixes das espécies *Tetaodron cutcutia* e *Gagata cenia* e, por fim, uma completa caracterização morfológica de *T. diaptomi* foi conduzida por WEST *et al.* (2016) na África. Esses últimos autores também levantaram uma questão interessante: Para onde os tricodinídeos de copépodos vão quando estes entram no seu período de diapausa? A partir disso os autores hipotetizaram que os tricodinídeos, assim como os copépodos, também poderiam se encistar, apesar de não haver registros na literatura sobre isso, na ausência de seu hospedeiro. Diante do histórico de infestações de *T. diaptomi* tanto em peixes como em copépodos, e diante da questão levantada recentemente sobre o suposto período de diapausa deste microeucarioto, concordamos que este tricodinídeo ocorra em ambos hospedeiros. Acreditamos que *T. diaptomi* não realiza período de diapausa como os copépodos, mas na ausência desse hospedeiro ele procura por outro, no caso, os peixes.

Assim, nossa hipótese é de que o hospedeiro realiza grande pressão sobre os tricodinídeos e dependendo do tipo de hospedeiro ao qual o ciliado está aderido ele assumirá diferente morfologia. Quando esse tricodinídeo está sobre o hospedeiro pisciano ele é estimulado a ter maiores proporções corporais, devido à maior superfície de contato, nichos e alimentos disponíveis, diferentemente do copépodo, cujo tamanho corporal é bem menor e em consequência, o ciliado não se desenvolve tanto e um dos fatores limitantes pode ser a competição intraespecífica entre esses indivíduos. Ainda, grandes proporções corporais desses ciliados nos copépodos contribuiria por afundá-los, devido à grande densidade sobre este hospedeiro, o que já foi relatado em infestações causadas por peritríqueos sessilídeos do gênero *Zoothamnium* por HERMAN e MIHURSKY (1964). Segundo os autores, os copépodos infestados afundavam mais rapidamente que aqueles não infestados e concluíram que estes animais estariam em desvantagens no ambiente natural.

Não só o hospedeiro, mas também condições ambientais parecem ser determinantes para diferenças morfológicas em tricodinídeos. Quando coletados no verão sobre o hospedeiro *Metadiaptomus meridianus*, *T. diaptomi* era menor do que aquelas coletadas no inverno em *Metadiaptomus transvaalensis* (WEST *et al.*, 2016). Polimorfismos destes protozoários não

são amplamente documentados nos trabalhos, o que pode dificultar trabalhos de inventários e a correta identificação taxonômica.

BASSON & VAN AS (1991), conforme relatado anteriormente, observaram o decréscimo de tricodinídeos sobre os hospedeiros ao longo dos dias em que foram mantidas em cultivos laboratoriais. Os autores afirmaram que os mesmos tricodinídeos encontrados em copépodos *Metadiaptomus meridianus* não se estabeleceram em larvas da espécie *Clarias gariepinus*. Nós acreditamos que isso possa ser devido a perturbações no ambiente, ocasionadas pela manipulação dos hospedeiros, pois houve decréscimo nas populações, não só nas larvas, mas também nas associadas ao copépodo *Metadiaptomus meridianus* e até mesmo nas populações de *Trichodina marintikae*, espécie a qual estava parasitando o peixe *C. gariepinus*. Algo similar foi observado em nosso estudo. Quando conduzimos as amostras de copépodos para o laboratório em frascos arejados, após 15 h de manutenção em condições laboratoriais, não havia mais tricodinídeos sobre os copépodos.

Dessa forma, chegamos à conclusão de que os tricodinídeos são sensíveis a perturbações na manipulação de seu meio, seja por interferências em condições bióticas ou abióticas. Nós não verificamos o que ocasionou o desaparecimento desses ciliados. Assim levantamos a hipótese de que as populações do estudo africano declinaram devido as perturbações que foram causadas, as vezes pelo simples fato de se manipular o seu hospedeiro, desta forma, não se pode afirmar que *T. diaptomi* não se estabeleça em hospedeiros não copépodos. Poucos são os registros de tricodinídeos no mundo, desta forma, não há trabalhos suficientes que afirmem a especificidade por hospedeiros por *T. diaptomi*. Ainda, esse foi o primeiro trabalho conduzido no Brasil, que além de amostrar uma nova região no país trouxe a caracterização molecular dessa espécie, e surpreendentemente quebrou o paradigma que se pensava até então que *T. diaptomi* só ocorria em copépodos calanoides.

CONCLUSÃO

Atualmente os trabalhos com tricodinídeos em peixes vem crescendo exponencialmente devido a sua importância econômica. Já trabalhos com outros grupos são escassos. Poucos são os trabalhos taxonômicos desses ciliados no mundo. Estudo mostra a quebra do paradigma que era predominante de que *T. diaptomi* não ocorria em hospedeiros não copépodos. Ainda, aponta que o hospedeiro mais que o ambiente é que possui grande influência na distribuição dos tricodinídeos, porém mais sequências destes ciliados devem ser adicionadas nas inferências filogenéticas para suportar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

- ASMAT, G. S. M. First record of *Trichodina diaptomi* (Dogiel, 1940) Basson and Van As, 1991, *T. heterodentata* Duncan, 1977 and *T. oligocotti* (Lom, 1970) (Ciliophora: Trichodinidae) from Indian fishes. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, p. 2066–2071, 2004.
- BASSON, L; & VAN, AS J. G. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichia) from a calanoid copepod and catfish from South Africa with notes on host specificity. **Systematic Parasitology**, v. 18, p. 147–158, 1991.
- BASSON, L; VAN AS, J. Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora) in P T K Woo (ed.): **Fish diseases and disorders**, v. 1, cap. 2, p. 154-180, 2006.
- CEDROLA, F; SENRA, M.V.X; D'AGOSTO, M; DIAS, R.J.P. Phylogenetic analyses support validity of genus *Eodinium* (Ciliophora, Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49(6), p. 242–247, 2017.
- CHEN, CHIH-LEU. Studies on ectoparasitic trichodinids from fresh-water fish, tadpole and crustacean in China. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 3, p. 99-111, 1963.
- CLAMP, J.C; & COATS, D.W. *Planeticovorticella finleyi* n.g., n.sp. (Peritrichia, Vorticellidae), a planktonic ciliate with a polymorphic life cycle. **Invertebrate Biology**, v. 119(1), p. 1-16, 2000.
- DA SILVA, W.M; ROCHE, K.F; DE VICENTE, F.S; DELBEN, A.A.S.T. First record of Peritricha *Trichodina diaptomi* Basson and Van As, 1991 (Protozoa: Ciliophora) on a South American Calanoid *Notodiaptomus deitersi* (Poppe, 1890) (Crustacea: Copepoda **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 385, 2009.
- DARRIBA, D; TABOADA, G. L; DOALLO, R; POSADA, D. jModel-Test 2: moremodels, new heuristic and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.
- DIAS, R.J.P; FERNANDES, N.M; SARTINI, B; SILVA-NETO, I.D; D'AGOSTO, M. Occurrence of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora:Trichodinidae) infesting tadpoles of *Rhinella pombali* (Anura: Bufonidae) in the Neotropical area. **Parasitology International**, v. 58 p.471–474, 2009.
- EVANS, J.J; KLESIOUS, P.H; PASNIK, D.J; SHOEMAKER, C.A. Influence of natural *Trichodina* sp. parasitism on experimental *Streptococcus iniae* or *Streptococcus agalactiae* infection and survival of young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 38, p. 664-667, 2007.
- EKANEM, D.A; & OBLEKEZIE, A.I. Growth reduction in African catfish fry infected with

- Trichodina maritinkae* Basson & Van as, 1991 (Ciliophora: Peritrichida). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.11, p. 91–96, 1996.
- FOISSNER, W. An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa’. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 1, p. 271-292, 2014.
- GAZE, W.H; & WOOTTEN, R. Ectoparasitic species of the genus *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) parasitizing British freshwater fish. **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 177-190, 1998.
- GHIRALDELLI, L; MARTINS, M.L; ADAMANTE, W.B; YAMASHITA, M.M. First record of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from cultured Nile tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Zoological Research**, v. 2(4), p. 369-375, 2006.
- GUINDON, S; & GASCUEL, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696–704, 2003.
- GUINDON, S; DUFAYARD, J. F; LEFORT, V; *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, p. 307–321, 2010.
- GONG, Y; YU, Y; VILLALOBO, E; ZHU, F. MIAO, W. Reevaluation of phylogenetic relationship between Mobilid and Sessilid Peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53(5), p. 397-403, 2006.
- HERMAN, S. & MIHURSKY, J. Infestation of the Copepod *Acartia tonsa* with the Stalked Ciliate *Zoothamnium*. **Science**, v. 146, p. 543-544, 1964.
- IRWIN, N.A; SABETRASEKH, M; LYNN, D.H. Diversification and Phylogenetics of Mobilid Peritrichs (Ciliophora) with description of *Urceolaria parakorschelti* sp. nov. **Protist** v. 168, p.481–493, 2017.
- KATTAR, M.R. Sobre *Trichodina steini* Claparède and Lachmann (Protozoa, Urceolariidae) encontrada em girino de *Bufo Ictericus* do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 35(2), p. 253-258, 1975.
- KLEIN, B.M. The “*seca*” silver method and its proper use. **Journal of Protozoology**, v. 5, p.99–103, 1958.
- KOSAKYAN, A; LAHR, D.J.G; MULOT, M; MEISTERFELD, R; MITCHELL, E.A.D; LARA, E. Phylogenetic reconstruction based on COI reshuffles the taxonomy of hyalosphenid shelled (testate) amoebae and reveals the convoluted evolution of shell

- plateshapes. **Cladistics** 32: 1–18, 2016.
- LOM J. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics. **Journal of Protozoology**, v. 5, p.251–263, 1958.
- LEMONS, M; FERMINO, B.R; SIMAS-RODRIGUES, C; HOFFMAN, L; SILVA, R; CAMARGO, E.P; TEIXEIRA, M.G; PADRÓN, T.S. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armored catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 573–583, 2015
- LOGARES, R; RENGEFORS, K; KREMP, A; SHALCHIAN-TABRIZI, K; BOLTOVSKOY, A; TENGS, T; SHURTLEFF, A; KLAVENESS, D. Phenotypically different microalgal morphospecies with identical ribosomal DNA: a case of rapid evolution? **Microbial Ecology**, v.53, p.549–561, 2007.
- LOM, J. *Trichodina reticulata* Hirschmann and Partsch 1955 from crucian carp, and *T. domerguei* f. *latispina* Dogel 1940 from *Diaptomus*. **Věst. Čs. společ. Zool**, v.24, p. 246-257, 1960.
- LUDWIG, W; STRUNK, O; WESTRAM, R.; *et al.*, ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acid Research**, v. 32, p. 1363–1371, 2004.
- MACIEL, P.O; GARCIA, F; CHAGAS, E.C; FUJIMOTO, R.Y; TAVARES-DIAS, M. Trichodinidae in comercial fish in South America. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 28 (1), p. 33–56, 2017.
- MARCOTEGUI, P. S; MONTES, M.M; BARNECHE, J; FERRARI, W; MARTORELLI, S. Geometric morphometric on a new species of Trichodinidae. A tool to discriminate trichodinid species combined with traditional morphology and molecular analysis. **Parasites and Wildlife**, v. 7, p. 228- 236, 2018.
- MARTINS, M.L; & GHIRALDELLI, L. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68(1), p. 169-172, 2008.
- MARTINS, M.L; AZEVEDO, T.O.M; GHIRALDELLI, L; BERNARDI, N. Can the parasitic fauna on Nile tilapias be affected by different production systems? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 493–500, 2010.
- MEDLIN, L; ELWOOD, H.J; STICKEL, S; & SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v. 71, p. 491- 499, 1988.

- MITRA, A.K; BANDYOPADHYAY, P.K; GONG Y. Studies on Trichodinid and Chilodonellid Ciliophorans (Protozoa: Ciliophora) in the Indian freshwater and estuarine fishes with description of *Trichodinella sunderbanensis* sp. nov. and *Trichodina nandusi* sp. nov. **Parasitology Research**, v. 112 (3), p. 1077–1085, 2013.
- OLIVEIRA, L; CEDROLA, F; SENRA, M.V.X; SCOPEL, K.K.G; MARTINELE, I; TOSTES, R; DIAS, R.J.P; D’AGOSTO, M. Polymorphism evidence in *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* isolated from Brazilian wild birds. **Parasitology International**, v.70, p. 70-76, 2019.
- PINTO, H.A; WIELOCH, A.H; MELO, A.L. Uma nova espécie de *Trichodina* Ehrenberg, 1838 (Ciliophora: Trichodinidae) em *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864) (Mollusca: Planorbidae). **Lundiana**, v. 7, p.121–124, 2006.
- PRUESSE, E; QUAST, C.; KNITTEL, K; FUCHS, B. M; LUDWIG, W.; PERPLIES, J.; GLÖCKNER F. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acid Research**, v.35, p. 7188–7196, 2007.
- RONQUIST, F; TESLENKO, M; DER VAN MARK, P.; AYRES, D.L; DARLING, A; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.
- SILVA-BRIANO M, SUÁREZ-MORALES E, ADABACHE ORTIZ A, REYES-FLORES M. Two species of *Mastigodiatomus* (Copepoda: Diaptomidae), hosts of the epibiotic ciliate *Trichodina diaptomi* (Peritricha) in North America. **Journal of Limnology**, v. 70, p. 329–333, 2011.
- TANG, F. H; ZHAO, Y. J; & WARREN, A. Phylogenetic analyses of trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophora) inferred from 18S rRNA gene sequence data. **Current Microbiology**, v. 66(3), p.306-313, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; PÁDUA, S.B; GALLANI, S.U; MENEZES-FILHO, R.N; DIAS-NETO, J; MARTINS, M.L; ISHIKAWA, M.M; PILARSKI, F. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. **Veterinary Parasitology**, v. 197 p.705–710, 2013.
- VALLADÃO, G.M.R; GALLANI, S.U; PÁDUA, S.B; MARTINS, M.L; PILARSKI, F. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. **Parasitology**, v. 141, p. 662–669, 2014.
- VALLADÃO, G.M.R; ALVES, L.O; PILARSKI, F. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries:

- diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. **Aquaculture**, v. 451, p.444–450, 2016.
- VAN AS, J.G; & BASSON, L. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids. **Systematic Parasitology**, v.14, p.157–179, 1989.
- XU, K; SONG, W; & WARREN, A. Observations on trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichia) from the gills of maricultured molluscs in China, with descriptions of three new species of *Trichodina* Ehrenberg, 1838. **Systematic Parasitology**, v. 45(1), p. 17-24, 2000.
- WANG, Z; ZHOU, T; GU, Z. New data of two trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Trichodinidae) from farmed freshwater fishes in Hubei, China. **European Journal of Protistology**, v.60, p. 50–59, 2017.
- WEST, D; BASSON, L; VAN AS J. *Trichodina diaptomi* (Ciliophora: Peritrichia) from two calanoid copepods from Botswana and South Africa, with notes on its life history. **Acta Protozoologica**, v. 55, p. 161–171, 2016.
- ZHAN, Z; XU, K; WARREN, A; & GONG, Y. Reconsideration of phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences, with the establishment of a new subclass Mobilia Kahl, 1933. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56(6), p. 552-558, 2009.

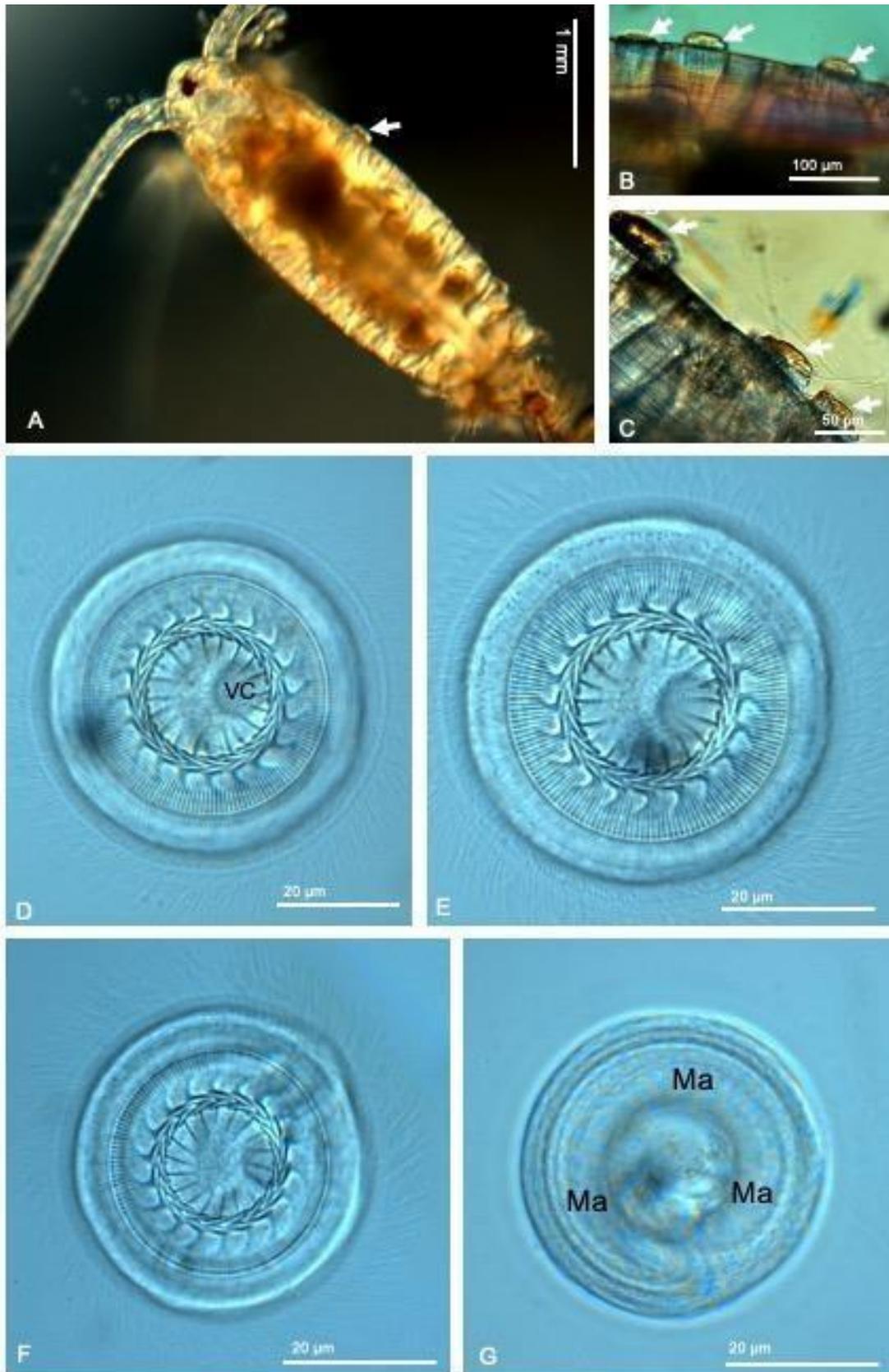


Figura 1. Tricodinídeos da espécie *Trichodina diaptomi* in vivo. A-C: Tricodinídeos sobre o hospedeiro copépedo, sinalizados por seta. D-G: Tricodinídeos in vivo com as estruturas que compõem seu corpo evidenciadas. VC: vacúolo contrátil, Ma: macronúcleo. Barras: 20µm.

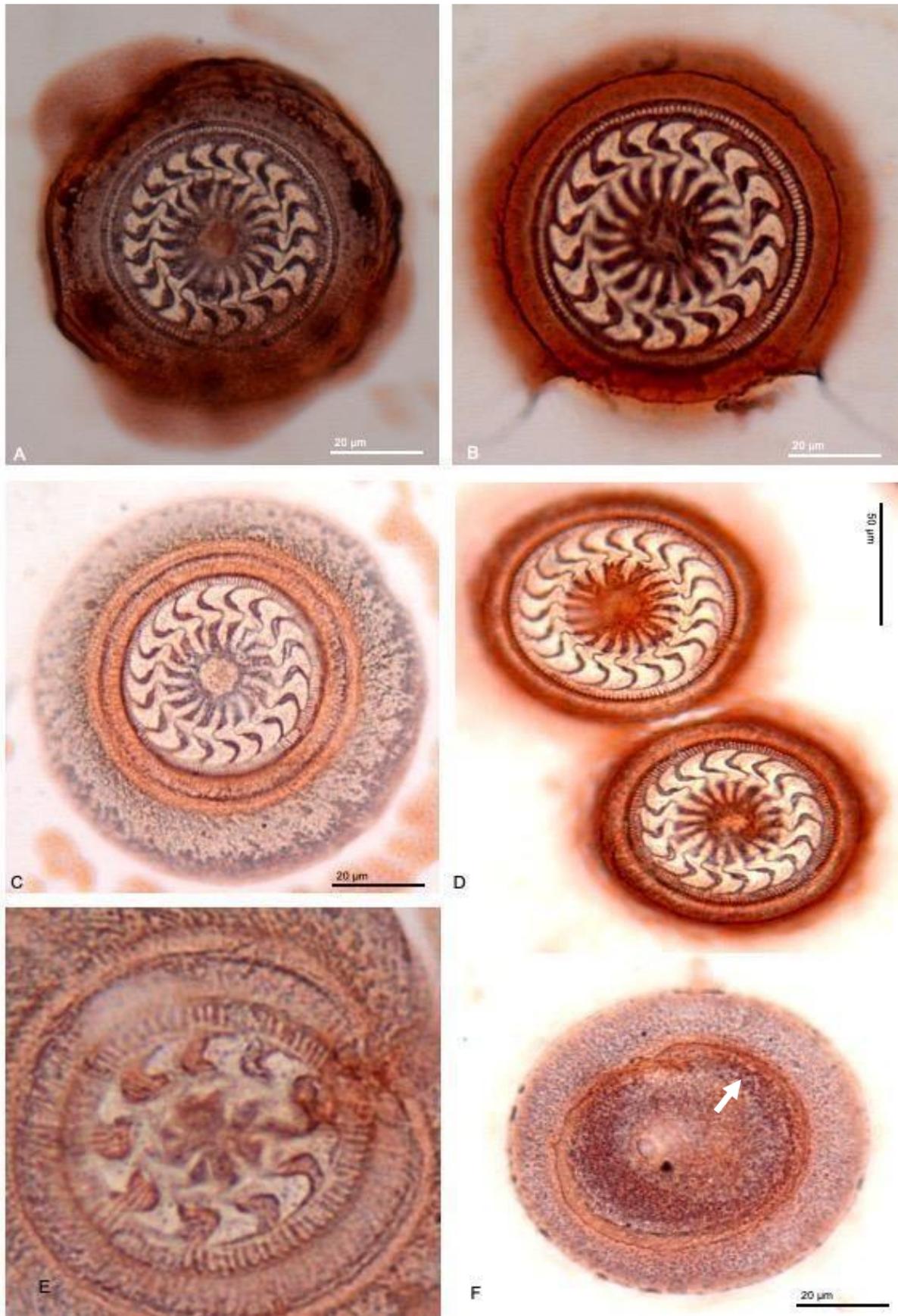


Figura 2. Espécimes de *Trichodina diaptomi* impregnados por nitrato de prata. D-E: Morfogênese. F: seta evidenciando a ciliatura adoral. Barras: 20 e 50 (D) µm.

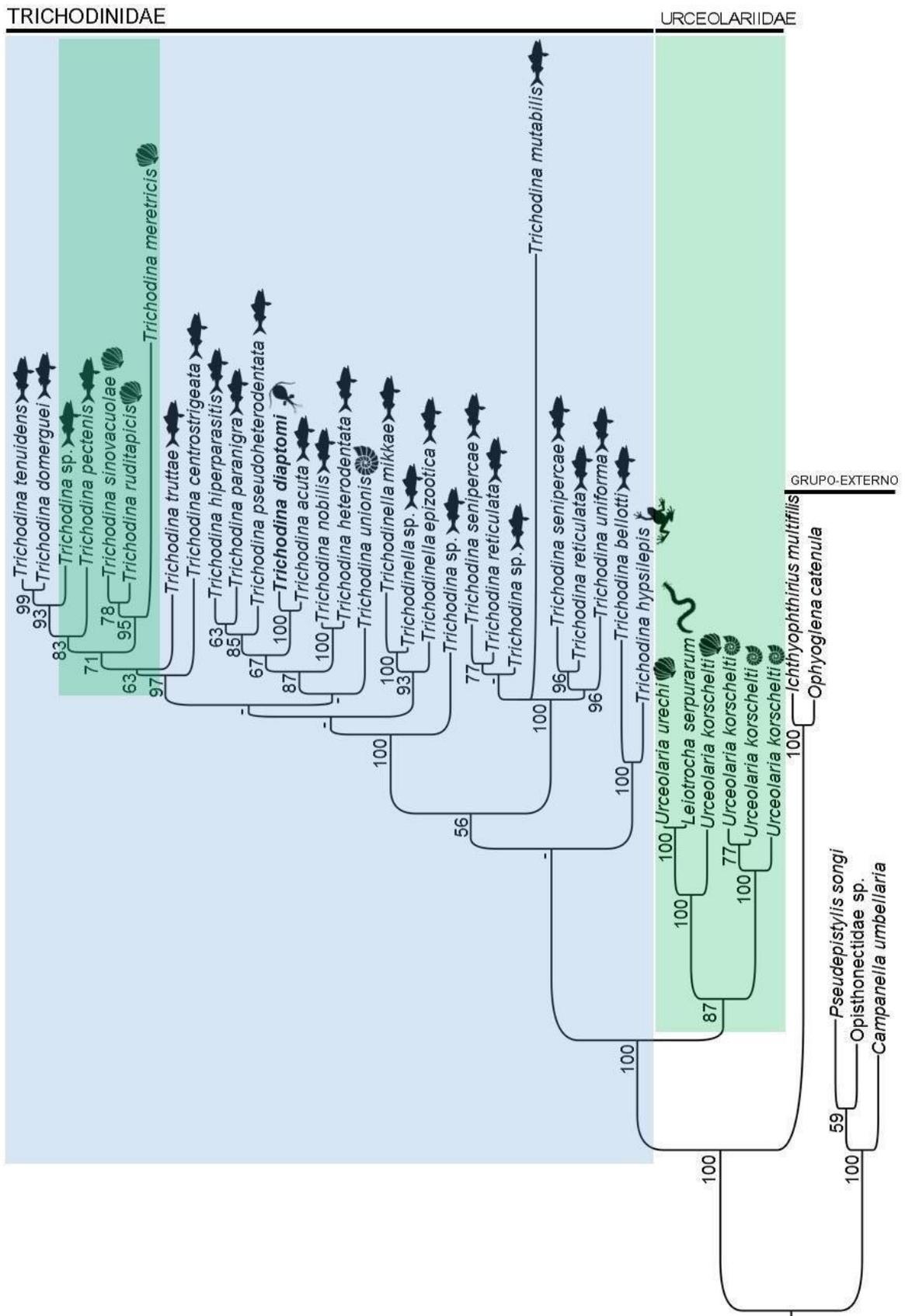


Figura 3. Árvore filogenética inferida com base em seqüências do gene 18SrRNA da ordem Mobilida, famílias Trichodinidae e Urceolariidae, recuperadas pela análise de Máxima Verossimilhança (ML). Os retângulos azuis representam seqüências de mobilídeos límnicos e os verdes de mobilídeos marinhos. Em frente a cada ramo/espécie estão representados os hospedeiros. Em negrito a nova seqüência de *T. diaptomi*.

Tabela 1: Dados morfométricos (em μm) de populações de *Trichodina diaptomi* em diferentes localidades.

Espécies de tricodíneos	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. diaptomi</i>	<i>T. acuta</i> (?)	<i>T. diaptomi</i>
Hospedeiro	<i>Metadiaptomus meridianus</i>	<i>Boeckella fluvialis</i>	<i>Notodiaptomus deitersi</i>	<i>Metadiaptomus albuquerquensis</i>	<i>Metadiaptomus transvaalensis</i>	<i>Metadiaptomus meridianus</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	<i>Notodiaptomus</i>
Localidade	África do Sul	Austrália	Mato Grosso do Sul, Brasil	México	Botswana	África do Sul		Minas Gerais, Brasil
Referência	Basson & Van As (1991)	Green & Shiel (2000)	Da Silva et al. (2009)	Silva-Briano et al. (2011)	West et al. (2016)	West et al. (2016)	Wang et al. (2017)	Presente estudo
D. corporal.	33.8-48.7 (41.5)	35.3-49.6 (43.6)	(38.3 \pm 4.2)	38.1-44.6 (40.4)	40.3-53.7 (45.9 \pm 2.9)	37.1-45.9 (41.3 \pm 2.2)	43.6-62.9 (53.1 \pm 4.5)	34.5-46.3 (42.7 \pm 2.9)
D.d. adesivo.	27.9-39.9 (33.8)	30.2-42.6 (35.9)	(31.5 \pm 3.1)	29.3-39.8 (34.5)	31.9-43.5 (36.9 \pm 2.5)	28.3-38.8 (33.1 \pm 2.3)	35.6-49.6 (43.2 \pm 3.9)	29.1-38.2 (42.7 \pm 2.6)
L. b. membrana.	2.6-5.4 (4.0)	1.8-4.8 (3.6)	-	2.6-3.8 (3.0)	3.5-4.9 (4.3 \pm 0.3)	3.4-5.1 (4.1 \pm 0.4)	3.9-6.3 (4.8 \pm 0.5)	3-4.5 (3.6 \pm 0.4)
D.a.denticular.	14.8-22.6 (19.6)	14.7-39.1 (20.1)	-	18.1-22.8 (19.8)	16.3-24.6 (21.1 \pm 1.9)	15.0-20.2 (18.1 \pm 1.4)	23.2-32.8 (27.0 \pm 2.3)	15-20.7(18.8 \pm 1.4)
D.c.c	4.4-7.9 (5.9)	-	-		5.2-9 (6.8 \pm 0.9)	3.7-6.3 (5.0 \pm 0.6)	-	3.8-7.8(7.8 \pm 1.2)
Nº dent.	15-20	15-19 (17)	18-20 (19)	20-24 (22)	17-21 (18)	16-22 (18)	17-20	16-20 (19)
P. radiais.	7-11 (9)	5-9 (9)	8-10 (-)	8-11 (9)	8-10 (9)	8-11 (10)	9-13	7-14 (12)
Comp. dent.	4.8-7.7 (6.2)	4.4-7.6 (6.2)	-	5.7-6.9 (6.3)	5.2-7.4 (6.3 \pm 0.6)	4.1-7.2 (5.5 \pm 0.6)	5.7-9.6 (6.9 \pm 0.9)	3.1-7.3 (5.8 \pm 0.9)
Comp. Lãm.	2.9-6.9 (3.8)	3.4-5.7 (4.4)	-		3.2-4.8 (4.2 \pm 0.4)	2.7-4.7 (3.5 \pm 0.4)	4.0-5.7 (5.0 \pm 0.5)	3.1-4.8 (4 \pm 0.4)
L. p.c	1.4-2.7 (2.0)	1.2-2.9 (2.0)	-		1.9-3.1 (2.4 \pm 0.3)	1.6-2.7 (2.2 \pm 0.3)	2.2-3.6 (2.8 \pm 0.3)	1.5-3 (2.4 \pm 0.3)
Comp. raio	2.8-6.1 (4.4)	3.8-6.4 (4.9)	-	4.8-6.2 (5.72)	3.4-6.7 (5.0 \pm 0.6)	3.5-6.0 (4.6 \pm 0.6)	4.9-7.2 (6.1 \pm 0.6)	3-5 (4.1 \pm 0.5)
Span dent.	-	-	-		9.8-12.9 (11.4 \pm 0.8)	9.2-12.5 (10.4 \pm 0.8)	11.7-16.2 (13.6 \pm 1.2)	8.2-11.7 (10.1 \pm 0.8)

D. corporal: Diâmetro corporal, D.d.adesivo: Diâmetro do disco adesivo, L.b. membrana: Largura da borda da membrana, D.a.denticular: Diâmetro do anel denticular, D.c.c: Diâmetro do círculo central, Nº dent.: Número de denticulos, P. radiais: Pinos radiais, Comp. dent.: Comprimento do denticulo, Comp. Lãm.: Comprimento da lâmina, L.p.c.: Largura da parte dental, Comp. raio: Comprimento do raio, *Span dent.*: Espaço entre os denticulos.