

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

TIAGO MILANIN

**TAXONOMIA MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
MYXOSPOREA PARASITO DE *BRYCON HILARII*,
ORIUNDO DO PANTANAL MATOGROSSENSE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TIAGO MILANIN
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação a ser apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), como requisito final à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

ORIENTADOR: PROF. Dr. EDSON APARECIDO ADRIANO

Campinas

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M589t

Milanin, Tiago

Taxonomia morfológica e molecular de *Myxosporea* parasito de *Brycon hilarii*, oriundo do Pantanal Matogrossense / Tiago Milanin. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Edson Aparecido Adriano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Myxozoa. 2. Myxosporea. 3. *Myxobolus*. 4. *Brycon hilarii*. 5. Pantanal Matogrossense (MS e MT). I. Adriano, Edson Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Morphological and molecular taxonomy of *Myxosporea* parasite of *Brycon hilarii* from Pantanal Matogrossense.

Palavras-chave em inglês: Myxozoa; Myxosporea; *Myxobolus*; *Brycon hilarii*; Pantanal Matogrossense (MS e MT).

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Edson Aparecido Adriano, Marlene Tiduko Ueta, Marcus Vinicius Domingues.

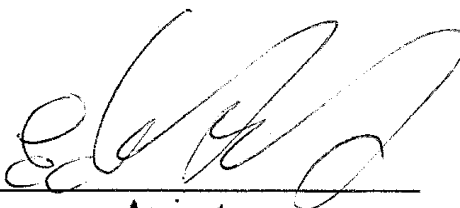
Data da defesa: 28/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 28 de janeiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

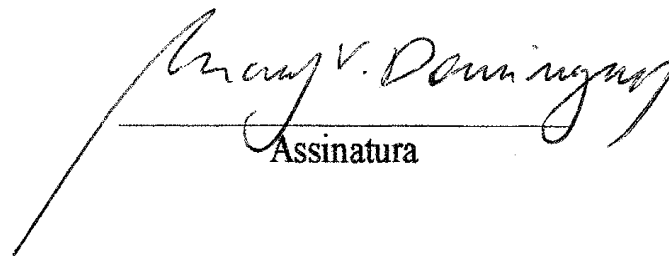
Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

Prof. Dr. Marcus Vinicius Domingues


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada: **TAXONOMIA MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE MYXOSPOREA PARASITO DE *BRYCON HILARII*, ORIUNDO DO PANTANAL MATOGROSSENSE**

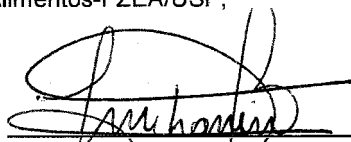
() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

_____, sob Protocolo(s) nº _____.

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Obs.: O projeto acima citado está vinculado ao Projeto Jovem Pesquisador Fapesp proc.: Nº 2006/59075-6 intitulado "Mixosporídeos parasitos de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma fasciatum* (cachara), *Salminus brasiliensis* (dourado) e *Brycon hilarii* (piraputanga) oriundos de ambiente natural e de sistemas de criação: taxonomia e interação parasito-hospedeiro", o qual recebeu parecer favorável da Comissão de Ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP,



Aluno:



Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Ofereço a Deus, que move todas as coisas...

Dedico a meus pais, Laurindo e Milza,
pelo amor, confiança e por todos os
esforços imensuráveis para que eu
chegasse até aqui.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Edson Aparecido Adriano pela orientação, apoio e incentivo, sem o qual este trabalho não seria possível.

Aos Professores que fizeram parte da defesa prévia deste trabalho, Profa. Dra. Bianca Barassa, Prof. Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares, Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen e Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pela análise e alterações sugeridas.

Aos demais professores do curso de parasitologia da UNICAMP, por todo o conhecimento que compartilharam durante as disciplinas administradas.

À Professora Daniele de Oliveira Mestre e amiga, pelos primeiros ensinamentos na área de Parasitologia, exemplo de docência e amizade.

Aos colegas do curso de parasitologia, em especial a Juliana Naldoni, Letícia Aparecida Duarte Bastos, Thaís Marchi Goulart, Laila Silva Leonel de Ávila, Maicon Diego Grella, Davi Lima de Moraes e Antonio de Lima Barros Júnior, pela amizade e apoio durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, pelo espaço fornecido no laboratório de parasitologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP em Pirassununga, permitindo o processamento do material coletado.

À Mateus Maldonado Carriero e a Dra Márcia Ramos Monteiro Silva, pela amizade, incentivo, e principalmente pela ajuda nos procedimentos laboratoriais, sem a qual este trabalho não seria possível.

Ao diretor do CEPTA do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de peixes Continentais – CEPTA, vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO, Dr. Laerte Batista de Oliveira Alves, pelo apoio logístico durante as coletas de Campo.

Aos funcionários do CEPTA, Dr. Paulo Sérgio Ceccarelli que muito colaborou na concepção do projeto e no desenvolvimento dos trabalhos de campo, e ao auxiliar de pesquisa Ricardo Afonso Torres de Oliveira, pelo auxílio nos trabalhos de necropsia dos peixes.

À minha prima Roseli Azevedo, pelo incentivo, paciência e amizade sincera.

Ao meu tio Prof. Carlos Souza Azevedo, pelo incentivo, correções e prontidão em todos os momentos.

Encontrar uma meta e manter o passo firme em direção às coisas que estão no alto é próprio daqueles que sabem superar os desafios e que não se deixam abater diante das dificuldades.

Pe. Léo, 2009

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	10
OBJETIVOS	10
OBJETIVO GERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS	12
PHYLOGENY, ULTRASTRUCTURE, HISTOPATHOLOGY AND PREVALENCE OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV., A PARASITE OF <i>BRYCON HILARII</i> (CHARACIDAE) IN THE PANTANAL WETLAND, BRAZIL	13
ABSTRACT	13
INTRODUCTION	14
MATERIALS AND METHODS	15
RESULTS	17
DISCUSSION	26
ACKNOWLEDGEMENTS	30
REFERENCES	31
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E DELIMITAÇÕES DAS SUB-REGIÕES DO PANTANAL MATOGROSSENSE.....	3
---	---

RESULTADOS

FIGURA 2 - PIRAPUTANGA (<i>BRYCON HILARII</i>).....	12
---	----

PHYLOGENY, ULTRASTRUCTURE, HISTOPATHOLOGY AND PREVALENCE OF *MYXOBOLUS OLIVEIRAI* SP. NOV., A PARASITE OF *BRYCON HILARII* (CHARACIDAE) IN THE PANTANAL WETLAND, BRAZIL

RESULTS

FIGURA 1 - LIGHT PHOTOMICROGRAPHS OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV.....	20
--	----

FIGURA 2 - LIGHT PHOTOMICROGRAPHS OF HISTOLOGICAL SECTION OF GILL FILAMENTS OF <i>BRYCON HILARII</i>	21
--	----

FIGURA 3 - ELECTRON MICROGRAPHS OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV. PARASITE OF GILL FILAMENTS IN <i>BRYCON HILARII</i>	22
--	----

FIGURA 4 - ELECTRON MICROGRAPHS OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV. PARASITE OF GILL FILAMENTS IN <i>BRYCON HILARII</i>	23
--	----

FIGURA 5 - SCHEMATIC REPRESENTATION OF MATURE SPORES OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV.....	24
---	----

FIGURA 6 - PHYLOGENETIC TREE	25
------------------------------------	----

TABLE 1 – PAIRWISE DISTANCES BASED ON 1.527-BP FRAGMENTS OF THE 18S rRNA GENE OF <i>MYXOBOLUS OLIVEIRAI</i> SP. NOV.....	26
--	----

RESUMO

Parasitos do filo Myxozoa (Grassé, 1970) estão entre os patógenos de peixes mais importantes e têm sido objeto de muitos estudos nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver estudos taxonômicos (baseado em análises morfológicas e moleculares), da interação parasito-hospedeiro (com base nas análises histológicas e ultra-estruturais) e filogenéticos de mixosporídios parasitos de *Brycon hilarii* oriundos de ambiente natural e sistemas de criação. Os peixes de ambiente natural foram obtidos no Pantanal Matogrossense e os de sistemas de criação em pisciculturas do Estado de São Paulo. Uma nova espécie de *Myxobolus* (*Myxobolus oliveirai*) foi descrita infectando os filamentos braquiais de *B. hilarii* oriundos de ambiente natural, mas não foi observada a ocorrência deste parasito nos sistemas de criação avaliados. Dos 216 espécimes de *B. hilarii* examinados (126 silvestres e 90 cultivadas), 38,1% dos espécimes selvagens ($n = 48$) estavam infectados. O parasito formou plasmódios alongados, cerca de 3 mm de comprimento, principalmente na ponta dos filamentos branquiais. Foi realizada a comparação morfológica de *M. oliveirai* com todas as espécies de *Myxobolus* descritas infectando hospedeiros da América do Sul, assim como praticamente todas as espécies até agora descritas considerando todos os continentes. O sequenciamento parcial do gene 18S rDNA revelou que as sequências obtidas do *Myxobolus* parasito de *B. hilarii* não corresponde a nenhum dos Myxozoa disponíveis no GenBank. Na análise filogenética, *M. oliveirai* constituiu um grupo monofilético com outras oito espécies: cinco espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes mugilídeos, duas espécies parasitos de pangasiídeos e uma parasito de Centrarchídeo. Os valores das prevalências da infecção não revelaram diferenças significativas entre as estações seca e úmida nem entre hospedeiros machos e fêmeas.

Palavras-chaves: Myxozoa, *Brycon hilarii*, ambiente natural, filogenéticos, Brasil.

ABSTRACT

Parasites of the phylum Myxozoa (Grassé, 1970) are among the most important pathogens of fish and have been subject of many studies in recent years. The aim of this study was to develop taxonomic studies (based on morphological and molecular), of the parasite-host interaction (based on histological and ultrastructural analysis) and phylogenetic of myxosporean parasites of *Brycon hilarii* from natural environment and fish farms. The fish were obtained from natural environment in the Mato Grosso wetlands Brazil and fish farms in the state of São Paulo. A new species of *Myxobolus* (*Myxobolus oliveirai*) was described infecting the brachial filaments of *B. hilarii* from the natural environment, but did not observe the occurrence of this parasite in fish farms evaluated. Out of 216 *B. hilarii* specimens examined (126 wild and 90 cultivated), 38.1% of wild specimens (n = 48) were infected. The parasites form elongated plasmodia primarily in the tip of gill filaments, reaching about 3 mm in length. A thorough comparison with all the *Myxobolus* species described from South American hosts, as well as nearly all the *Myxobolus* species described so far is provided. Partial sequencing of the 18S rDNA gene revealed that the *Myxobolus* species parasite of *B. hilarii* did not match any of the Myxozoa available in GenBank. In the phylogenetic analysis, *M. oliveirai* sp. nov. composed a monophyletic group with eight other species: five species of *Myxobolus* parasites of mugilid fishes, two parasites of pangasiid and one of centrarchid. Infection prevalence values of the parasite revealed no significant differences between wet and dry seasons or between males and females.

Keywords: Myxozoa, *Brycon hilarii*, natural environment, phylogenetic, Brazil.

INTRODUÇÃO

Os peixes se distribuem em 27.977 espécies, o que representa mais de 50% de todas as espécies de vertebrados conhecidos (Nelson, 2006) sendo que 58% dessas espécies vivem em água salgada, 41% em água doce e cerca de 1% migra regularmente entre os dois sistemas (Cohen, 1970; McDowell, 1997; Lundberg et al., 2000). A grande diversidade de peixes se encontra na água doce, que representa apenas 0,01% de toda água do planeta.

A zona de maior diversidade de peixes de água doce do mundo é a região neotropical. Nas Américas do Sul e Central são conhecidas mais de 5.000 espécies (Lundberg et al., 2000) e há uma perspectiva de que esse número possa atingir por volta de 8.000 (Vari e Malabarba, 1998). A diversidade também é notadamente grande na Ásia tropical e África, ambas com cerca de 3.000 espécies (Lundberg et al., 2000).

O Brasil apresenta uma riqueza incomparável de espécies de peixes. Aqui são encontradas espécies das mais variadas formas e tamanhos, e muitas destas com potencial de uso nas diferentes atividades relacionadas à piscicultura (produção de pescado para suprir a demanda de alimentos), pesca esportiva e ornamentação (Böhlke et al., 1978).

A produção aquícola brasileira, de uma forma geral, vem aumentando em geração de divisas. No ano de 2007, a produção de pescado (pesca extrativista marinha, pesca extrativista continental, maricultura e aquicultura continental) foi de 1.072.226 t, correspondendo a um montante que supera os três bilhões de reais. Nesse contexto, a aquicultura (basicamente piscicultura) e a pesca extrativista continental representam respectivamente 19,6% e 22,2% de toda a produção de pescado brasileira, com 210.644,5 t para a primeira e 243.210 t para a segunda. Assim, cerca de 40% da produção de pescado brasileira é oriunda de água doce, e estas atividades possibilitaram no ano de 2007 a movimentação de R\$ 1.545.124.700,00 na economia brasileira (IBAMA, 2009).

De acordo com o IBGE (2004), o Brasil apresenta 10 grandes bacias hidrográficas e entre elas encontra-se a Bacia do rio da Prata, dividida em três sub-bacias: Paraná, Uruguai e Paraguai. Na sub-bacia do rio Paraguai encontra-se o Pantanal Matogrossense, uma planície sedimentar com cerca de 140.000 km² formada no

período quaternário, preenchida com depósitos aluviais dos rios da Bacia do Alto Paraguai (Silva et al., 2000). Esta é a maior planície alagada do mundo e com seu ciclo particular de águas torna-se um bioma singular (Mateus et al., 2004 Ceccareli et al., 2007), onde localiza-se pequenos e grandes rios como o Paraguai (o maior), Cuiabá, São Lourenço, Aquidauana, Taquari, Miranda entre outros (Fig. 1), que devido à baixa declividade tem o escoamento de suas águas dificultadas, possibilitando a formação de grandes áreas alagadas e o aparecimento de ambientes característicos (Silva, 2000). Nesses ambientes encontra-se uma grande diversidade de peixes, com aproximadamente 264 espécies conhecidas (Britiski, 2006; Buckup et al., 2007), dentre as quais destaca-se a piraputanga, *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) (Sin. *Brycon microlepis* Perugia, 1897), que é um caracídeo endêmico da bacia do alto Paraguai (Resende 2003).

A piraputanga é um peixe de escamas, corpo alongado e um pouco comprimido. Logo que retirado da água apresenta cor amarelada, a nadadeira caudal é vermelha, com uma faixa preta que começa no pedúnculo caudal e chega até os raios centrais. As demais nadadeiras são alaranjadas. As escamas do dorso são claras no centro, com as bordas escuras. A piraputanga apresenta ainda uma mancha umeral escura e arredondada e alcança cerca de 50 cm de comprimento total e 2,5kg sendo que indivíduos acima deste peso são raros (Ceccarelli et al., 2007). É um peixe muito apreciado nos restaurantes da região Centro Oeste do Brasil (especialmente nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do sul) (Resende, 2003) e recentemente tem sido criado em pisciculturas de várias regiões do Brasil, atingindo uma produção de 633,000 kg no ano de 2006 (IBAMA 2008).

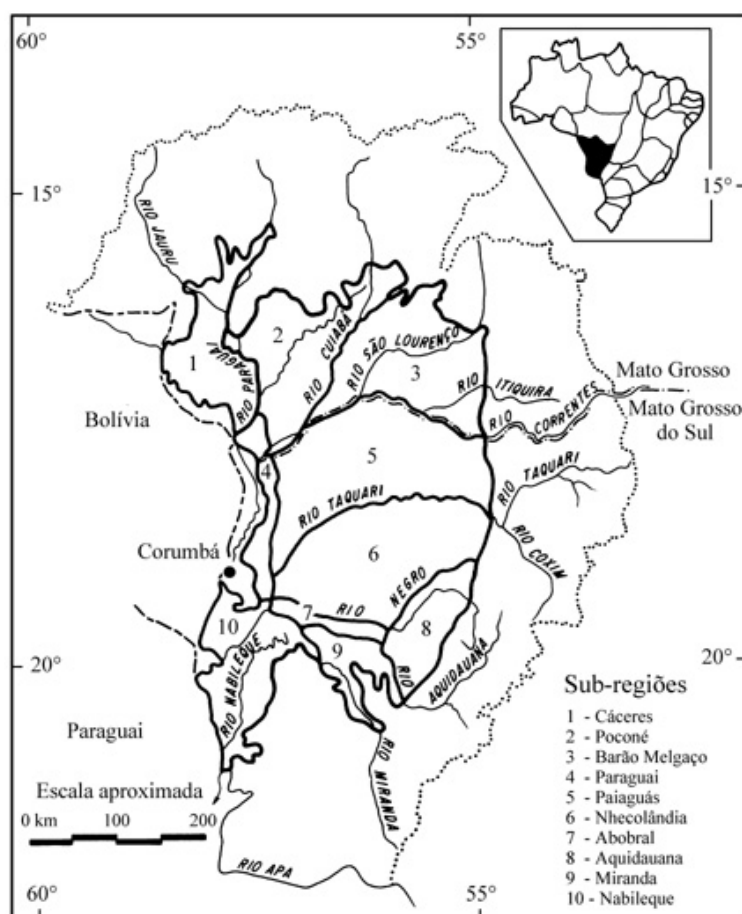


Fig. 1. Localização geográfica e delimitações das sub-regiões do Pantanal Matogrossense, adaptado de Silva et al. (2000).

Tanto em ambiente natural quanto em sistemas de criação, os peixes estão expostos a vários agentes patogênicos, que podem produzir danos importantes ao hospedeiro (Eiras et al., 2008, Feist, Langdom e Longshaw, 2006). O avanço da aquicultura nas últimas décadas tem resultado em uma maior atenção voltada para os problemas ocasionados por parasitos, os quais podem interferir na produtividade (Kennedy, 1994). Além das perdas causadas pela mortalidade, os parasitos também influenciam no crescimento e comportamento dos peixes, interferem na sua resistência a fatores estressantes, na suscetibilidade a infecções bacterianas, à ação de predadores, e adicionalmente a simples presença pode reduzir o valor comercial do produto (Crowden e Boom, 1980; Brassard et al., 1982; Lom e Dyková, 1992; Williams e Jones, 1994; Kumaraguru et al., 1995; Woo, 1995).

Dentre os parasitos de peixes, aqueles do filo Myxozoa (Grassé, 1970), entre nós conhecidos como mixosporídeos, têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos.

Até os anos de 1980 o filo Myxozoa era composto por duas classes. Aqueles encontrados parasitando peixes e menos frequentemente répteis e anfíbios, que compunham a classe Myxosporea, cujos esporos eram considerados os estágios disseminadores do parasito; já aqueles encontrados parasitando invertebrados (anelídeos) formavam a classe Actinosporea (Eiras, 1994). Contudo, Markiw e Wolf (1983) ao estudar a forma de transmissão de *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903, agente causador da “doença do rodopio” em peixes, relataram o envolvimento de anelídeos oligoquetas no ciclo de vida deste parasito. No ano seguinte, Wolf e Markiw (1984) em uma publicação na revista *Science* esclareceram a participação de anelídeos tubificídeos no ciclo de vida de *M. cerebralis*. Nesse trabalho, os autores mostraram que tubificídeos colocados em contato com esporos de *M. cerebralis* eram parasitados por actinosporídeos do gênero *Triactinomyxon*, indicando que esporos de *M. cerebralis* e de *Triactinomyxon* eram formas distintas do ciclo de vida do *M. cerebralis*, e que *Triactinomyxon* é a forma que desencadeia a doença do rodopio em salmonídeos. Desde então, várias espécies de Myxozoa foram reconhecidas tendo anelídeos como hospedeiros intermediários, o que levou Kent et al. (1994, 2001) a proporem a supressão da classe Actinosporea.

Atualmente, o filo Myxozoa é formado por duas classes: Myxosporea Buetschli, 1881 e a Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw e Okamura, 2000, sendo conhecidos atualmente cerca de 2.180 espécies (Sitjá-Bobadilla, 2008) que infectam peixes em ambiente marinho e água doce, onde causam sérias doenças em várias espécies de importância econômica (Kent et al., 2001).

Abaixo é apresentada a classificação do filo Myxozoa conforme proposto por Grassé (1970 apud Feist e Longshaw, 2006) e alterado por Canning et al., 1996 and Canning et al., 2000.

Filo Myxozoa

Classe Myxosporea Buetschli, 1881

Ordem Bivalvulida Schulman, 1959

Subordem Platysporina Kudo, 1919

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Subordem Sphaeromyxina Lom e Noble, 1984

Família Sphaeromyxidae Lom e Noble, 1984

Subordem Variisporina Lom e Noble, 1984

Família Alatosporidae Shulman *et al.*, 1979

Família Auerbachiiidae Evdokimova, 1973

Família Ceratomyxidae Doflein, 1899

Família Chloromyxidae Thélohan, 1892

Família Fabesporidae Naidenova e Zaika, 1969

Família Myxidiidae Thélohan, 1892

Família Ortholineidae Lom e Noble, 1984

Família Parvicapsulidae Shulman, 1953

Família Sinuolineidae Shulman, 1959

Família Sphaerosporidae Davis, 1917

Ordem Multivalvulida Shulman, 1959

Família Kudoidae Meglitsch, 1947

Família Trilosporidae Shulman, 1959

Classe Malacosporea Canning *et al.*, 2000

Ordem Malacovalvulida Canning *et al.*, 2000.

Família Saccosporidae Canning, Okamura and Curry, 1996

Historicamente os mixosporídeos foram considerados protozoários (Eiras 1994, Evans *et al.*, 2010), mas características como presença de esporos multicelulares e de cápsulas polares levaram pesquisadores a questionar esta classificação (Siddall *et al.*, 1995; Kent *et al.*, 2001; Canning e Okamura 2004). Análises filogenéticas utilizando dados de sequenciamento do gene 18S rDNA confirmaram a relação dos mixosporídeos com os metazoários, embora vários autores tenham sugerido que estes

parasitos devam ser incluídos no filo Cnidária (Jiménez-Guri et al., 2007; Fiala e Bartošova, 2010; Evans et al., 2010), dados moleculares ainda não permitem a confirmação filogenética desta hipótese, pois em algumas condições, estas análises sugerem ainda a relação com os Bilateria (Evans et al., 2010).

O desenvolvimento dos mixosporídeos nos hospedeiros vertebrados é caracterizado pela formação de plasmódios que apresentam em seu interior os esporos. Os plasmódios podem se desenvolver em vários tecidos do peixe hospedeiro, sendo que o seu tamanho pode variar desde poucos micrometros até vários milímetros (Feist e Longshaw, 2006). O desenvolvimento pode ser histozóico (plasmódios localizados intracelularmente ou intercelularmente) ou celozóico (localizados nas cavidades dos órgãos, soltos ou aderidos ao epitélio interno) (Lom, 1987; Eiras, 1994).

Até recentemente, a taxonomia dos mixosporídeos era baseada principalmente nos caracteres dos esporos, sendo os de maior importância: formato e tamanho dos esporos; presença ou ausência de um processo triangular, propriedades da linha de sutura; forma e tamanho das cápsulas polares; número e disposição das dobras do filamento polar; existência de projeções dos esporos ou apêndices caudais; existência de estrias ou outras ornamentações na superfície do esporo; relação de tamanho entre as cápsulas polares; posição relativa da extremidade anterior das cápsulas polares; posição do esporoplasma na cavidade do esporo; existência de um envelope mucoso na superfície do esporo (Lom e Arthur, 1989).

Porém, nos últimos anos tem sido sugerido o sequenciamento do gene 18S rDNA (Fiala e Bartosová, 2010). Segundo Molnár *et al.* (2002) o uso de métodos zoológicos clássicos é muito difícil para validar espécies de mixosporídeos morfologicamente similares, com idêntica afinidade tecidual e desenvolvendo-se em espécies de hospedeiros taxonomicamente muito próximas, sendo nestes casos, o uso de técnicas de biologia molecular de relevante importância. Bahri *et al.* (2003) também sugeriram que em estudos taxonômicos devam ser utilizados, além das características morfológicas, o sequenciamento do gene 18S rDNA, que poderão ser úteis em situações, onde detalhes morfológicos são ausentes ou não garantem a caracterização da espécie.

Na classe Myxosporea, o gênero com maior diversidade de espécies é o *Myxobolus*, que apresenta mais de 744 espécies descritas (Eiras et al. 2005). *Myxobolus cerebralis* Hofer 1903, é sem dúvida a espécie mais conhecida, sendo este o agente etiológico da “doença do rodopio” uma patologia que acomete salmonídeos de várias partes do mundo (Feist e Longshaw, 2006). O parasito infecta áreas de cartilagem, que são progressivamente erodidas e destruídas na medida em que se dá o desenvolvimento do plasmódio. Se o desenvolvimento se produz na cartilagem próximo da cápsula auditiva os danos resultantes levam a nítida alteração de natação: os alevinos não conseguem nadar em linha reta, mas em círculo donde deriva o nome de “doença do rodopio”. Se o plasmódio se alojar na cartilagem da coluna próxima a vigésima sexta vértebra, este provoca uma pressão nos nervos caudais que controlam a pigmentação da cauda, fazendo com que a cauda fique completamente enegrecida. (Eiras, 1994).

Durante várias décadas *M. cerebralis* contribuiu para o declínio na produção de truta selvagem em vários estados do Oeste dos Estados Unidos (Nehring e Walker, 1996; Vicent, 1996; Hedrick et al., 1998; Allen e Bergersen, 2002). No rio Madison, localizado no estado de Montana, *M. cerebralis* foi responsável pelo declínio de cerca de 90% na população de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) durante a década de 90 (Rognlie e Knapp, 1998). Na região das Montanhas Rochosas, o parasito também é apontado como responsável pelo declínio da população de truta arco-íris (Allen e Bergersen, 2002).

A doença do rodopio teve sua origem na Europa e foi primeiramente descrita em 1903 por Bruno Hofer na Alemanha (Hofer, 1903). Evidências sugerem que *M. cerebralis* tenha originado na Europa como um parasito de truta marrom (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), onde as infecções são tipicamente assintomáticas (Hoffman, 1990). Em 1900 a truta arco-íris foi introduzida na Europa vinda da América do Sul (Hoffman, 1990; Halliday, 1976; Nickum, 1999). Hofer observou sinais clínicos da doença na cauda de truta arco-íris em sistemas de cultivo da Europa, e detectou a presença de esporos microscópicos do parasito no crânio de vários peixes infectados (Steinbach Elwell et al., 2009).

Entre 1900 e 1950 *M. cerebralis* foi detectado em vários países da Europa (Bartholomew e Reno, 2002) e foi o responsável por grandes perdas em culturas de

truta arco-íris. Entre os anos de 1950 e 2000, o parasito já era encontrado no Norte da Ásia, Nova Zelândia, África do Sul e Estados Unidos (Steinbach Elwell et al., 2009).

Como e quando ocorreu a primeira introdução de *M. cerebralis* na América do Norte ainda é desconhecido, um provável meio de introdução pode ter sido através do comércio de peixes vivos, ovos de peixe e peixes congelados entre a Europa e Estados Unidos (Hoffman et al., 1962; Hoffman, 1990)

Além de *M. cerebralis*, várias outras espécies de Myxosporea foram registradas, causando importantes danos à diversas espécies de peixes em todo o mundo. *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950, infecta o trato digestivo de salmonídeos da América do Norte, causando mortalidades intensas em populações de salmonídeos selvagens e cultivadas (Feist e Longshaw, 2006; Atkinson e Bartholomew, 2010). *Hoferellus carassii* Akhmerov, 1960, produz hipertrofia dos rins de Goldfish na Ásia, Europa e América do Norte, sendo muito comum em peixes cultivados, no Japão a espécie é responsável por mortalidade acima de 20% (Lom e Dyková, 1995). *Kudoa thyrsites* Gilchrist, 1924, causa liquefação muscular *post-mortem* em várias espécies de peixes marinhos, alterando as características do pescado e diminuindo seu valor comercial (Langdon, 1991; Castro e Burgos, 1996)

As brânquias são o principal órgão respiratório, o mais importante sítio de excreção de nitrogênio e tem relevante papel no balanço iônico (Noga, 2000). Assim, intensas infecções de mixosporídeos nas brânquias podem comprometer o funcionamento deste órgão, afetando negativamente o desenvolvimento dos peixes (Naldoni et al., 2009). Ainda neste sentido, o rompimento do plasmódio pode lesar o tecido epitelial, abrindo assim uma porta de entrada para infecções secundárias (Feist e Longshaw, 2006). As patologias de brânquias associadas com os mixosporídeos incluem: fusão das lamelas, inflamação, hiperplasia, atrofia e necrose celular (Feist e Longshaw, 2006). *Myxobolus koi* (Kudo, 1919) se desenvolve nas brânquias de *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) e induz a hipertrofia do epitélio branquial e lesão nos filamentos branquiais (Yokoyama et al., 1997). Infecções causadas por *Myxobolus basilemellaris* (Lom e Molnar, 1983) produzem importantes alterações nas brânquias do hospedeiro (Kovács-Gayer e Molnar, 1983), com deformidades nas lamelas, reduzindo a capacidade respiratória do peixe (Feist e Longshaw, 2006).

No Brasil, Martins et al. (1997) relataram hemorragia e focos inflamatórios no epitélio das brânquias de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) infectados por *Henneguya* sp. em sistemas de criação. Em exemplares de piauçu (*Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1988) oriundos de sistemas de criação e infectados por *Henneguya leporinicola* Martins et al., 1999, foram observados hiperplasia, deslocamento do epitélio respiratório, hemorragias e severos focos inflamatórios nas brânquias (Martins et al. 1999). Segundo Adriano et al. (2005), *Henneguya piaractus* Martins e Souza, 1997, produziu alterações das estruturas branquiais, com hiperplasia do epitélio das lamelas e compressão dos capilares e tecidos adjacentes em exemplares de pacu de sistemas de criação. *Myxobolus cuneus* Adriano et al., 2006, foi descrito parasitando vesícula biliar, bexiga urinária, brânquias, baço, nadadeiras, superfície da cabeça, fígado e coração de pacu também em sistemas de criação, sendo que nas brânquias a infecção ocorreu na parede dos vasos, onde em infecções intensas podem provocar diminuição do fluxo sanguíneo (Adriano et al., 2006). *Henneguya pseudoplatistoma* Naldoni et al., 2009, foi identificado causando deformação das estruturas dos filamentos branquiais de pintado híbridos (resultantes do cruzamento entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum*) procedentes de criações dos estados de São Paulo e Mato Grosso. Em infecções intensas, o parasito levou à deformação das estruturas dos filamentos com importante redução da área funcional do epitélio respiratório (Naldoni et al., 2009).

Em ambiente natural, Adriano et al. 2009 relataram intensa infecção nas brânquias de dourado *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 por *Myxobolus salminus* Adriano et al., 2009. Os plasmódios se desenvolveram na parede dos vasos sanguíneos do filamento branquial, que dependendo da intensidade de infecção afetam o fluxo sanguíneo.

Estudos de ultra-estrutura de mixosporídeos são essenciais para trazer a luz da ciência características estruturais, morfológicas e fisiológicas do plasmódio e dos esporos, sendo tais características de grande valia na compreensão da intrigante relação parasito-hospedeiro (Current e Janovy 1978; Adriano et al., 2005; 2006; 2009).

Nos últimos anos, significativos avanços têm sido feitos a respeito da classificação, patologia e filogenia dos Myxozoa e numerosas espécies tem sido descritas utilizando caracteres morfológicos e moleculares.

Neste trabalho foram realizados estudos moleculares e morfológicos de uma nova espécie de Myxozoa infectando o filamento branquial de *B. hilarii*.

JUSTIFICATIVA

O Pantanal Matogrossense possui uma grande diversidade de peixes vivendo em equilíbrio com o meio ambiente. Várias destas espécies, dentre elas a piraputanga, são de grande importância para a pesca de subsistência da população local, pesca extrativista e pesca esportiva, sendo que, devido ao excelente sabor de sua carne e à boa aceitação pelo mercado consumidor, vem sendo introduzida com sucesso em sistemas de criação de várias regiões do Brasil.

Estudos realizados em várias regiões do mundo vêm mostrando que parasitos da classe Myxosporea ganham, ano após ano, maior importância entre os agentes causadores de enfermidades em peixes de ambiente natural e de sistemas de criação.

Desta forma, com o rápido avanço da aquicultura continental observada no Brasil, onde cada vez mais espécies da nossa fauna vem sendo utilizadas, torna-se imprescindível ampliar o conhecimento sobre os parasitos que acometem nossos peixes, visando conhecer aspectos da interação parasito-hospedeiro, taxonomia, sazonalidade, prevalência, intensidade e distribuição.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver estudo taxonômico e da interação parasito-hospedeiro de parasitos da classe Myxosporea infectando piraputanga (*Brycon hilarii*) em ambiente natural no Pantanal Matogrossense e em pisciculturas do estado de São Paulo.

Objetivos Específicos

1) Realizar estudo taxonômico de parasitos da classe Myxosporea em diferentes tecidos de piraputanga utilizando técnicas de análise morfológica (microscopia luz, microscopia eletrônica de transmissão) e sequenciamento do gene 18S rDNA.

2) Avaliar, mediante análise histopatológica e ultra-estrutural, os efeitos do parasitismo sobre os tecidos do hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido em parceria entre os Departamentos de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas-ZAB da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP, campus de Pirassununga e o Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP. Assim, para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados instalações e equipamentos da USP (laboratório, micrótomo e microscópio de luz), do CEPTA (material de pesca) e da UNICAMP (microscópio eletrônico de transmissão).

RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão aqui apresentados na forma de artigo científico, onde foram avaliados aspectos taxonômicos (mediante análise morfológica e molecular), filogenéticos e da interação parasito-hospedeiro de uma nova espécie de *Myxobolus* encontrado infectando filamento branquial de *Brycon hilarii* (Fig. 2) oriundos de ambiente natural no Pantanal Matogrossense.

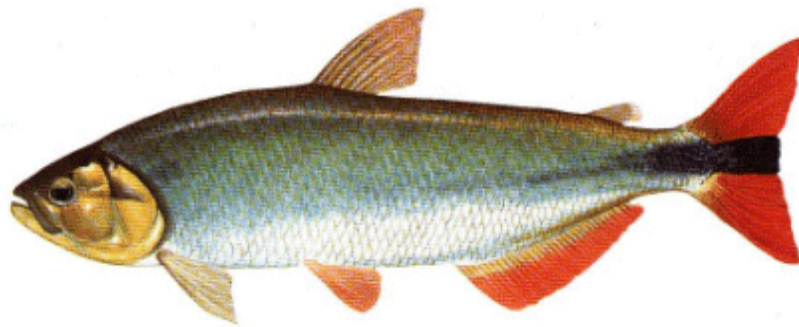


Fig. 2. Piraputanga (*Brycon hilarii* Valenciennes, 1850) (www.pescabrasil.com.br)

CAPÍTULO ÚNICO

Publicado no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 105 (6): 762-769 (2010).

PHYLOGENY, ULTRASTRUCTURE, HISTOPATHOLOGY AND PREVALENCE OF *MYXOBOLUS OLIVEIRAI* SP. NOV., A PARASITE OF *BRYCON HILARII* (CHARACIDAE) IN THE PANTANAL WETLAND, BRAZIL

Tiago Milanin, Jorge C Eiras, Sarah Arana, Antônio AM Maia, Anderson L Alves, Márcia RM Silva, Mateus M Carriero, Paulo S Ceccarelli, Edson A Adriano

ABSTRACT

This paper presents the morphological, histological and ultrastructural characteristics of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., a parasite of the gill filaments in *Brycon hilarii* from the Brazilian Pantanal. Out of 216 *B. hilarii* specimens examined (126 wild and 90 cultivated), 38.1% of wild specimens (n = 48) were infected. The parasites form elongated plasmodia primarily in the tip of gill filaments, reaching about 3 mm in length. A thorough comparison with all the *Myxobolus* species described from South American hosts, as well as nearly all the *Myxobolus* species described so far is provided. Partial sequencing of the 18S rDNA gene revealed a total of 1,527 bp. The *Myxobolus* species parasite of *B. hilarii* did not match any of the Myxozoa available in GenBank. In the phylogenetic analysis, *M. oliveirai* sp. nov. composed a monophyletic group with eight other species: five species of *Myxobolus* parasites of mugilid fishes, two parasites of pangasiid and one of centrarchid. Infection prevalence values of the parasite revealed no significant differences between wet and dry seasons or between males and females. The importance of the infection to the farming of the host species is emphasized.

Keywords: Myxozoa, Myxosporea, histology, molecular analysis, fish, piraputanga

INTRODUCTION

Brycon hilarii (Valenciennes, 1950) (Syn. *Brycon microlepis* Perugia, 1897) is an endemic characid species of the upper Paraguay Basin (Resende 2003), popularly known as piraputanga. It is highly appreciated in central Brazil (especially in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul) (Resende 2003) and is a very valuable species, fetching high market prices. *B. hilarii* has recently been introduced into aquaculture in several regions of Brazil, with a production of 633,000 kg on fish farms in 2006 (IBAMA 2008), demonstrating the considerable potential of this species to this activity.

Myxosporean parasites are among the most important fish pathogens (Schmahl et al. 1989) and more than 2,300 species have been reported to infect fish (marine and/or freshwater fish) in either their natural environment or on farms (Adriano et al. 2006, 2009a, b, Feist & Longshaw 2006, Eiras et al. 2008, Azevedo et al. 2009). The *Myxobolus* Butschli, 1882, is the genus with the greatest number of species (approximately 790 valid species) (Eiras et al. 2005, Lom & Dyková 2006) and many of these species are reported as pathogenic to fish (Kent et al. 2001, Feist & Longshaw 2006). In South America, 30 *Myxobolus* species have been reported (Azevedo et al. 2010, Eiras et al. 2010), but none have been reported to infect fish from the genus *Brycon*.

As part of ongoing research on the characteristics of myxosporea parasites of freshwater fish in Brazil, the present paper describes a new species of *Myxobolus* found to infect wild specimens of piraputanga in the Brazilian Pantanal wetland using morphological, histological, ultrastructural and molecular phylogeny analyses.

MATERIALS AND METHODS

A total of 126 specimens of wild *B. hilarii* caught in the Pantanal Matogrossense in central Brazil and 90 farmed specimens from three fish farms in the state of São Paulo (SP) were examined. The wild fish were examined in two seasons: spring (flood period) of 2001-2004 (n = 45) and autumn (drought period) of 2003 - 2005 and 2008 (n = 81). The fish were captured at three locations: in the Aquidauana, Miranda and Paraguay Rivers in the southern region of the Pantanal (n = 34), in rivers and lakes of the Pantanal National Park in the central region (n = 60) and in the Cuiabá and Manso Rivers in the municipality of Nobres in the northern region (n = 32). The fish from the Miranda, Aquidauana and Paraguay Rivers were caught in the spring of 2001 and 2002 as well as the autumn of 2003, whereas those from the Pantanal National Park and the municipality of Nobres were caught in the spring of 2003 and 2004 as well as the autumn of 2004, 2005 and 2008. The cultivated specimens were examined in the summer and winter of 2008. Immediately after collection, the live fish were transported to the field laboratory mounted nearby, where they were measured, weighed and necropsied. Cysts were removed from the gill filaments of different piraputanga specimens and examined under a light microscope. Spore dimensions (μm) were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Smears containing free spores were stained with Giemsa solution and mounted in a low-viscosity mounting medium as permanent slides. For histological analysis, fragments of infected organs were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut into serial sections (4 μm in thickness) and stained with haematoxylin/eosin and Sirius red. For transmission electron microscopy, plasmodia were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 12 h, washed in glucose-saline solution for 2 h and post-fixed in OsO_4 , all at 4°C. After dehydration in an acetone series, the material was embedded in EMbed 812 resin. Ultrathin sections, double stained with uranyl acetate and lead citrate, were examined in an LEO 906 electron microscope operated at 60 kV.

For molecular analysis, plasmodia were removed from the host tissue and fixed in ethanol. After rupturing the plasmodia with the aid of a needle, the contents were collected in a 1.5 mL microcentrifuge tube. DNA was extracted using the Wizard®

Genomic DNA Purification kit (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. DNA content was determined using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) at 260 nm. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a final volume of 25 μ L, which contained 10-50 ng of extracted DNA, 1x Taq DNA polymerase buffer (Invitrogen), 0.2 mmol of dNTP (Invitrogen), 1.5 mmol of MgCl₂, 0.2 pmol of each primer (Invitrogen), 0.25 μ L (1.25 U) of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and ultra pure (MilliQ) water. The Eppendorf AG 22331 Hamburg Thermocycler was used. An ~1600 bp 5' fragment of the SSU rDNA gene was amplified using the primers MX5-MX3 (Andree et al. 1999) in the following manner: an initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (95°C for 60 s), annealing (62°C for 60 s) and extension (72°C for 120 s), finished with an extended elongation step at 72°C for 5 min. PCR products were submitted to electrophoresis on 1% agarose gel (BioAmerica) in a Tris-Borate-EDTA buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA pH 8.0), stained with ethidium bromide and analyzed in a FLA-3000 (Fugi) scanner. The size of the amplified fragments was estimated by comparisons with the 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).

Purified PCR products were cloned in pCR®4-TOPO® vectors from the TOPO-TA Cloning® kit for sequencing (Invitrogen). A single clone was sequenced using MX5-MX3 and MC5-MC3 (Eszterbauer 2004) primer pairs with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™) in an ABI 3730 DNA sequencing analyzer (Applied Biosystems™).

A standard nucleotide-nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (blastn) search was conducted (Altschul et al. 1997). The sequence of the *Myxobolus* species obtained from *B. hilarii* was aligned with sequences obtained in the GenBank using DAMBE (Xia & Xie 2001). To evaluate the position of the *Myxobolus* species obtained from *B. hilarii* in relation to other *Myxobolus* spp, phylogenetic analyses were conducted using the phylogenetic methods neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) [MEGA 4.0 programme (Tamura et al. 2007)] and maximum likelihood (ML) [MEGA 5.0 (programme in test phase)]. The Kimura 2-parameter (K2P) evolution sequence model was used in the analysis. Bootstrap analysis (1,000 replicates) was employed to assess the relative robustness of the branches of the NJ, MP and ML trees using the MEGA 4.0 and 5.0 programmes. The distance analyses were performed using

the K2P model conducted using the MEGA 4.0 programme (Tamura et al. 2007). The species *Ceratomyxa seriola* and *Ceratomyxa shasta* were used as outgroups in the phylogenetic analyses.

The effects of season, study location and sex of the host on the prevalence of the parasite were assessed using the χ^2 test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

Among the 126 wild and 90 cultivated specimens of piraputanga (a total of 216) examined in the present study, 22.2% ($n = 48$) had plasmodia of an unknown parasite from the genus *Myxobolus*. The prevalence was of 38.1% in the wild specimens and 0% in the cultivated specimens. In the wild specimens, the prevalence of the parasite varied significantly with regard to study location ($\chi^2_2 = 28.79$; $p = 0.00$), with the lowest prevalence found in southern region of the Pantanal (2.9%). No significant difference was found between the central (43.3%) and northern regions (65.6%) ($\chi^2_1 = 4.15$; $p = 0.04$). The parasite was found in both seasons studied (prevalence of 33.3% in spring and 40.7% in autumn) and the variation between seasons was not significant ($\chi^2_1 = 0.63$; $p = 0.41$). Regarding the sex of the host, the prevalence was 32.2% for female specimens and 16.2% for males; this difference was also not significant ($\chi^2_1 = 3.07$; $p = 0.07$). Sex was not defined in seven infected specimens.

Myxobolus oliveirai sp. nov. (Figs 1-5)

Plasmodia elongated in shape and measuring up to 3 mm were found primarily in the distal extremity of the gill filaments (Fig. 1A). Histological and ultrastructural analysis revealed that the development of the plasmodia induced the expansion of the gill filaments and the compression caused thinning of the tissue of the distal extremity, which exhibited only a delicate layer of cells (Fig. 1C). In the proximal extremity, growth of the plasmodia occurred by invaginations in the filament tissue (Figs 1C, 2A). The plasmodia were surrounded by a well-defined capsule of host connective tissue, with distinct delicate and interlaced collagen fibres (Figs 2B, 3A). The plasmodium wall

consisted of a single layer that was continuous with pinocytic canals extending into the granular layer of the plasmodium ectoplasm (Fig. 3A, C).

The plasmodia exhibited development with different sporogenic stages, such as generative cells and disporoblastic pansporoblasts (Fig. 3C) along the periphery of the plasmodia (occurring in a thin layer of not more than 40 μm), followed by a layer containing immature spores and mature spores occurring in the internal region (Figs 2-4). The spores were pear-shaped in the frontal view (Figs 1B, 5A), measuring 11.2 ± 0.4 μm in length, 7.4 ± 0.5 μm in width and 4.6 ± 0.6 μm in thickness. The polar capsules were elongated in shape and equal in size, measuring 5.6 ± 0.2 μm in length and 2.3 ± 0.2 μm in width. The anterior ends of polar capsules were close to one another and the polar filaments exhibited 6-8 turns arranged perpendicular to the longitudinal axis of the capsules (Figs 4C, 5A). A few, small sporoplasmosomes were found in the sporoplasm (Fig. 4A) and two nuclei were discernible when stained with Giemsa (Fig. 5A).

In the molecular analysis, the specific primer pair MX5 - MX3 successfully amplified an approximately 1,600-bp fragment of the 18S rDNA gene in the spores obtained from plasmodia found infecting the gill filaments of *B. hilarii*. The BLAST search using the partial 18S rDNA sequence data (1,527 bp) of the *Myxobolus* species parasite of *B. hilarii* did not match any of the Myxozoa available in the GenBank.

In the phylogenetic analyses, the *Myxobolus* species clustered into three distinct lineages. *Myxobolus spirosulcatus* represented the basal group and *Myxobolus acanthogobii* clustered as the sister group of the remaining species of *Myxobolus* (Fig. 6). These remaining species clustered in a monophyletic group composed of numerous species divided into four smaller clades (A-D) (Fig. 6). *M. oliveirai* sp. nov. formed a monophyletic unit with eight other *Myxobolus* species in Clade C: five species parasites of hosts from the family Mugilidae; two parasites of Pangasiidae hosts and one parasite of Centrarchidae. Mean genetic divergence within Clade C (Table) was 20.4%. In this clade, the smallest distance in reference to *M. oliveirai* sp. nov. was with *Myxobolus hakyi* (16.6%) and the largest was with *Myxobolus osburni* (28.6%).

Type host - *B. hilarii* (Valenciennes, 1850) (Characidae, Bryconinae).

Etymology - The specific epithet name is in homage to Ricardo Afonso Torres de Oliveira, research assistant of the laboratory of Saúde e Bem Estar dos Peixes of the Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais of Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, who, in recent years, has provided great support to the fieldstrip of our research group.

Type data and depository - Pantanal Matogrossense (Aquidauana, Cuiabá, Miranda and Paraguay rivers) in the Paraguay basin, Brazil.

Specimens deposited - Slides with stained spores (syntype) have been deposited in the collection of the Museum of Natural History, Institute of Biology, State University of Campinas, SP, Brazil (accession ZUEC 28). The 18S rDNA sequence was deposited in GenBank under the accession HM754633.

Prevalence - Forty-eight of 216 *B. hilarii* examined (22.2%) had plasmodia of an unknown parasite from the genus *Myxobolus* - 48/126 wild specimens (38.1%) and 0/90 (0%) cultivated specimens.

Site of infection - distal extremity of the gill filaments.

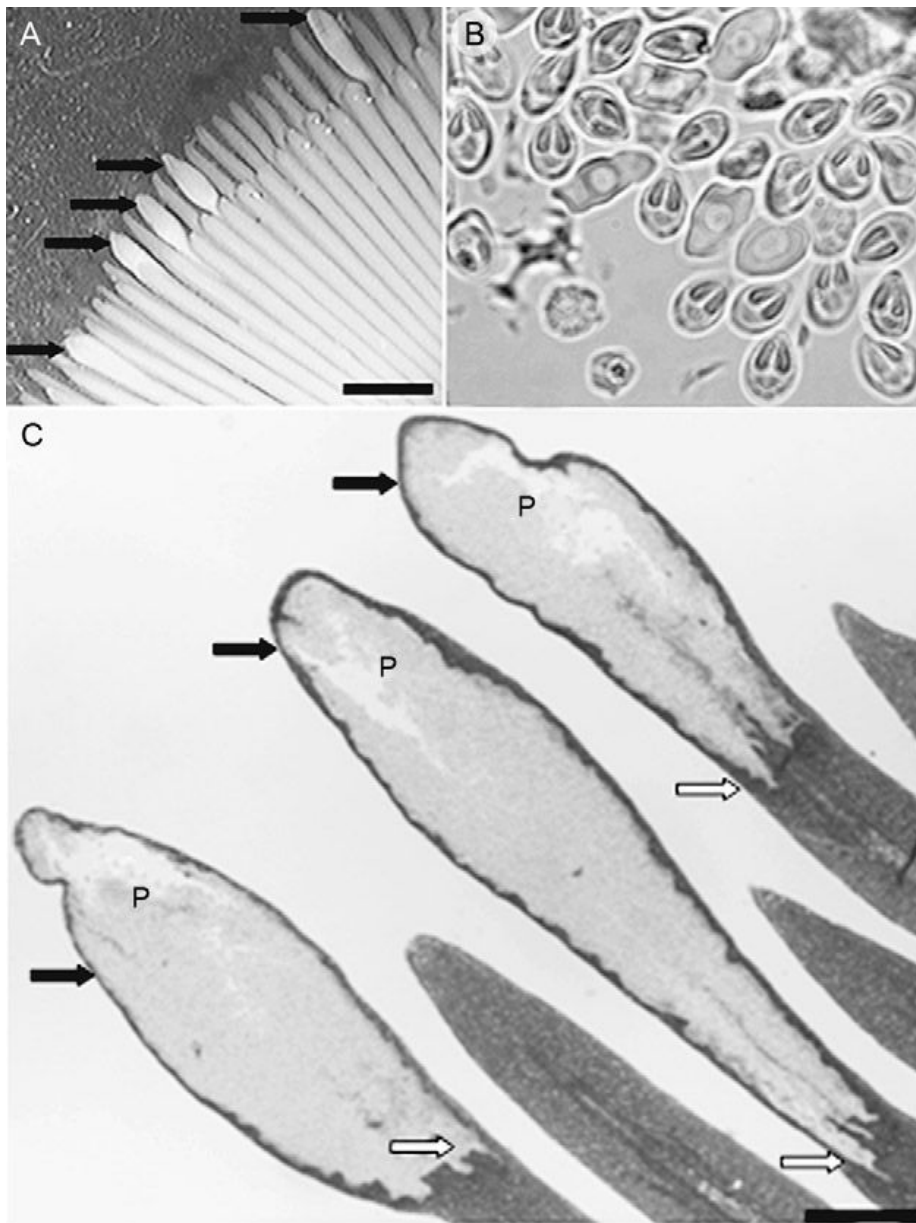


Fig. 1: light photomicrographs of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., parasite of *Brycon hilarii*. A: formalin-fixed gill filaments showing plasmodia in the distal extremity (arrows). Bar = 3 mm; B: mature fresh spores. Bar = 10 μ m; C: histological section showing plasmodia (P) in the distal extremity. Note the expansion of the gill filaments with compression and thinning of the tissue of the extremity distal (black arrows) as well as invaginations in the filament tissue in the proximal extremity (white arrows). Bar = 20 μ m. Sirius red staining.

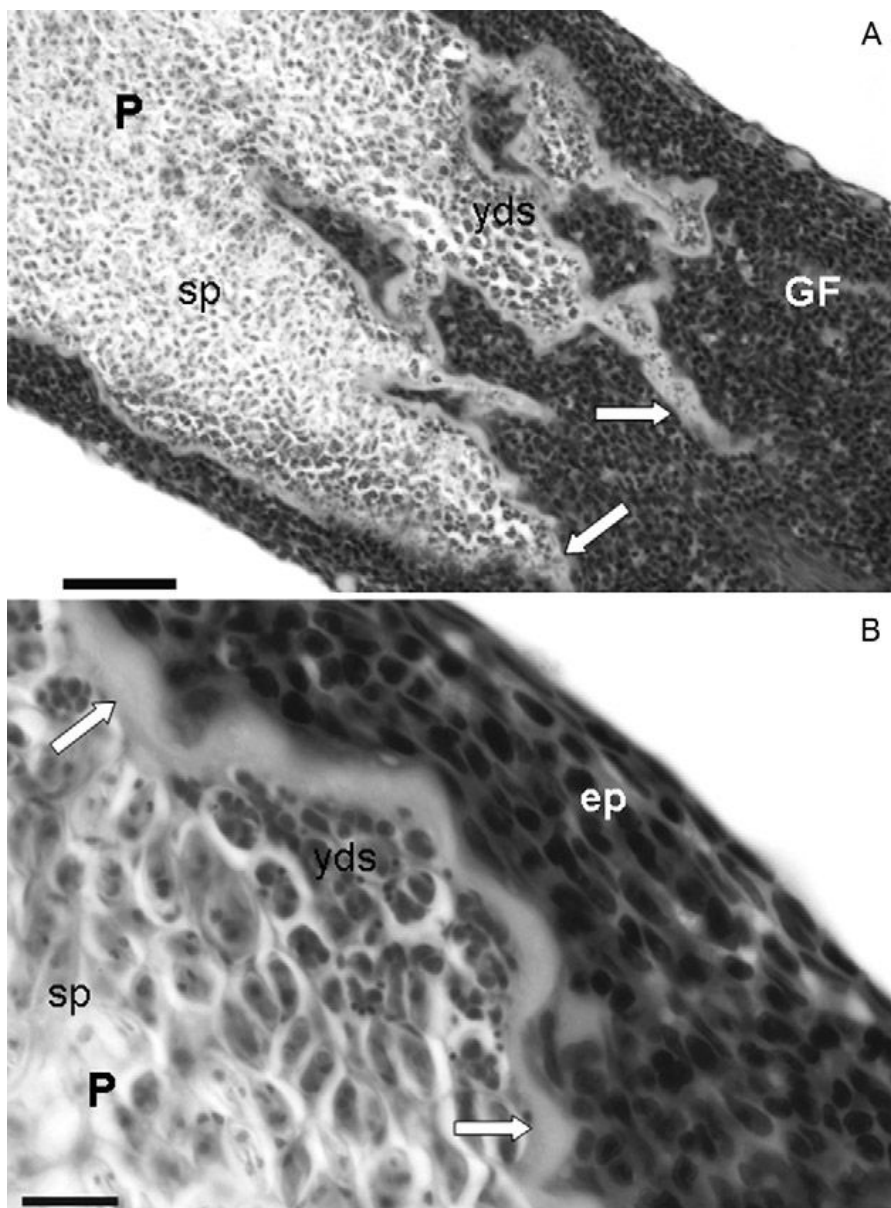


Fig. 2: light photomicrographs of histological section of gill filaments (GF) of *Brycon hilarii* parasitized by *Myxobolus oliveirai* sp. nov. (A) showing a plasmodium (P) with spores in central area (sp), young developmental stages (yds) in the plasmodial periphery and invaginations in the filament tissue in the proximal extremity (arrows). Bar = 50 μ m; B: histological section showing a connective tissue capsule (arrows) surrounding P. Note yds in sp in the central area. Bar = 10 μ m. Sirius red staining; ep: epithelium.

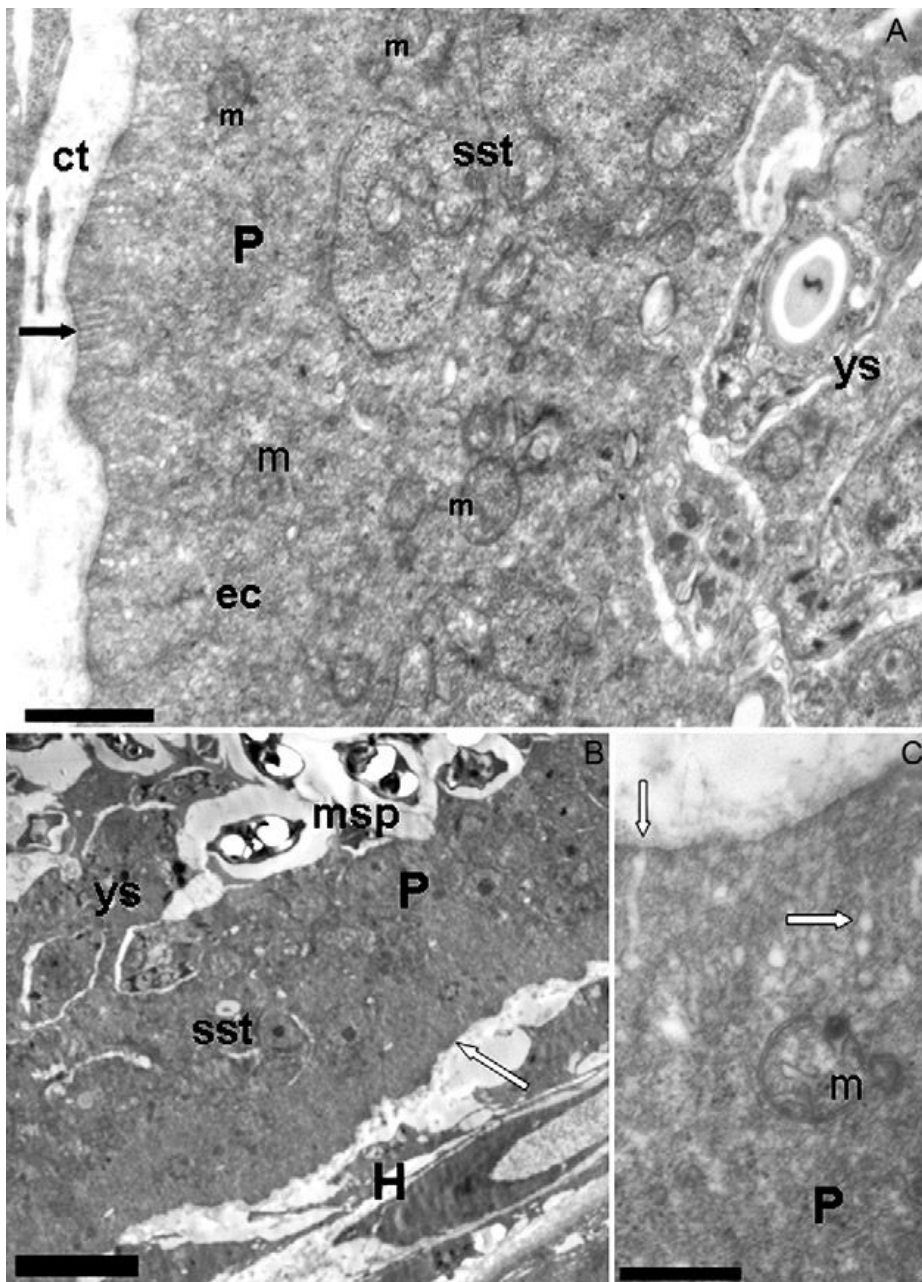


Fig. 3: electron micrographs of *Myxobolus oliveirai* sp. nov. parasite of gill filaments in *Brycon hilarii*. A-C: host-parasite interface; A: showing the capsule of connective tissue (ct) surrounding the plasmodium (P). Note the ectoplasm area (ec) showing pinocytotic canals (arrow) and mitochondria (m), sporogenic stages (sst) and an inner layer of young spores (ys). Bar = 1 μ m; B: smaller magnification showing the host-parasite interface (arrow), sst, ys and transversal sections of mature spores (msp). Bar = 5 μ m; C: detail of P showing pinocytotic canals terminating in pinocytotic vesicles (arrows) and m. Bar = 0.5 μ m; H: host.

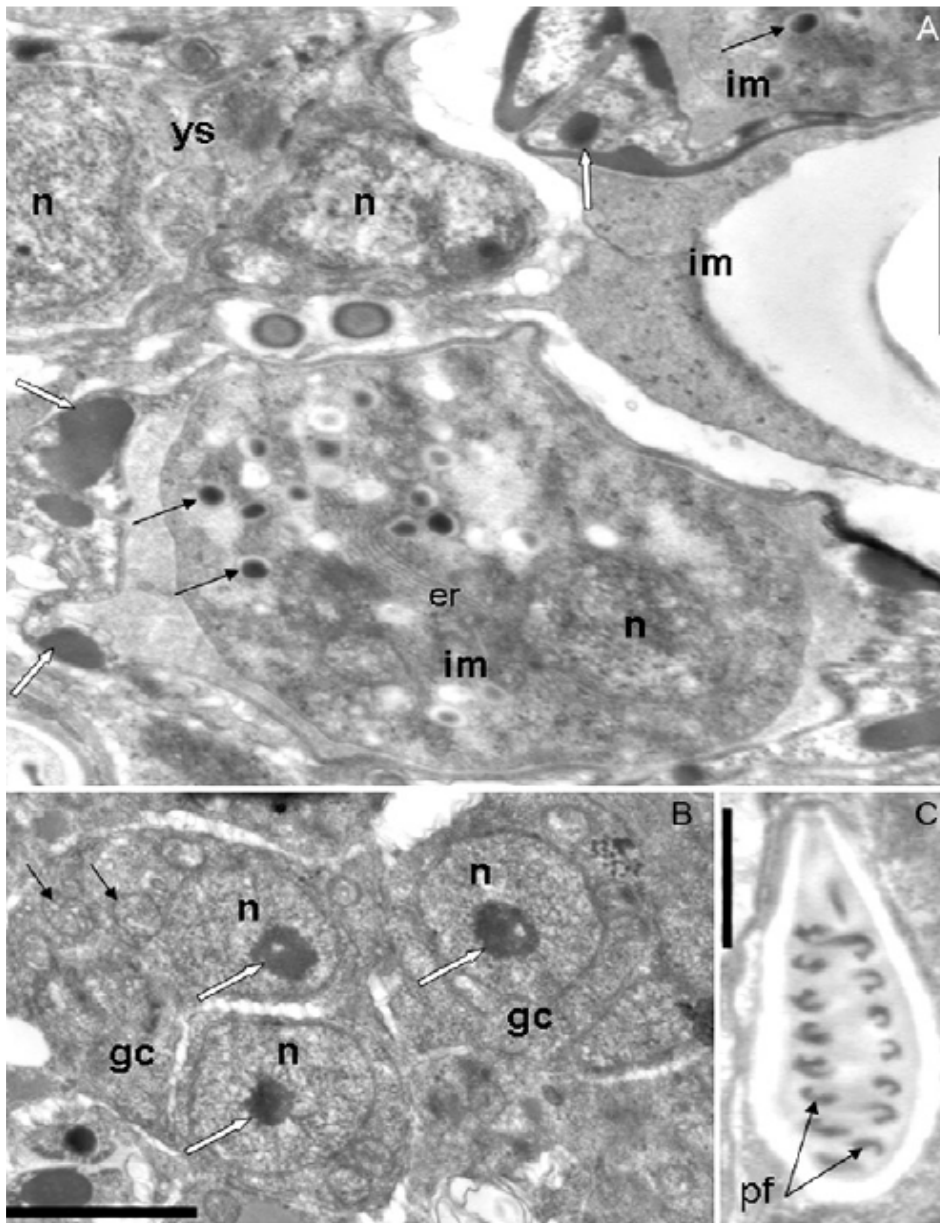
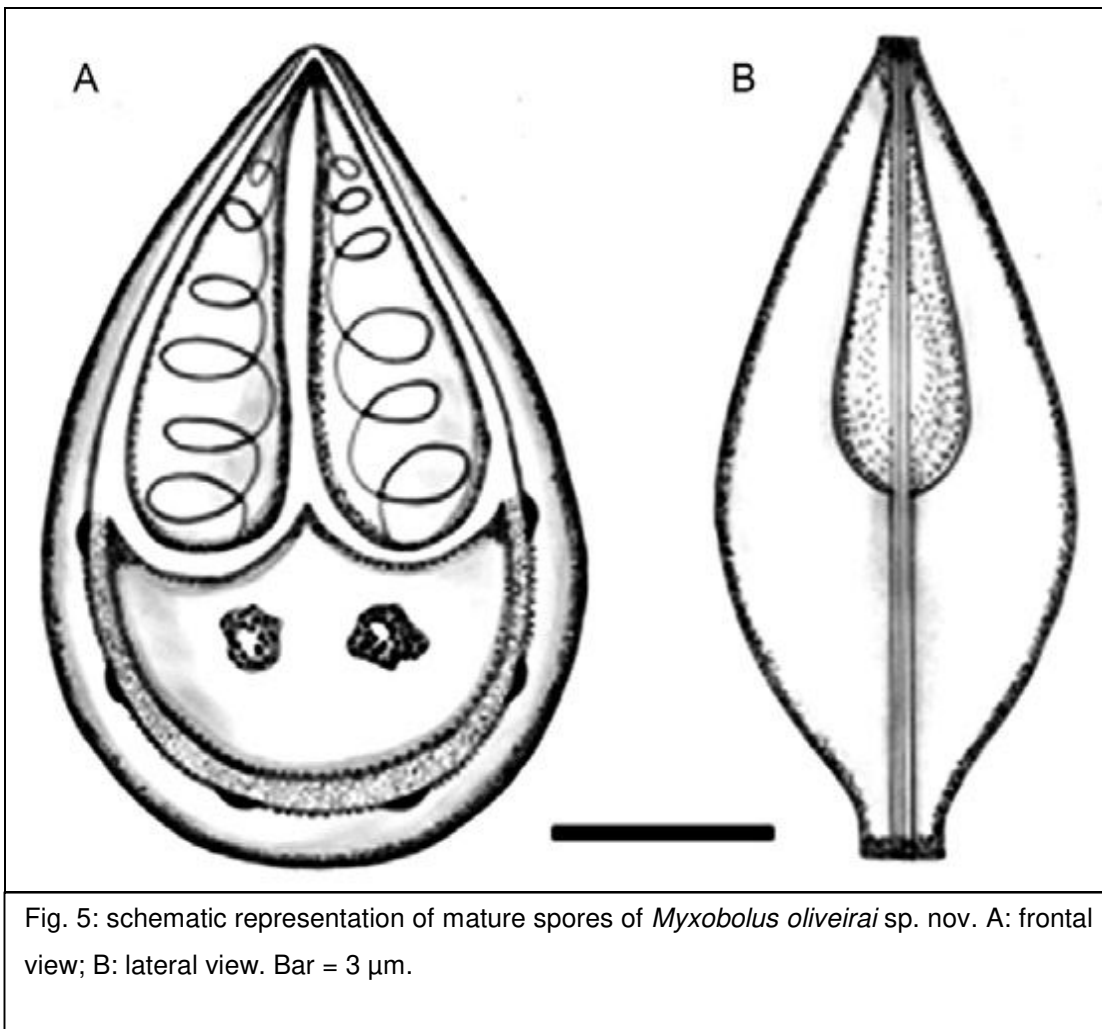


Fig. 4: electron micrographs of *Myxobolus oliveirai* sp. nov. parasite of gill filaments in *Brycon hilarii*. A: plasmodium showing transversal section of young spore (ys) with two nuclei (n) and immature spores (im) showing sporoplasmosomes (thin arrows), sporoplasm nucleus and valve-forming material (white arrows). Bar = 1 µm; B: generative cells (gc) with n containing conspicuous nucleolus (white arrows) and mitochondria (thin arrows). Bar = 2 µm; C: longitudinal section of a polar capsule with its polar filaments (pf) sections. Bar = 1 µm.



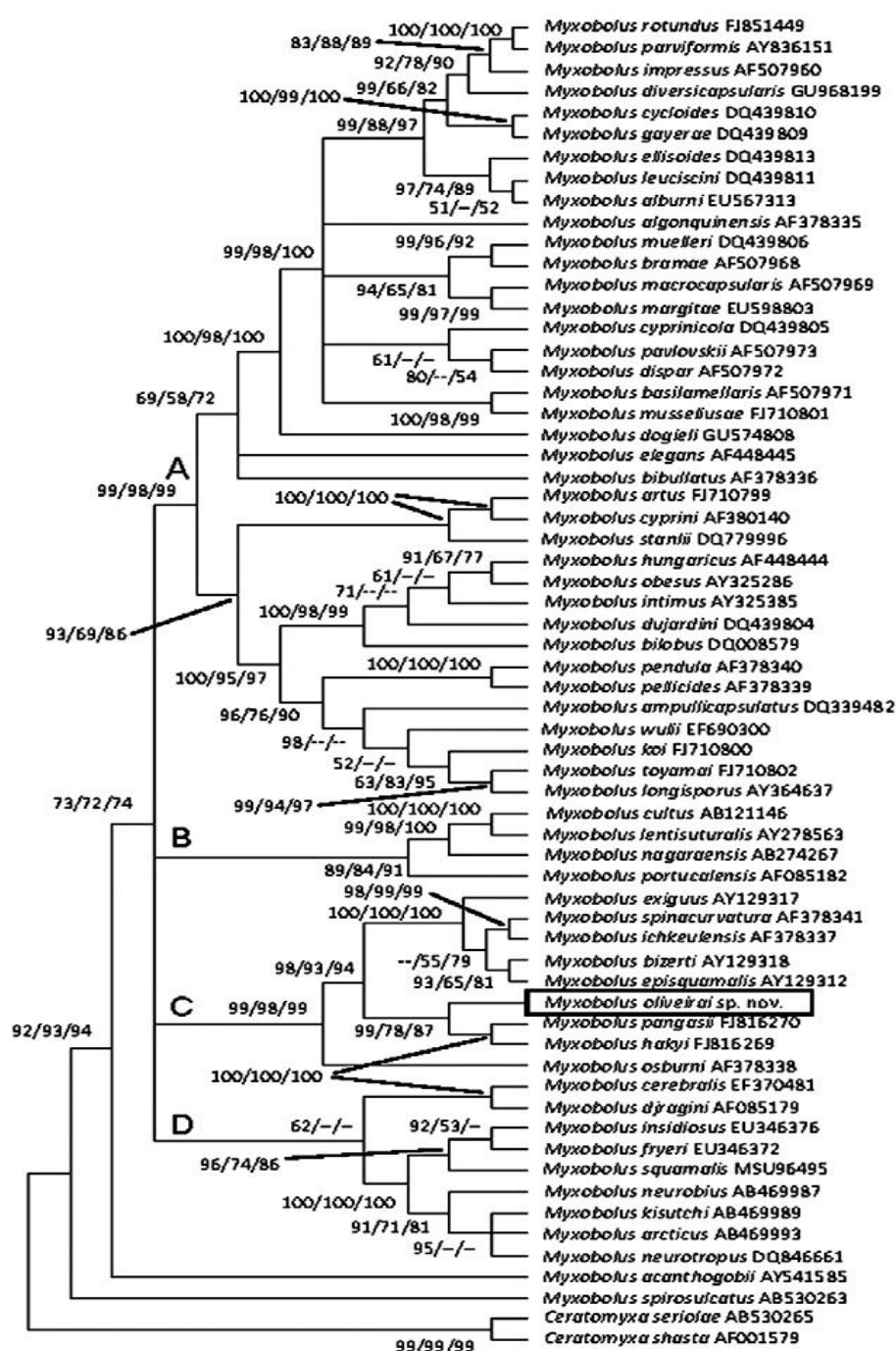


Fig. 6: condensed phylogenetic tree (bootstrap > 50) of consensus among neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood showing relationship between *Myxobolus oliveirai* sp. nov. and other *Myxobolus* spp based on partial 18S rDNA. Genbank accessions are given after species name. Numbers above nodes indicate bootstrap confidence levels.

TABLE								
Pairwise distances based on 1.527-bp fragments of the 18S rRNA gene of <i>Myxobolus oliveirai</i> sp. nov. and related <i>Myxobolus</i> species using Kimura 2-parameters model of sequence evolution								
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Myxobolus oliveirai</i> sp. nov.								
<i>Myxobolus spinacurvatura</i>	0.183							
<i>Myxobolus osburni</i>	0.286	0.290						
<i>Myxobolus ichkeulensis</i>	0.195	0.095	0.296					
<i>Myxobolus pangasii</i>	0.167	0.227	0.294	0.223				
<i>Myxobolus hakyi</i>	0.166	0.225	0.294	0.224	0.013			
<i>Myxobolus bizerti</i>	0.201	0.146	0.305	0.156	0.219	0.219		
<i>Myxobolus exiguus</i>	0.206	0.155	0.305	0.171	0.226	0.222	0.171	
<i>Myxobolus episquamalis</i>	0.188	0.143	0.292	0.133	0.222	0.215	0.124	0.142

DISCUSSION

M. oliveirai sp. nov. was compared with all *Myxobolus* species previously reported in fish of South America (Azevedo et al. 2010, Eiras et al. 2010) and other geographic regions (Eiras et al. 2005). Among the South American species, *M. oliveirai* sp. nov. resembles the body shape of *Myxobolus cordeiroi* (Adriano et al. 2009a), a parasite of *Zungaro jahu*; *Myxobolus chondrophilus* (Nemeczek, 1926), reported to infect *Sardinella anchovina*; *Myxobolus associatus* (Nemeczek, 1926), a parasite of *Leporinus mormyrops*; *Myxobolus cunhai* (Penido, 1927), a parasite of *Pygocentris piraya*; *Myxobolus serrasalmi* (Walliker 1969), a parasite of *Serrasalmus rhobeus*; *Myxobolus maculatus* (Casal et al. 2002), a parasite of *Metynnis maculatus*; *Myxobolus* sp. (Walliker 1969), a parasite of *Colossoma bidens*, and *Myxobolus* sp. (Walliker 1969), a parasite of *Serrasalmus* sp. Among all these species, however, only *M. cordeiroi* and the *Myxobolus* sp. parasite of *Serrasalmus* have a similar size to that of *M. oliveirai* sp. nov. Although the description of *Myxobolus* sp. parasite of *Serrasalmus* sp. (Walliker 1969) is poor, a superficial comparison reveals that the anterior end of the spores of *Myxobolus* sp. are more pointed than in *M. oliveirai* sp. nov. Furthermore, the infection site (kidney) and host (*Serrasalmus* sp.) of the parasite described by Walliker (1969) differ from those of *M. oliveirai* sp. nov., which infects gill filaments in *B. hilarii*. Regarding *M. cordeiroi*, the differences were in the number of polar filament turns, infection sites (connective

tissue of several organs) and host (a pimelodid fish). The spore dimensions of the different species do not fit the values found in the present material. Therefore, our specimens cannot be identified with any of the aforementioned species.

When comparing *M. oliveirai* sp. nov. with species from other continents (Eiras et al. 2005), we selected those species that most resembled our material in their sets of characteristics. Thus, we included *Myxobolus bellus* infecting the integument of *Carpoides carpio* in the USA (Kudo 1934), *Myxobolus bramaeformis* described from the kidneys and gut of *Hypophthalmichthys molitrix* in the Amur Basin (Akhmerov 1960), *Myxobolus fahmii* infecting the gills of *Barbus bynni* in Egypt (Ali et al. 2002) and *Myxobolus pseudosquamae* parasitizing the gills and kidney of *Sinocyclochilus grahami tingi* in China (Ma & Zhao 1993). Despite some similarities, the features of our specimens do not match the characteristics of any of the aforementioned species. Moreover, their hosts are phylogenetically very different and their geographic locations are also quite different. In particular, only a very few number of species have as small a spore thickness ($4.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$) as that described for *M. oliveirai* sp. nov. Considering the 744 nominal species reported by Eiras et al. (2005), only 21 have a similar spore thickness. In these cases, however, the other spore features are very different. Furthermore, this is the first report of a myxosporean species infecting fish from the genus *Brycon* and the BLAST search using the partial 18S rDNA sequence of *M. oliveirai* sp. nov. did not match any of the Myxozoa available in GenBank.

The molecular phylogenetic analysis was based on the comparative analyses of the 18S rDNA gene in 62 species of *Myxobolus* (approximately 1,500 bp) obtained from GenBank with *M. oliveirai* sp. nov. To enhance the accuracy of the analysis, smaller species were not used. The results, with high bootstrap values, showed the *Myxobolus* species clustering as a monophyletic unit. *M. spirosulcatus* was the most divergent species of the genus in this analysis and *M. acanthogobii* appears to be the sister group of the large monophyletic clade composed by the remaining *Myxobolus* species. This large clade further divided into four monophyletic units (A-D), with unsolved groups, despite the high bootstrap values supporting the relationships.

M. oliveirai sp. nov. clustered in Clade C together with eight other species, forming a monophyletic unit, where it appears as sister group of the clade formed by *M. pangasii* and *M. hakyi*, which are parasites of *Pangasianodon hypophthalmus* (Pangasiidae: Siluriformes) and, together, these three species compose the sister group of the clade formed by five species (*Myxobolus exiguus*, *Myxobolus spinacurvatura*, *Myxobolus ichkeulensis*, *Myxobolus bizerti* and *Myxobolus episquamalis*), parasites of mugilid hosts. *M. osburni*, a parasite of *Lepomis gibbosus*, which is a Perciformes from the family Centrarchidae, appears as the basal unit of Clade C.

The mean genetic divergence estimated in Clade C was 20.4%. With regard to the new species, the smallest divergence was with *M. hakyi* (16.6%), a sister taxa of *M. oliveirai* sp. nov., whereas the largest divergence was with *M. osburni* (28.6%) (Table) which is the basal species for Clade C.

The phylogenetic tree obtained here is in accordance with results described by Ferguson et al. (2008) and Liu et al. (2010), who report *M. acanthogobii* as a species with the greatest divergence among *Myxobolus* spp as well as in relation to the clustering of *M. exiguus*, *M. spinacurvatura*, *M. ichkeulensis*, *M. bizerti*, *M. episquamalis*, *M. pangasii* and *M. hakyi* in a monophyletic unit.

The results of the present study show the phylogenetic relation of the new species with other *Myxobolus* species available in GenBank. This is the first phylogenetic study on a *Myxobolus* species parasite of a South American characid host considering Myxozoa parasites of fresh water fish. From this region, only the 18S rDNA gene sequence of *M. cordeiroi* (Adriano et al. 2009a), with around 500 bp, has been deposited in GenBank. Thus, additional molecular and phylogenetic studies of *Myxobolus* spp parasites of this fish family are needed to identify the true position of the *Myxobolus* parasites of characid hosts in relation to the *Myxobolus* species parasites of other families of fish.

There was a much lower prevalence of *M. oliveirai* sp. nov. in the southern region of the Pantanal than that found in the central and northern areas, demonstrating that environmental characteristics may influence the distribution of this myxosporean species in the Brazilian Pantanal. Environmental parameters (water temperature and water flow) have been reported to influence the prevalence of *Myxobolus cerebralis* (Baldwin et al.

2000, Hallett & Bartholomew 2008). The Brazilian Pantanal is the largest floodplain area in the world, with approximately 150,000 km² (Silva 1986, Ceccarelli et al. 2007), and this very large ecosystem has areas with heterogeneous features, which may have contributed toward the lower prevalence of *M. oliveirai* sp. nov. in the southern region. However, the nature of the parameters that influence the prevalence of infection is unknown.

Regarding the seasons studied, the variation in prevalence was non-significant, revealing that season had no influence over infection by *M. oliveirai* sp. nov. in the present study. This finding is in contrast to results described by Gbankoto et al. (2001), who report the occurrence of significant seasonal variations in *Myxobolus* sp. and *Myxobolus zillii* parasites of *Sarotherodon melanotheron melanotheron* and *Tilapia zillii*, respectively, and Gbankoto et al. (2003), who report seasonal differences in the infection of *S. melanotheron melanotheron* by *Myxobolus heterospora*. However, the results of the present study are in agreement with those described by Gbankoto et al. (2003), who report no seasonal variation in the infection of *T. zillii* by *M. heterospora*.

The comparison of infection between female and male hosts revealed no influence of sex on the prevalence of *M. oliveirai* sp. nov. This finding is in agreement with accounts describing some Myxozoa species (Gbankoto et al. 2001, Viozzi & Flores 2003), but contrasts with others (Muzzall 1995, Gbankoto et al. 2003) that reported a significant difference between females and males regarding the prevalence of infection.

The histological analysis of piraputanga gills infected with *M. oliveirai* sp. nov. revealed numerous large cysts primarily in the distal area of the gill filaments, but no pronounced inflammatory response was found in the infection site, which is similar to findings described for other South American myxoporean species (Barassa et al. 2003, Eiras et al. 2008, 2009, Adriano et al. 2009a, b). However, the development of the plasmodia caused expansion and compression of the gill filaments, producing a thinning of the tissue at the distal extremity, whereas the growth of the plasmodia in proximal extremity occurred through invaginations, pervading and occupying the filament tissue. These structural alterations in the gills are similar to structural changes reported for other myxosporean species (Feist & Longshaw 2006).

The ultrastructural analysis revealed that sporogenesis in *M. oliveirai* sp. nov. followed the general pattern of other *Myxobolus* species (Current et al. 1979, Casal et al. 1996, 2002, Adriano et al. 2006) and the plasmodium wall consisted of a single membrane, which was continuous with pinocytic canals extending to the ectoplasm, as seen in some *Myxobolus* species (Current et al. 1979), but differed from others delimited by a double membrane (Casal et al. 2002, 2006).

Gill infections by *Myxoporeia* in farmed fish can cause significant tissue damage (Martins et al. 1997, 1999, Adriano et al. 2005a, b, 2006, Feist & Longshaw 2006) and occasionally death (Martins et al. 1999, Feist & Longshaw 2006). Although the histopathological changes produced by *M. oliveirai* sp. nov. impaired the function of the gill surface, the infection apparently did not significantly affect the general health of the fish. However, the histopathological analysis only addressed the wild host specimens (farmed fish were not infected) and we do not know the impact that infection by *M. oliveirai* sp. nov. may have on farmed specimens, especially in intensive farming. Thus, the presence and dispersion of *M. oliveirai* sp. nov. needs to be monitored closely by commercial fish farmers.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Ricardo Afonso Torres de Oliveira (CEPTA/ICMBio), for help in dissecting the fish, and to Dr Laerte Batista de Oliveira Alves, manager of the National Center for Research and Conservation of Continental Fishes (CEPTA/ICMBio), and Dr José Augusto Ferraz de Lima, the manager of Pantanal National Park, for support during the fieldwork.

REFERENCES

- Adriano, E.A., Arana, S., Alves A.L., Silva M.R., Ceccarelli P.S., Henrique-Silva F., Maia, A.A.M. 2009a. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. *Vet Parasitol* 162: 221-229.
- Adriano, E.A., Arana, S., Carriero, M.M., Naldoni, J., Ceccarelli, P.S., Maia, A.A.M. 2009b. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. *Vet Parasitol* 165: 25-29.
- Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2005a. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Dis Aquat Organ* 64: 229-235.
- Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2005b. Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 177-181.
- Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2006. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. *Parasite* 13: 137-142.
- Akhmerov, A.K. 1960. Myxosporidia of fishes of the Amur River Basin. *Rybnoe Khozyaistvo Vnutrikh Vodoemov Latvinskoi SSR* 5: 239-308.
- Ali, M.A., Al-Rasheid, K.A., Sakran, T., Abdel-Baki, A.A., Abdel-Ghaffar, F.A. 2002. Some species of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporea) infecting freshwater fish of the River Nile, Egypt, and the impact on their hosts. *Parasitol Res* 88: 9-15.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Andree, K.B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S.J., Hedrick, R.P. 1999. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 85: 68-74.
- Azevedo, C., Casal, G., Matos, P., Ferreira, I., Matos, E. 2009. Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). *J Eukaryot Microbiol* 56: 589-593.

- Azevedo, C., Casal, G., Mendonça, I., Carvalho, E., Matos, P., Matos, E. 2010. Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 203-207.
- Baldwin, T.J., Vincent, E.R., Silflow, R.M., Stanek, D. 2000. *Myxobolus cerebralis* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) exposed under natural stream conditions. *J Vet Diagn Invest* 12: 312-321.
- Barassa, B., Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2003. *Henneguya curvata* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitol* 50: 151-153.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. 1996. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. *Europ J Protistol* 32: 123-127.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. 2002. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). *Dis Aquat Organ* 51: 107-112.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. 2006. A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynnis argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. *J Parasitol* 92: 817-821.
- Ceccarelli, P.S., Adriano, E.A., Santos, S.M.C., Rego, R.F., Silva, L.O.L. 2007. Levantamento qualitativo da fauna parasitológica de peixes do Pantanal Mato-Grossense. In Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais-Cepta (ed.), *Pesquisas patológicas e genéticas em recursos pesqueiros da Bacia do Alto Paraguai*, IBAMA, Pirassununga, p. 16-116.
- Current, W.L., Janovy, Jr. J., Knight, S.A. 1979. *Myxosoma funduli* Kudo (Myxosporida) in *Fundulus kansae*: ultrastructure of the plasmodium wall and of sporogenesis. *J Protozool* 26: 574-583.
- Eiras, J.C., Molnár, K., Lu, Y.S. 2005. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 61: 1-46.
- Eiras, J.C., Monteiro, C.M., Brasil-Sato, M.C. 2010. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the upper São Francisco River, Brazil, with a revision of the *Myxobolus* spp from South America. *Zoologia* 27: 131-137.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. 2008. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp infecting South American fish. *Acta Protozool* 47: 149-154.

- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. 2009. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: a morphological and morphometric study. *Vet Parasitol* 159: 154-158.
- Eszterbauer, E. 2004. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. *Dis Aquat Organ* 58: 35-40.
- Feist, S.W., Longshaw, M. 2006. *Phylum myxozoa*. In PTK Woo (ed.), *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Vol. 1, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire, p. 230-296.
- Ferguson, J.A., Atkinson, S.D., Whipps, C.M., Kent, M.L. 2008. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J Parasitol* 94: 1322-1334.
- Gbankoto, A., Pampoulie, C., Marques, A., Sakiti, G.N. 2001. Occurrence of myxosporean parasites in the gills of two tilapia species from Lake Nokoué (Bénin, west Africa): effect of host size and sex, and seasonal patterns of infection. *Dis Aquat Organ* 44: 217-222.
- Gbankoto, A., Pampoulie, C., Marques, A., Sakiti, G.N., Dramane, K.L. 2003. Infection patterns of *Myxobolus heterospora* in two tilapia species (Teleostei: Cichlidae) and its potential effects. *Dis Aquat Organ* 55: 125-131.
- Hallett, S.L., Bartholomew, J.L. 2008. Effects of water flow on the infection dynamics of *Myxobolus cerebralis*. *Parasitology* 135: 371-384.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. *Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*, IBAMA, Brasília, 181 pp.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Dessser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E., Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48: 395-413.
- Kudo, R.R. 1934. Studies on some protozoan parasites of fishes of Illinois. *Ill Biol Monogr* 13: 7-44.
- Liu, Y., Whipps, C.M., Gu, Z.M., Zeng, L.B. 2010. *Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence. *Parasitol Res* 107: 699-706.
- Lom, J., Dyková, I. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol (Praha)* 53: 1-36.
- Ma, C.L., Zhao, Y.J. 1993. The parasitic myxosporidia of fresh-water fishes from the west region of Sichuan Province. II. Six new species of the genus *Myxobolus*. *Acta Zootax Sinica* 18: 262-269.

- Martins, M.L., de Souza, V.N., de Moraes, J.R., de Moraes, F.R. 1999. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporincola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, histopathology and treatment. *Rev Bras Biol* 59: 527-534.
- Martins, M.L., Souza, V.N., Moraes, F.R., Moraes, J.R.E., Costa, A.J., Rocha, U.F. 1997. Pathology and behavioral effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. *J World Aquac Soc* 28: 297-300.
- Muzzall, P.M. 1995. Distribution of *Myxobolus scleroperca* (Myxobolidae: Myxosporea) in yellow perch (*Perca flavescens*) in the Great Lakes. *J Parasitol* 81: 498-499.
- Resende, E.K. 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the upper Paraná Basin. In J Carolsfeld, B Harvey, C Ross, A Baer (eds.), *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*, IDRC, Ottawa, 372 pp.
- Schmahl, G., Mehlhorn, H., Tarachewski, H. 1989. Treatment of fish parasites. 7. Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on development stages of *Myxobolus* sp. Bütschli, 1882 (Myxosporea, Myxozoa): a light and electron microscopic study. *Eur J Protistol* 25: 26-32.
- Silva, M.V. 1986. *Mitos e verdades sobre a pesca no Pantanal Sul-Mato-Grossense*, Fiplan, Campo Grande, 146 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Viozzi, G.P., Flores, V.R. 2003. *Myxidium biliare* sp. n. (Myxozoa) from gall bladder of *Galaxias maculatus* (Osmeriformes: Galaxiidae) in Patagonia (Argentina). *Folia Parasitol (Praha)* 50: 190-194.
- Walliker, D. 1969. Myxosporidea of some Brazilian freshwater fishes. *J Parasitol* 55: 942-948.
- Xia, X., Xie, Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371-373.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

- 1) Exemplares de *Brycon hilarii* (piraputanga) oriundo de ambiente natural no Pantanal Matogrossense hospedam uma nova espécie de Myxosporea (*Myxobolus oliveirai*), o qual infecta o filamento branquial.
- 2) As prevalências de *M. oliveirai* não apresentaram variações significativas entre as estações seca e chuvosa e nem entre hospedeiros machos e fêmeas.
- 3) As análises histológicas e ultraestruturais não revelaram presença de infiltrado inflamatório nos sítios de infecção.
- 4) A análise molecular (baseada no sequenciamento do gene 18S rDNA) mostrou que *Myxobolus oliveirai* difere de todas as espécies de *Myxobolus* depositadas no GenBank.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2005. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Dis Aquat Organ* 64: 229-235.
- Adriano, E.A., Arana, S., Cordeiro, N.S. 2006. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. *Parasite* 13: 137-142.
- Adriano, E.A., Arana, S., Alves, A.L., Silva, M.R.M., Ceccarelli, P.S., Henrique-Silva, F., Maia, A.A.M. 2009. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny, and histopathology. *Vet. Parasitol.* 162: 221-229
- Allen, M.B., E. P. Bergersen. 2002. Factors influencing the distribution of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in the Cache la Poudre River, Colorado. *Diseases of Aquatic Organisms* 49:51-60.
- Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L. 2010. Disparate infection patterns of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* correlate with ITS-1 sequence variation in the parasite. *Int. J. Parasitol.*, 40: 599-604.

- Bahri, S., Andree, K.B., Hedrick, R.P. 2003. Morphological and phylogenetic studies of marine Myxobolus. J. Eukaryot. Microbiol. 50, 463–470.
- Bartholomew, J. L., P. W. Reno. 2002. The history and dissemination of whirling disease. Pages 3-24 in J. L. Bartholomew and J. C. Wilson, editors. Whirling disease: Reviews and current topics. American Fisheries Society, Symposium 29, Bethesda, Maryland.
- Böhlke, J. E., Weitzman, S.H., Menezes, N. A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. Acta Amazonica, v.8, n.4, p. 657-677.
- Brassard, P., Rau, M.E., Curtis, M.A. 1982. Parasite-induced susceptibility to predation in diplostomiasis. Parasitology 85, 495–501.
- Britiski, H.A., Silimon, K.Z.S., Lopes, B.S. 2006. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Embrapa/CPAP, 2ª ed., Brasília.
- Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M.S. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Canning, E.U., Okamura, B., Curry, A. 1996: Development of a myxozoan parasite *Tetracapsula bryozoides* gen. n., sp. N. in the body cavity of *Cristatella mucedo* (Bryozoa, Phylactolaemata). Folia Parasitol. 43: 249-261.
- Canning, E. U., B. Okamura. 2004. Biodiversity and evolution of the Myxozoa. Adv. Parasitol. 56:43-141.
- Canning, E.U., Curry, A., Feist, S.W., Longshaw, M., Okamura, B. 2000. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). J. Eukaryot. Microbiol. 47, 456–468.
- Castro, R.R., Burgos, R. 1996. *Kudoa thyrsothys* (Myxozoa, Multivalvuloda) causing “milky condition” in the musculature of *Paralichthys adspersus* (Neopterygii, Pleuronectiformes, (Paralichthyidae) from Chile. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91: 163-164.
- Ceccarelli, P. S., Adriano, E. A., Santos, S. M. C., Rego, R. F., Silva, L. O. L. 2007. Levantamento qualitativo da fauna parasitológica de peixes do Pantanal Matogrossense. In Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais-Cepta (ed.), *Pesquisas patológicas e genéticas em recursos pesqueiros da Bacia do Alto Paraguai*, IBAMA, Pirassununga, p. 16-116. Ibama, Pirassununga, pp. 16–116.
- Cohen, D. M. 1970. How many recent fishes are there? Proceedings of the California Academy of Science, San Francisco, v.38, n.4, p. 341-345.

- Crowden, A.E., Boom, D.M. 1980. Effects of the eyefluke, *Diplostomum spathaceum*, on the behavior of dace (*Leuciscus leuciscus*). *Anim. Behav.* 28, 287–294.
- Current, W.L., Janovy, J. 1978 Comparative study of ultrastructure of interlamellar and intralamellar types of *Henneguya exilis* Kudo from channel catfish. *J Protozool* 25:56–65
- Eiras, J. C. 1994. Elementos de Ictioparasitologia. Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida. 339 p.
- Eiras, J.C., Malta, J.C.O., Varella, A.M.B., Pavanelli, G.C. 2005 *Myxobolus insignis* sp. n. (Myxozoa, Myxosporidia, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes: Prochilodontidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 245-247.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. 2008. *Henneguya caudicola* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp infecting South American fish. *Acta Protozool* 47: 149-154.
- Evans, N.M., Holder, M.T., Barbeitos, M.S., Okamura, B. and P. Cartwright (2010). The phylogenetic position of Myxozoa: Exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal datasets. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/msq159.
- Feist, S.W., Langdom, J.S., Longshaw, M. 2006. *Phylum myxozoa*. In PTK Woo (ed.), *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Vol. 1, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire, p. 230-296
- Fiala, I. Bartosova, P. 2010. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology* 10:228
- Grassé, P.P. 1970. Embranchement des Myxozoaires. Précis de Zoologie (Grassé, Poisson, R.a. und Tuzet, O., eds.) Vol. 1, Invertébrés, Paris, Masson
- Halliday, M.M. 1976. The biology of *Myxosoma cerebralis*; the causative agent of whirling disease of salmonids. *J Fish Biol* 9. 339-357
- Hedrick, R. P., M. El-Matbouli, M. A., Adkison, E. MacConnell. 1998. Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews* 166:365-376.
- Hofer, B. 1903. Ueber die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 28:7-8.
- Hoffman, G. L., C.E. Dunbar, A. Bradford. 1962. Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report, Fisheries No. 427.
- Hoffman, G. L. 1990. *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 2:30–37.

- Hoffmann, R.W., Korting, W., Fischer-Scherl, T. Schauer, W. 1990. An outbreak of *Bucephalus polymorphus* in fish of the Main River. *Angewandte Parasitologie* 31, 95–99.
- I.B.G.E. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. Atlas geográfico escolar. 2 ed. Rio de Janeiro. 203 p.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis 2008. *Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*, IBAMA, Brasília, 181 pp.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2009). *Estatística da pesca 2007 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*. Brasília: Ibama, 175 p.
- Jiménez-Guri, E., H. Philippe, B., Okamura, and P. W. H. Holland. 2007. *Buddenbrockia* is a cnidaria or not? *Science* 317:116-118.
- Kennedy, C.R. 1994. Foreword. In: Pike, A.W., Lewis, J.W. (Eds.), *Parasitic Diseases of Fish*. Samara Publishers, Tresaith, Dyfed, UK, pp. 1–2.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Dessler, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E., Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48: 395-413.
- Kent, M.L., Margolis, L., Corliss, J.O. 1994. The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grassé, 1970, *Canadian Journal of Zoology* 72: 932-937
- Kovács-Gayer É., Molnár K. 1983. Studies on the biology and pathology of the common carp parasite *Myxobolus basilemellaris* Lom et Molnár, 1983 (Myxozoa: Myxosporea). *Acta Vet. Hung.* 31:91-102.
- Kumaraguru, A.K., Beamish, F.W.H., Woo, P.T.K. 1995. Impact of a pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* on the metabolism, and swimming performance of rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 18, 297–305.
- Langdon, J.S. 1991. Myoliquefaction post-mortem ('milky flesh') due to *Kudoa thyrsites* (Gilchrist) (Myxoporea) in mahi mahi, *Coryphaena hippurus* L. *J. Fish Dis.*, 14: 45-54.
- Lom J., Molnar, K. 1983. (Myxozoa: Myxosporea). *Acta Vet. Hung.* 31: 91 D 102.
- Lom J., Dyková, I. 1995. Myxosporea (Phylum Myxozoa) in Woo, P.T.K. (ed.), *Fish Diseases and Disorders Protozoan and Metazoan Infections*. UK. CAB International, 1: 97-148.
- Lom, J. 1987. Myxosporea: A new look at a longknown parasite of fish. *Parasitology Today* 3:327-332.

- Lom, J. Arthur, J.R. 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J. Fish Dis.*, Oxford, 12: 151-156.
- Lom, J., and I. Dykova. 1992. Fine structure of triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and actinosporean features compared. *Journal of Protozoology* 39:16-27.
- Lundberg, J. G., Kottelat, M., Smith, G. R., Stiassny, M.L.J., Gill, A.C. 2000. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Saint Louis, v.87, n.1, p. 26-62.
- Markiw, M. E., Wolf, K. 1983. *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *Journal of Protozoology* 30:561- 564.
- Martins, M.L., de Souza, V.N., de Moraes, J.R., de Moraes, F.R. 1999. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, histopathology and treatment. *Rev Bras Biol* 59: 527-534.
- Martins, M.L., Souza, V.N., Moraes, F.R., Moraes, J.R.E., Costa, A.J., Rocha, U.F. 1997. Pathology and behavioral effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive *pacu* *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. *J World Aquac Soc* 28: 297-300.
- Mateus, L.A.F., Penha, J.M.F., Petrere, M. 2004. Fishing resources in the rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 2, 217–227.
- McDowell, R. M. 1997. The evolution of diadromy in fishes (revisited) and its place in phylogenetic analysis. *Reviews In fish Biology And Fisheries*, v.7, n.4, p. 443-462.
- Molnar, K., Eszterbauer, E., Szekely C., Dan, A., Harrach, B. 2002. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *Journal of Fish Diseases* 25:643-652.
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A.A.M., Ceccarelli, P.S., Tavares, L.E.R., Borges, F.A., Pozo, C.F., Adriano, E.A. 2009. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure. *Vet. Parasitol.*, 166: 52–59.
- Nehring, R. B., P. G. Walker. 1996. Whirling disease in the wild: The new reality in the Intermountain West. *Fisheries* 21:28-30.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. 4rd ed. New York: John Wiley & Sons. 622 p.
- Nickum, D. 1999. Whirling disease in the United States: A summary of progress in research and management. Trout Unlimited, Arlington, Virginia.

Noga, E.J. 2000. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Ames, IA: Iowa State University Press.

PESCABRASIL. <http://www.pescabrasil.com.br/especies/piraputanga.htm> (acessado em 09/11/2010).

Resende EK 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the upper Paraná Basin. In J Carolsfeld, B Harvey, C Ross, A Baer (eds.), *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*, IDRC, Ottawa, 372 pp.

Rognlie, M. C., S. E. Knapp. 1998. *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* from a whirling disease epizootic in Montana. Journal of Parasitology 84:711-713.

Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Cone, D. M. Desser, S. S. 1995. The demise of a phylum of protists. Phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. J. of Parasitol. 81:961-967.

Silva, M.P., Mauro, R.A., Mourão, G.M. & Coutinho, M.E. 2000. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. Rev. Bras. Bot. 23(2):143-152.

Sitjá-Bobadilla, A. 2008. Fish immune response to myxozoan parasites. Parasite 15, 420-425.

Uspenskaya AV (1982) New data on the cycle and biology of myxosporidia. Arch Protistenkd 126:309-338

Steinbach Elwell, L.C., K.E. Stromberg, E.K.N. Ryce, J.L. Bartholomew. 2009. Whirling Disease in the United States: A Summary of Progress in Research and Management.

Vari, R. P. & L. R. Malabarba. 1998. Neotropical ichthyology: an overview. In: L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. pp. 1-11. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Vincent, E. R. 1996. Whirling disease and wild trout: The Montana experience. Fisheries 21:32-33.

Williams, H.H., Jones, A. 1994. Parasitic worms of fish. Taylor and Francis, London, 593 pp. Folia Parasitológica 41:38

Wolf, K., Markiw, M.E. 1984: Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225: 1449-1452.

Woo, P.T.K., 1995. Fish diseases and disorders. vol. I. Protozoan and metazoan infections. CAB International, Oxon, UK, 808 pp.

Yokoyama, H., Inoue, D., Kamamaru, A. and Wakabayashi, H. 1997. *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporidia) form large- and small-type 'cysts' in the gills of common carp. Fish Pathol. 32 , 211-217.