

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMANDA MURAROLLI RIBEIRO MARINHO

Identificação e filogenia de novas espécies de mixozoários (Cnidaria:
Myxozoa) parasitas de peixes ornamentais de ambientes naturais brasileiros

Pirassununga

2023

AMANDA MURAROLLI RIBEIRO MARINHO

**Identificação e filogenia de novas espécies de mixozoários (Cnidaria:
Myxozoa) parasitas de peixes ornamentais de ambientes naturais
brasileiros**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

Co-Orientadora: Dra. Suellen Aparecida Zatti

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação,
FZEA/USP, com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

M338i Marinho, Amanda Murarolli Ribeiro
 Identificação e filogenia de novas espécies de
mixozoários (Cnidaria: Myxozoa) parasitas de peixes
ornamentais de ambientes naturais brasileiros /
Amanda Murarolli Ribeiro Marinho ; orientador
Antonio Augusto Mendes Maia ; coorientador Suellen
Aparecida Zatti. -- Pirassununga, 2023.
 101 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Myxozoa . 2. Parasitas de peixes . 3. Peixes
ornamentais . 4. SSU rDNA. 5. LSU rDNA. I. Maia,
Antonio Augusto Mendes, orient. II. Zatti, Suellen
Aparecida, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
SCAPACADIN/CEUA

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo - FZEA/USP

Comissão de Ética no Uso de Animais

Pirassununga, 09 de setembro de 2021
CEUA N 9975090921

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 322.324.706-87

Título da proposta: Sistemática, distribuição e aspectos evolutivos de espécies de mixozoários (Cnidaria: Myxozoa) parasitos de peixes ornamentais de ambientes naturais brasileiros

Responsável: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Equipe: Amanda Murarolli Ribeiro , Suellen Aparecida Zatti

Telefone: 19997589843 e-mail: antomaia@usp.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ("<https://www.usp.br/ceufazea>") por meio da sua senha de acesso.

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
SCAPACADIN/CEUA



Prof. Dra. Luciane Silva Martello
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Ciência e inovação da fazenda à mesa

CEUA N: 9975090921

Título: "Sistemática, distribuição e aspectos evolutivos de espécies de mixozoários (Cnidaria: Myxozoa) parasitos de peixes ornamentais de ambientes naturais brasileiros "

Pesquisador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia
Área: Medicina Veterinária

HISTÓRICO DE ENVIO

SUBMETIDO: 07/09/2021

RECEBIDO EM: 09/09/2021

HISTÓRICO DE AVALIAÇÃO DA PROPOSTA INICIAL

28/12/2021 : APROVADO - Esta CEUA FZEA aprova o desenvolvimento do projeto. (REUNIÃO, COLEGIADO)

AMANDA MURAROLLI RIBEIRO MARINHO

**Identificação e filogenia de novas espécies de mixozoários (Cnidaria: Myxozoa)
parasitas de peixes ornamentais de ambientes naturais brasileiros**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

Co-Orientadora: Dra. Suellen Aparecida Zatti

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia (Presidente)

Instituição: Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Presidente

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Instituição: Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Dra. Kassia Roberta Hygino Capodifoglio

Instituição: Universidade de São Paulo - USP

Dra. Juliana Naldoni

Instituição: Universidade de Cambridge

Dr. Eduardo Makoto Onaka

Instituição: Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento do Pescado Continental - Instituto de Pesca

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”

(Madre Teresa)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, por colocar sonhos em meu coração e me dar força para conquistá-los.

À minha família, pelo amor e suporte. Aos meus pais, Lucilena e Odercino e meu irmão Gabriel por me incentivarem e comemorarem minhas vitórias.

Ao meu marido Fábio, pelo companheirismo, por sonhar comigo, por me incentivar e não me deixar desistir nunca.

Em especial aos meus amados filhos, minhas bençãos de Deus. Matheus Kauã, por ser minha inspiração diária e minha bebê Lorena, minha menina que está a caminho.

Ao meu avô João, que partiu neste meu último ano de doutorado, e que tanto cuidou e me incentivou nos estudos.

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, pela orientação e suporte desde minha Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado, por compartilhar seu conhecimento, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Dra. Suellen Aparecida Zatti, por todos esses anos de coorientação e suporte. Mesmo quando estávamos a mais de 8 mil quilômetros de distância você esteve presente para me ajudar.

Aos Dr. Tiago Milanin, pela coorientação informal, amizade em todos os momentos dessa pesquisa.

À Dra. Márcia Ramos Monteiro da Silva, atualmente aposentada do cargo de especialista do laboratório, mas ainda muito presente em minha vida acadêmica e pessoal.

À minha amiga Caroline Munhoz Meira, companheira de laboratório e dos perrengues da Pós-graduação que sempre me apoiou em todo o processo. Sabemos que as dificuldades neste nosso meio são enormes, as alegrias são muitas, mas muitas são as preocupações, dificuldades e frustrações, obrigada estar presente em toda essa jornada.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização da minha Pós-graduação.

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

MARINHO, A.M. R. **Identificação e filogenia de novas espécies de mixozoários (Cnidaria: Myxozoa) parasitas de peixes ornamentais de ambientes naturais brasileiros.** 2023. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

RESUMO

Myxozoa (Cnidaria: Endocnidozoa) é um grande grupo de endoparasitas amplamente difundidos, com ciclos de vida complexos e obrigatoriamente microscópicos. Com mais de 2.600 espécies descritas, os mixozoários constituem um grupo extremamente diversificado, capaz de infectar diversos tecidos e órgãos de vertebrados, com ênfase em peixes. Muitos mixozoários ainda permanecem desconhecidos, e seu potencial patogênico em alguns casos permanece indeterminado. Esse trabalho teve por objetivo investigar a diversidade e potencial patogênico de mixozoários encontrados em peixes ornamentais oriundos da bacia Amazônica. Foram analisados exemplares de *Corydoras agassizii* Steindachner, 1876, *Corydoras schwartzi* Rössel, 1963 e *Paracheiroidon axelrodi* Schultz, 1956 oriundos do rio Nhamundá, Amazonas, Brasil. Análises morfológicas (microscopia de luz), moleculares com sequenciamento dos genes SSU rDNA, ITS-1 e LSU rDNA, subsequentes inferências filogenéticas, foram os procedimentos utilizados. Esta tese foi organizada na forma de capítulos, sendo que no primeiro é apresentado o estudo de duas espécies de mixozoários encontrados infectando o gênero *Corydoras* Lacépède, 1803. *Myxobolus* n. sp. 1 infectando os arcos branquiais de *C. agassizii* e *Henneguya* n. sp. 1 nos filamentos branquiais de *C. schwartzi*, as quais foram consideradas como espécies ainda não descritas. O segundo capítulo trata se de um estudo que tem como base análises morfológicas e sequenciando dos genes ribossômicos de uma nova espécie do gênero *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992, o *Myxobolus* n. sp. 2 foi encontrado parasitando o cérebro de *P. axelrodi*. Os dados morfológicos e moleculares destas três novas espécies são aqui apresentados. A diversidade de mixozoários encontrados nas espécies de peixes ornamentais de grande importância no comércio internacional ressalta a necessidade de se intensificar o estudo da diversidade e do potencial patogênico desses parasitas, tanto nos seus habitats naturais quanto em relação ao risco de infecção para as populações de peixes para os quais são exportados.

Palavras-chave: SSU rDNA; LSU rDNA; Amazonas; *Henneguya*; *Myxobolus*.

MARINHO, A.M. R. **Identification and phylogeny of new myxozoan species (Cnidaria: Myxozoa) parasites of ornamental fish from Brazilian natural environments.** 2023. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

ABSTRACT

Myxozoa (Cnidaria: Endocnidozoa) is a large group of widely distributed endoparasites with complex and obligatorily microscopic life cycles. With over 2.600 described species, myxosporeans constitute an extremely diverse group capable of infecting various tissues and organs of vertebrates, with an emphasis on fish. Many myxosporeans still remain unknown, and their pathogenic potential in some cases remains undetermined. This study aimed to investigate the diversity and pathogenic potential of myxosporeans found in ornamental fish from the Amazon Basin. Specimens of *Corydoras agassizii* Steindachner, 1876, *Corydoras schwartzi* Rössel, 1963, and *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956, originating from the Nhamundá River, Amazonas, Brazil, were analyzed. Morphological analysis (light microscopy) and molecular analysis with sequencing of the SSU rDNA, ITS-1, and LSU rDNA genes, followed by phylogenetic inferences, were the procedures used. This thesis is organized in the form of chapters, with the first chapter presenting the study of two species of myxosporeans found infecting the genus *Corydoras* Lacépède, 1803. *Myxobolus* n. sp. 1 infecting the gill arches of *C. agassizii* and *Henneguya* n. sp. 1 in the gill filaments of *C. schwartzi*, both of which were considered undescribed species. The second chapter focuses on a study based on morphological analysis and sequencing of ribosomal genes of a new species of the genus *Myxobolus* Lom & Dykova, 1992. *Myxobolus* n. sp. 2 was found parasitizing the brain of *P. axelrodi*. The morphological and molecular data of these three new species are presented here. The diversity of myxosporeans found in ornamental fish species of great importance in international trade highlights the need to intensify the study of the diversity and pathogenic potential of these parasites, both in their natural habitats and in terms of the risk of infection for the fish populations to which they are exported.

Keywords: SSU rDNA; LSU rDNA; Amazon; *Henneguya*; *Myxobolus*.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Localização do Rio Nhamundá e rios adjacentes na bacia Amazônica, Amazonas, Brasil. A inserção mostra a região Amazônica mais ampla.19
- Figura 2.** *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 coletado no Rio Nhamundá, Nhamundá, Amazonas21
- Figura 3.** *Corydoras* spp. coletadas no rio Nhamundá, Nhamundá, Amazonas. A. *Corydoras agassizii* Steindachner, 1876 B. *Corydoras schwartzi* Rossel, 196322
- Figura 4.** Ciclo de vida dos mixozoários A. Peixes infectados (hospedeiro vertebrado) B. Mixósporo liberado na água pelo peixe C. Oligoqueta (hospedeiro invertebrado) D. Actinosporo liberado na água pelo oligoqueta26

Capítulo 1. Two novel myxosporean (Cnidaria: Myxozoa) infecting *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriforme: Callichthyidae) from the Nhamundá river

- Figure. 1** Schematic representation of the myxospores of myxosporean *Myxobolus* parasite of *Corydoras* spp. from the Amazon basin. *Myxobolus* n. sp. 1 parasite of the branchial arch of *Corydoras agassizii*. Scale bar = 5 µm.44
- Figure. 2** Photomicrographs of mature myxospores of *Myxobolus* n. sp. 1, parasite of the branchial arch of *Corydoras agassizii* from the Amazon basin. **A.** Numerous spores after plasmodium rupture. **B.** Frontal view of *Myxobolus* n. sp. 1 found infecting the branchial arch. Note the polar capsule (black arrow). Scale bar = 5µm.44
- Figure. 3** Photomicrographs of mature myxospores of *Henneguya* n. sp. 1, parasite of the gill filament of *Corydoras schwartzi*. **A.** Mature myxospore. **B.** Numerous myxospores after plasmodium rupture. Scale bar = 5 µm49
- Figure. 4** Schematic representation of the myxospores of myxosporean *Henneguya* parasite of *Corydoras* spp. from the Amazon basin. *Henneguya* n. sp. 1 parasite of the gill filaments of *Corydoras schwartzi*. Scale bar = 5 µm.50
- Figure. 5** Maximum likelihood tree inferring phylogenetic relationship between *Myxobolus* n. sp. 1 n. sp. 1 and closely-related myxobolids basead on the analysis of SSU rDNA sequences. The above nodes indicate confidence levels. Dashed are shown for values under 50%.61

Capítulo 2. *Myxobolus* n. sp. 2 (Myxosporea: Myxobolidae) a parasite infecting the brain of the neon tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei:Characidae) from Brazilian Amazon

- Figure. 1** Photomicrographs of mature *Myxobolus* n. sp. 2, parasite of the brain of *Paracheirodon axelrodi* from the Amazon basin. **A.** Frontal view of *Myxobolus* n. sp. 2 found infecting the branchial arch. Note the polar capsule (white arrow). **B.** Numerous spores after plasmodium rupture. Scale bar = 5µm.76
- Figure. 2** Schematic representation of the mature spore of *Myxobolus* n. sp. 2 parasitizing the brain of *Paracheirodon axelrodi*. Scale bar = 5 µm.77
- Figure. 3** Maximum Likelihood phylogenetic tree basead on partial SSU rDNA sequences showing the position of *Myxobolus* n. sp. 2 among other myxosporean species

present in GenBank. The numbers above the nodes indicate bootstrap confidence values.
Dashes (-) indicate values below 50%.....86

Lista de Tabelas

Capítulo 1. Two novel myxosporean (Cnidaria: Myxozoa) infecting *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriforme: Callichthyidae) from the Nhamundá river

Table 1. Primers used in this study for amplification and DNA sequencing of the SSU rDNA and LSU rDNA genes and ITS-1.....42

Table 2. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* species described from the Amazon basin. Dimensions are given in micrometers (μm) and expressed as mean \pm standard deviation followed by range in parentheses. Myxospore spore length (ST), myxospore spore width (SW), myxospore spore thickness (T), polar capsule length (CL), polar capsule width (CW), number of polar filament coils (NCF), dashes (--) no data..46

Table 3. Comparative data of myxospore dimensions of all *Henneguya* species described from the Amazon basin. Dimensions are given in micrometers (μm) and expressed as mean \pm standard deviation followed by range in parentheses. Total myxospore length (TL), myxospore body length (BL), caudal appendage length (Appl), myxospore width (W), myxospore thickness (T), polar capsule length (CL), polar capsule width (CW), number of polar filament coils (NF), dashes (--) no data.52

Table 4. Comparative DATA of the genetic identity of ssrDNA of *Henneguya* spp. parasites of the Amazonian ornamental fish. The area above the diagonal shows % pairwise distance identity. The area below the diagonal shows nucleotide differences..60

Capítulo 2. *Myxobolus* n. sp. 2 (Myxosporea: Myxobolidae) a parasite infecting the brain of the neon tetra *Paracheirodon axeroldi* (Teleostei:Characidae) from Brazilian Amazon

Table 1. Primers used in this study for amplification and sequencing of the SSU rDNA and LSU rDNA genes.73

Table 2. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* n. sp. 2 with those of other *Myxobolus* spp. species from South America and more specifically those infecting fish from the Order Characiformes. All dimensions are given in μm . Spore length (L), spore width (W), spore thickness (T), polar capsule length (PCL), polar capsule width (PCW), number of turns in the polar filament (NT).78

Table 3. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* n. sp. 2 with those of other *Myxobolus* spp. species from around the world that have been described infecting the brain of vertebrate hosts is presented below. All dimensions are given in μm . Spore length (L), spore width (W), spore thickness (T), polar capsule length (PCL), polar capsule width (PCW), number of turns in the polar filament (NT).....82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Aquarismo	15
1.2 Produção brasileira de Peixes Ornamentais	17
1.3 Rio Nhamundá	19
1.4 Espécies de peixes ornamentais amazônicas	20
1.4.1 <i>Paracheiroidon axelrodi</i>	20
1.4.2 <i>Corydoras</i> spp.	22
1.5 Parasitas de peixes.....	23
1.6 Mixozoários (Cnidaria: Myxozoa).....	24
1.7 Estudo de Myxozoa no Brasil	28
1.8 Marcadores moleculares de importância em estudos de Myxozoa ...	29
2. HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5. RESULTADOS.....	34
Capítulo 1. Two novel myxosporean (Cnidaria: Myxozoa) infecting <i>Corydoras</i> Lacépède, 1803 (Siluriforme: Callichthyidae) from the Nhamundá river.....	35
Capítulo 2. <i>Myxobolus</i> n. sp. 2 (Myxosporea: Myxobolidae) a parasite infecting the brain of the neon tetra <i>Paracheiroidon axelrodi</i> (Teleostei: Characidae) from Brazilian Amazon	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
7. REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aquarismo

Os peixes representam o grupo mais antigo de vertebrados, com a primeira linhagem evolutiva surgindo há mais de 500 milhões de anos. Considerados o grupo mais diversificado de vertebrados, o sucesso evolutivo dos peixes pode ser atribuído às fascinantes adaptações anatômicas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas que desenvolveram, permitindo sua adaptação a uma ampla gama de habitats aquáticos. Atualmente, a diversidade de espécies de peixes é estimada em cerca de 25.000, correspondendo a mais da metade das espécies de vertebrados existentes hoje em dia (Pough, Janis e Heiser, 2008; Zuanon *et al.* 2015).

O aquarismo ou aquariofilia é uma prática milenar que envolve a criação de peixes, o cultivo e a manutenção de plantas e outros organismos aquáticos em aquários ou tanques com finalidade exclusivamente ornamental (Botelho Filho, 1990). Existem vários relatos e registros históricos que evidenciam essa atividade datada de épocas anteriores ao nascimento de Cristo (Mills, 1998). Embora tenha raízes antigas, foi na década de 1950 que o comércio global dessa prática teve início, impulsionado por uma série de inovações tecnológicas. Desde então, a criação de organismos aquáticos ornamentais se tornou amplamente difundida em todo o mundo, ganhando destaque e um desenvolvimento significativo (Bartley, 2000; Sampaio e Nottingham, 2008).

Atualmente, o aquarismo é uma prática amplamente apreciada por pessoas em todo o mundo, resultando em uma expansão crescente do comércio de peixes ornamentais em mais de 125 países (Stevens *et al.* 2017). Dados estatísticos indicam que mais de 4.500 espécies de peixes de água doce e 1.450 espécies de peixes marinhos são comercializadas no mercado internacional de peixes ornamentais. Essa variedade impressionante reflete a demanda global por peixes ornamentais e a diversidade exuberante disponível para os entusiastas do aquarismo (Tlusty *et al.* 2013; Tavares-Dias, 2020).

Os peixes ornamentais são considerados uma das opções mais populares de animais de estimação em todo o mundo, sendo estimado em 655,8 milhões de unidades, superando cães (360,8 milhões), gatos (271,9 milhões), aves (200,5 milhões), répteis e pequenos mamíferos (70,5 milhões) (APEX-Brasil, 2016). Essas espécies apresentam diversas vantagens em comparadas com outros animais de estimação, como a facilidade de

manutenção, baixa demanda por espaço e necessidade comparativamente menor de interação. Devido a essas características atrativas, países como os Estados Unidos importam anualmente mais de US\$ 56 milhões em peixes ornamentais, enquanto o Japão importa mais de US\$ 16 milhões. Estima-se que esses números continuem a crescer exponencialmente, demonstrando o interesse e a demanda crescente por esses animais em todo o mundo (International Trade Centre, 2018).

Esse segmento experimentou um notável crescimento nos últimos anos, especialmente durante a pandemia da COVID-19. De acordo com os dados recentes divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a criação de peixes ornamentais no Brasil se tornou o passatempo de mais de 11 milhões de pessoas. Esse número expressivo reflete o aumento do interesse e envolvimento das pessoas com a criação de peixes ornamentais como uma atividade prazerosa e relaxante. (Aquaculture Brasil, 2022).

1.2 Produção brasileira de Peixes Ornamentais

O Brasil é amplamente reconhecido por sua biodiversidade aquática excepcional, abrigando uma imensa variedade de espécies nativas com formas e cores chamativas e atrativas. Essa diversidade única é altamente valorizada no comércio de organismos ornamentais e na prática da aquariofilia (Sampaio e Nottingham, 2008). Nas várias bacias hidrográficas do país, é possível encontrar uma grande diversidade de espécies de peixes capturadas em rios e exportadas para diferentes partes do mundo. Essas espécies nativas possuem um potencial ornamental incrível e atendem tanto ao mercado externo quanto ao mercado interno (Moro *et al.* 2013).

Embora o Brasil já tenha ocupado a posição de maior exportador mundial de peixes ornamentais no passado, atualmente ocupa a 14ª posição nesse ranking. No entanto, o país continua desempenhando um papel significativo no comércio global desses animais devido à sua impressionante diversidade de espécies e à alta qualidade dos exemplares capturados. A indústria de exportação de peixes ornamentais no Brasil é uma importante fonte de renda e contribui para a valorização e conservação da rica biodiversidade aquática brasileira (Rezende e Fujimoto, 2021).

Mais de 60% dos peixes ornamentais utilizados na indústria global são de origem dulcícola, e muitos desses exemplares são provenientes de sistemas de criação. No entanto, é importante mencionar que ainda há um número significativo de organismos coletados diretamente da natureza (Dey, 2016; Tavares-Dias, 2020). No Brasil, mais da metade das espécies ornamentais de água doce provém da captura direta em ambientes naturais, sendo a bacia Amazônica a principal região de coleta de peixes ornamentais em seu habitat natural em todo o mundo (Tavares-Dias, 2020).

Os peixes ornamentais provenientes da bacia Amazônica despertam um imenso interesse em aquaristas de todo o mundo, devido à sua extraordinária diversidade de fauna. Essa região abriga a maior biodiversidade de peixes do planeta, com uma infinidade de tipos, tamanhos e padrões de coloração que encantam os amantes da aquariofilia (Ferreira *et al.* 2017; Rezende e Fujimoto, 2021). A quantidade exata de espécies de peixes na Amazônia ainda é desconhecida, mais estimativas apontam para um número impressionante, variando de 1,5 a 6 mil espécies. É importante destacar que muitas dessas espécies são ainda desconhecidas para ciência, o que demonstra a imensidão do potencial de descoberta e estudo da região (Magalhães, 2007).

Embora alguns artigos mencionem a existência de mais de 3.600 espécies de peixes utilizadas globalmente no aquarismo e para fins ornamentais, no Brasil a legislação (Instrução Normativa Interministerial MPA-MMA N° 001/2012) autoriza o comércio e a aquariofilia de 725 espécies nativas de peixes, dentre as mais de 4 mil catalogadas na fauna local (Lévêque *et al.* 2008; Brasil, 2014, 2018).

A comercialização de peixes ornamentais na região da Amazônia desempenha um papel de extrema importância econômica local, sendo uma das principais atividades responsáveis pela subsistência e manutenção de muitas pequenas comunidades pesqueiras em cidades do Brasil e outros países sul-americanos, como Colômbia, Peru, Guiana, Bolívia e Equador (Benzaken *et al.* 2015; Araújo *et al.* 2017). Essa atividade representa uma fonte de oportunidades e geração de empregos diretos e indiretos para milhares de pessoas na Amazônia, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de outros países em desenvolvimento da região (Tavares-Dias, 2020).

Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a pesca ornamental é reconhecida como uma das atividades extrativistas mais sustentáveis na região Amazônica, em comparação a outras práticas que causam danos significativos

ao ambiente a curto e longo prazo (Santos *et al.* 2021). Um fator importante que contribui para o sucesso dessa atividade é a diversidade de habitats onde os peixes ornamentais são encontrados. Muitas espécies são capturadas em áreas rasas próximas às margens, bancos de areias, lagos superficiais e até mesmo em igarapés de pequenas dimensões, o que facilita sua captura. Outra particularidade são os métodos e equipamentos de captura frequentemente rudimentares e artesanais, envolvendo mão de obra autônoma local (Zuanon *et al.* 2015).

Para atender à crescente demanda mundial por peixes ornamentais, uma extensa rede de atividades voltadas para produção e comércio internacional desses organismos tem se desenvolvido ao longo dos anos. Os investimentos estão concentrados principalmente na pesca extrativista, mas também incluem a produção em ambientes controlados de várias espécies nativas do Brasil, consideradas de grande interesse global, tanto por aquicultores brasileiros e quanto por de outros países (Tlusty, 2004). Espécies como o *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Tetra-neon), o *Pterophyllumspp scalare* Schultze, 1823 (Acará Bandeira), o *Symphysodon discus* Pellegrin, 1904 (Acará-disco) e *Potamotrygon leopoldi* Castex e Castello 1970 (Arraias), que eram predominantemente exportadas por países sul-americanos, passaram a ser produzidas em escala comercial juntamente com outras espécies e sub-espécies (Tlusty, 2002, 2004; Chuquipiondo, 2007; Lima *et al.* 2013).

A produção em larga escala de organismos aquáticos em sistemas de criação requer atenção em relação aos aspectos sanitários. Microrganismos como vírus, bactérias e parasitas de diferentes grupos taxonômicos representam uma ameaças significativa para a produção local e também podem representar riscos para as populações nativas de peixes. A introdução e disseminação de patógenos em sistemas aquícolas podem ter efeito devastadores sobre as espécies de peixes nativos suscetíveis (Hallet *et al.* 2015; Mathews, 2016a, 2018).

O comércio de peixes ornamentais, assim como outros comércios semelhantes, desempenha um papel significativo na disseminação e introdução de parasitas de peixes. Parasitas são importados juntamente com peixes ornamentais, o que pode representar riscos tanto para as populações de peixes nativas quanto para a indústria da aquicultura (Tavares-Dias *et al.* 2009). Vários relatos na literatura destacam que a exportação de peixes ornamentais serve como uma porta de entrada para ecto e endoparasitas, acarretando sérias consequências para os sistemas de produção, o ambiente natural e as

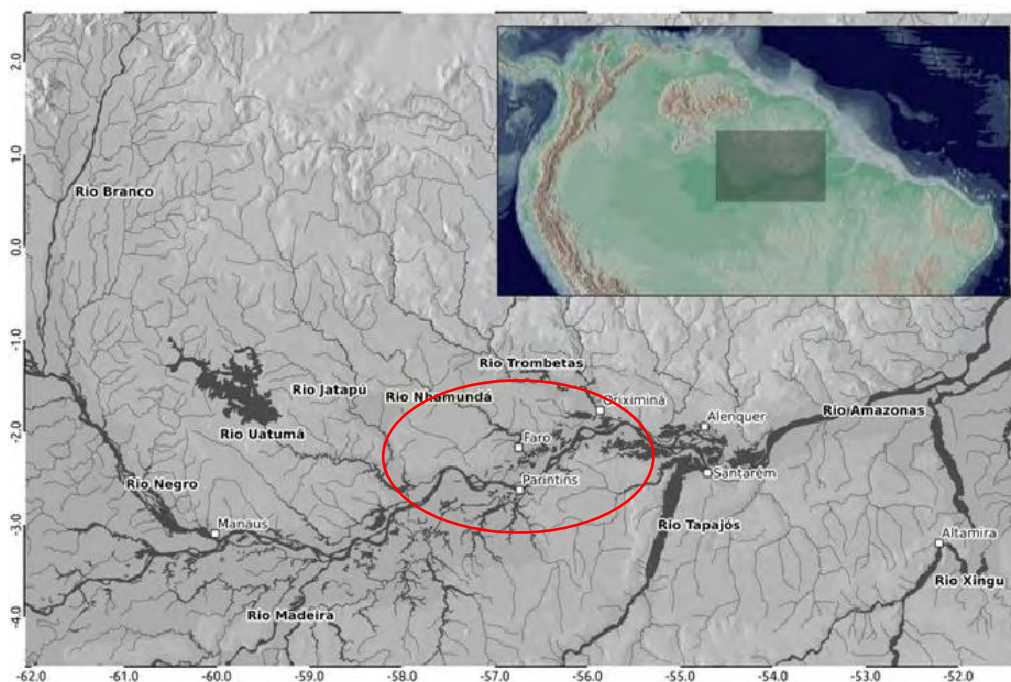
populações de peixes dos países para os quais são exportados (Moravec, Wolter e Körting 1999; Evans e Lester, 2001; Kim *et al.* 2002).

1.3 Rio Nhamundá

O rio Nhamundá é um dos afluentes do Escudo das Guianas que drenam para o sul do Rio Amazonas, Brasil. O rio localiza-se entre os rios Uatumã-Jatapu e Trombetas, e compreende a divisa administrativa entre os estados do Amazonas e do Pará (Carvalho de Lima e Araújo-Lima, 2004) (Figura 1.). É um dos principais rios da região Amazônica, no entanto, pouco conhecido, sendo um importante meio de transporte e fonte de subsistência para as comunidades ribeirinhas que vivem às suas margens (Collins *et al.* 2015).

A ictiofauna dos rios do sul do Escudo das Guianas é pouco conhecida em comparação com os rios do norte do Brasil (Lujan e Armbruster, 2011; Collins *et al.* 2015), e até o presente poucos estudos científicos foram feitos nessa área, com exceção do rio Trombetas, que tem sido extensivamente pesquisado ao longo de vários anos (Ferreira, 1993; Campos, 2018; Garcia-Ayala e Benine, 2020).

Figura 1. Localização do Rio Nhamundá e rios adjacentes na bacia Amazônica, Amazonas, Brasil. A inserção mostra a região Amazônica mais ampla.



Fonte: Mapa criado no QGIS (<http://www.qgis.org/>).

1.4 Espécies de peixes ornamentais amazônicas

A exportação de peixes ornamentais da região Amazônica anualmente, corresponde a cerca de 88% dos peixes de água doce do Brasil (Gadelha, 2010; Araújo *et al.* 2017; Ferreira *et al.* 2020). Dentre os principais peixe capturados e comercializados, destaca o *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904 (Acará-discus) como a primeira espécie, e depois outras espécies tais como: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Cardinal tetra), *Hyphessobrycon erythrostigma* Fowler, 1943 (Rosacéo), *Carnegiella strigata* Günther, 1864 (Borboleta), *Corydoras ssp.* Lacépède, 1803 (Coridoras), *Anostomus taeniatus* Günther, 1864 (Lápis), *Pterophyllum scalare* Schultze, 1823 (Acará-bandeira), *Ancistrus spp.* Steindachner, 1911 (Bodó), *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Arraia-pintada) (Rezende e Fujimoto, 2021).

Segundo dados da Secretaria de Pesca do Amazonas (2019), a média de volume exportado anualmente chegou a mais 3 milhões de indivíduos. Adicionalmente, os pescadores que desenvolvem esse tipo de pesca relataram que as principais espécies exportadas são: tetra-neon cardinal (80%), carás, acará-discus, coridoras, borboletas e bodós. Os principais destinos são a Alemanha, China, EUA, Taiwan e Japão. Esse mercado, no estado, movimentou em torno de R\$ 5 milhões de reais anualmente (CIEAM, 2018).

1.4.1 *Paracheirodon axelrodi*

O gênero *Paracheirodon* Géry, 1960 é representado por três espécies: *P. axelrodi* (Schultz, 1956), *P. innesi* (Myers, 1936) e *P. simulans* (Géry, 1963), as espécies do gênero são intensamente exploradas no comércio de peixes ornamentais (Anjos *et al.* 2009; Ferreira *et al.* 2020).

Paracheirodon axelrodi é conhecido popularmente como Tetra Neon Cardinal, Tetra Neon, Cardinal ou Tetra Cardinal. É nativo principalmente da América do Sul, mas são distribuídas na América Central e norte da América do Norte (Mills e Vevers, 1982; Beheregaray *et al.* 2010). É um dos peixes ornamentais mais conhecidos do mundo, um verdadeiro clássico do aquarismo de água doce (EMBRAPA, 2021).

É um pequeno peixe ornamental, que pode alcançar entre 2,0 a 5,0 cm de comprimento total. Com relação ao hábito alimentar, são onívoros, embora consumam

vermes e pequenos crustáceos e tem o hábito de formar cardumes (FishBase, 1999). Endêmico da bacia Amazônica, onde é encontrado em igarapés de florestas inundáveis, em áreas rasas, sombreadas e com pouca correnteza (Geisler e Annibal, 1986). Tem como principais características a cores, coloração corporal avermelhada e ventral azul, que se estende da nadadeira adiposa aos olhos, o que atrai os aquaristas e são considerados animais apreciados na ornamentação (Tavares-Dias *et al.* 2009).

Esta espécie tem grande importância econômica para o Estado do Amazonas, sendo responsável por mais de 80% dos 30-40 milhões de peixes ornamentais vivos exportados anualmente da região para o mundo (Chao, 2001). Apesar disso, levantamentos parasitológicos ou relatos de espécies parasitárias individuais de *Paracheirodon* spp. são limitados, pouco se conhece sobre sua parasitofauna, especialmente os que dizem respeito a parasitas mixozoários (Evans e Lester, 2001; Novotný e Dvořák, 2006; Honglo e Jansson, 2009). De acordo com dados da literatura, apenas uma espécie de mixozoários foi descrita infectando esse peixe, o *Myxobolus axelrodi* Camus *et al.* 2017 parasitando o cérebro e as retinas de espécimes desse peixe. Segundo a EMBRAPA (2021) o tetra é a principal espécie dentro dos dez principais grupos de espécies de peixes ornamentais exportados pelo Brasil.

Figura 2. *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 coletado no rio Nhamundá, Nhamundá, Amazonas.



Fonte: Elaborado pela autora.

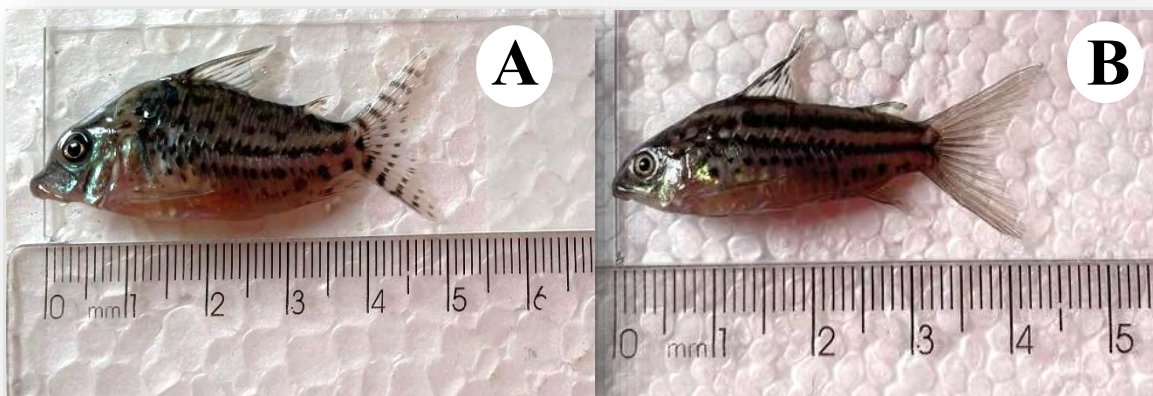
1.4.2 *Corydoras* spp.

Corydoras Lacépède, 1803 são peixes Siluriformes distribuídos em parte da América do Sul e Central, mas são mais abundantes na bacia do rio Amazonas. Possuem grande diversidade com aproximadamente 180 espécies válidas, o que o torna o gênero mais rico em espécies da família Callichthyidae e também da Ordem Siluriformes (Lima e Britto, 2020 ; Tencatt *et al.* 2023; Fricke *et al.* 2023).

Em geral, *Corydoras* spp. são peixes bentônicos que podem alcançar de 4 a 6 cm de comprimento, vivem associados a substratos arenosos ou lamacentos de habitats altamente diversificados, como rios, lagos, próximo às margens ou em baixas profundidades (Tencatt e Ohara, 2016). São peixes onívoros, alimentam-se de invertebrados, como vermes aquáticos, microcrustáceos, insetos, larvas e ovos de insetos, moluscos e possivelmente algas e plantas (Froese e Pauly, 2018).

Corydoras é endêmico da América do Sul e várias espécies têm importância econômica para o mercado de peixes ornamentais (Rodríguez-Ithurralde *et al.* 2014). São comercialmente importantes à exportação destinados ao mercado internacional de aquarofilia, na pesca em ambientes naturais e na piscicultura em muitos países sul-americanos (FAO, 2015). *Corydoras* destacam-se dentro dos dez principais grupos de espécies de peixes ornamentais exportados pelo Brasil, e a espécie *Corydoras schwartzi* Rössel, 1963, representa 7 de cada 20 *Corydoras* atualmente comercializadas, segundo dados mais recentes da EMBRAPA (2021).

Figura 3. *Corydoras* spp. coletadas no rio Nhamundá, Nhamundá, Amazonas. **A.** *Corydoras agassizii* Steindachner, 1876. **B.** *Corydoras schwartzi* Rössel, 1963.



Fonte: Elaborado pela autora.

Várias espécies de *Corydoras* têm importância econômica para o mercado de peixes ornamentais, desta forma, conhecer a ictiofauna e sua fauna e relação peixe-parasitas-ambiente se torna imprescindível no contexto sanitário e econômico. Apesar da importância comercial no mercado da aquariofilia e diversidade de espécies do gênero *Corydoras*, segundo a literatura, apenas cinco espécies de mixozoários foram descritos infectando esse gênero, sendo apenas em espécimes provenientes da bacia Amazônica, como: *Myxidium amazonense* Mathews *et al.* 2015 parasitando a vesícula biliar de *Corydoras melini* Lönnberg e Rendahl, 1930; *Myxobolus niger* Mathews *et al.* 2016a infectando tecido conjuntivo da camada serosa do arco branquial de *C. melini*; *Henneguya melini* Mathews, Maia e Adriano, 2016b infectando os filamentos branquiais de *C. melini*; *Henneguya loreotoensis* Mathews, Naldoni e Adriano, 2017 parasitando os filamentos branquiais de *Corydoras leucomelas* Eigenmann e Allen, 1942; *Myxobolus adrianoi* Mathews *et al.* 2020 infectando o intestino de *Corydoras schawartzi* Rössel, 1963.

1.5 Parasitas de peixes

Os parasitas desempenham um papel importante na biodiversidade global, devido, principalmente, às significativas atribuições exercidas por esses organismos nos ecossistemas naturais. Embora tenha havido avanços no conhecimento sobre a diversidade de parasitas nas últimas décadas, ainda há muitas espécies a serem identificadas (Luque, 2004). O número preciso de espécies parasitas nos ecossistemas aquáticos brasileiros é difícil de ser estimado, porém, inúmeros estudos demonstram a grande riqueza presente nas águas brasileiras (Agostinho, Thomaz e Gomes, 2005).

Com o crescimento significativo das atividades relacionadas à pesca extrativista e à aquicultura, surgem preocupações cada vez maiores com a sanidade dos peixes e os problemas causados por parasitas e organismos patogênicos, que podem acarretar sérios prejuízos econômicos e ambientais (Iwashita e Maciel, 2013). O conhecimento da fauna parasitária dos peixes é de extrema relevância, não apenas do ponto de vista econômico, devido altas taxas de mortalidade causadas pelas parasitoses, redução das capturas e diminuição dos valores comerciais dos exemplares afetados, mas também por sua contribuição para saúde pública, uma vez que podem ser veiculadores de zoonoses (Lom e Dyková, 1992).

Com o aumento do mercado global de aquariofilia e a exportação de peixes ornamentais, crescem as ameaças de disseminação transfronteiriça de parasitas provenientes de sistemas de criação ou ambientes naturais dos países produtores para as populações nativas de peixes nos locais de destino, o que possibilita a introdução de patógenos que podem ter efeitos devastadores sobre espécies de peixes suscetíveis (Biosecurity, 2005; Hallet *et al.* 2015). Dentre os diversos parasitas de peixes, um grupo tem recebido atenção notável nos últimos anos é o Myxozoa Grassé, 1970, devido ao seu potencial patogênico (Eiras, Takemoto e Pavanelli, 2008). No entanto, ainda há pouco conhecimento sobre a infecção por mixozoários em peixes ornamentais sul-americanos (Mathews *et al.* 2016a).

1.6 Mixozoários (Cnidaria: Myxozoa)

Myxozoa (Cnidaria: Endocnidozoa) é um grande grupo de endoparasitas amplamente difundidos com ciclos de vida complexos, microscópicos obrigatórios, explorando hospedeiros invertebrados e vertebrados (Okamura e Gruhl, 2016; Okamura, Hartigan e Naldoni, 2018). Podem causar graves danos ecológicos e econômicos. São tipicamente parasitas de peixes, embora possam infectar anfíbios, répteis, aves aquáticas e pequenos mamíferos (Okamura *et al.* 2015; Eiras *et al.* 2023).

Mais de 2.600 espécies atualmente foram identificadas, em ambientes marinhos e de água doce, em todo o mundo (Okamura, Hartigan e Naldoni, 2018; Zatti *et al.* 2022). Muitas infecções por mixozoários são inócuas, não facilmente aparentes, mas algumas espécies são altamente patogênicas, resultado em graves enfermidades e mortalidade em peixes parasitados, podendo resultar inclusive em perdas econômicas substanciais para a aquicultura e pesca, impactando a saúde dos peixes de criação e reduzindo a comercialização de peixes de ambientes naturais. Ademais a saúde humana pode ser desafiada por esses parasitas quando peixes crus infectados são consumidos por indivíduos imunocomprometidos. Atualmente, não há evidências de que o ciclo de vida dos mixozoários envolva um hospedeiro humano, em nenhum estágio do desenvolvimento do parasita, no entanto, esporos de mixozoários já foram detectados em fezes humanas (Reis *et al.* 2016).

A classe Myxozoa, pertencente ao Filo Cnidaria, Subfilo Endocnidozoa, representa mais de 20% da diversidade total de espécies de cnidários atualmente

(Okamura, Hartigan e Naldoni, 2018; Giribet e Edgecombe, 2020). Os mixozóários em geral demonstram extrema simplificação morfológica e miniaturização como resultado de seu estilo de vida parasitária (Okamura, Hartigan e Naldoni, 2018). Todos têm ciclos de vida complexos, explorando hospedeiros invertebrados e vertebrados (Okamura *et al.* 2015). São distribuídos em duas principais linhagens: Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw e Okamura, 2000, (malacosporídeos), com poucas espécies, caracterizados pela retenção de características primitivas e Myxosporea Bütschli, 1881 (mixosporídeos) altamente derivado e ricos em espécies (Okamura; Gruhl e Bartholomew, 2015).

Malacosporea engloba apenas uma pequena fração da diversidade dos mixozoários existentes atualmente (Adriano, Zatti e Okamura, 2022). É a linhagem que retém as características evolutivas ancestrais do grupo, como a simetria radial e a presença de epitélios e feixes musculares rudimentares. Até o momento, todas as evidências sugerem que os briozoários de água doce são os únicos hospedeiros invertebrados envolvidos no ciclo biológico dos malacosporídeos e os peixes obrigatoriamente são os hospedeiros vertebrados (Ruggeri *et al.* 2020).

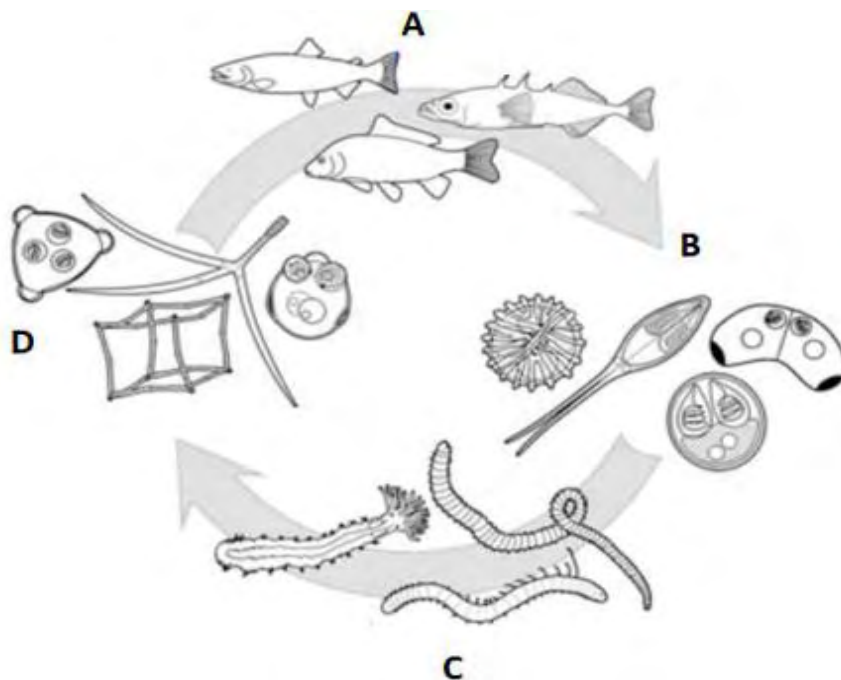
As seis espécies de malacosporídeos descritas são atribuídas aos dois gêneros *Tetracapsuloides* e *Buddenbrockia* (Patra *et al.* 2018; Naldoni *et al.* 2019b). Estudos recentes fornecem evidências de mais 12 famílias de peixes neotropicais de áreas da bacia Amazônica que estavam infectados por uma nova espécie de malacosporídeo (Naldoni *et al.* 2021). Quase todos os malacosporídeos foram detectados infectando briozoários e peixes da Europa e da América do Norte, com exceção dessa nova espécie de *Buddenbrockia* em hospedeiros brasileiros da bacia Amazônica (Naldoni *et al.* 2021).

O único ciclo de vida malacosporiana totalmente descrito é o da espécie *Tetracapsuloides bryosalmonae* Canning *et al.* 1999, o agente causador da doença renal proliferativa ou PKD (*Proliferative Kidney Disease*) (Ruggeri *et al.* 2020; Feist *et al.* 2001; Morris e Adams, 2006). A PKD é uma doença emergente que tem sido associada a declínios das populações de salmonídeos na Europa e nos EUA, causando severas inflamações renais nos peixes acometidos, levando a altas taxas de mortalidade tanto em sistemas naturais e de criação, e conseqüentemente, um grande impacto econômico (Ruggeri *et al.* 2020).

Myxosporea, compreende a diversificada maioria das espécies de Myxozoa atualmente conhecidas (Bartošová-Sojková *et al.* 2014; Okamura *et al.* 2015). É a linhagem que sofreu radiação substancial e apresenta uma grande redução morfológica, porém é a mais rica em espécies. Em particular, eles exibem uma tendência de perda de tecido, não possuem intestino e sistema nervoso além de ausência de cílios e ou centríolos (Okamura *et al.* 2015).

Possuem um ciclo biológico complexo, alternando entre vertebrados, que são os hospedeiros intermediários, sendo os peixes os mais comuns, e também anfíbios, répteis, aves aquáticas e pequenos mamíferos e invertebrados, hospedeiros definitivos, principalmente aqueles pertencentes as classes Oligochaeta e Polichaeta (Filo Annelida) (Okamura *et al.* 2015). A transmissão entre hospedeiros ocorre através de dois estágios morfológicamente distintos: o estágio de mixósporo em hospedeiros vertebrados e o estágio de actinosporo em hospedeiros invertebrados (Fiala *et al.* 2015) sendo que a transmissão ocorre geralmente por meio de esporos disseminados pela água (Figura 4.).

Figura 4. Ciclo de vida dos mixozoários **A.** Peixes infectados (hospedeiro vertebrado) **B.** Mixósporo liberado na água pelo peixe **C.** Oligoqueta (hospedeiro invertebrado) **D.** Actinosporo liberado na água pelo oligoqueta.



Fonte: Editado a partir de Atkinson *et al.* 2011.

Apenas uma pequena fração dos ciclos de vidas dos mixozoários foram resolvidas, cerca de 55 espécies (Holzer *et al.* 2018). A maioria das infecções por mixozoários são imperceptíveis e muitas não são detectadas, contribuindo para nossa má compreensão da diversidade de mixozoários existentes (Okamura *et al.* 2015). O conhecimento atual da diversidade de espécies de mixozoários é amplamente baseada em infecções causadas em peixes. Além disso, parasitas de invertebrados são geralmente pouco estudados porque há poucos incentivos para investigar parasitas de organismos considerados de pouco valor comercial (Hallett *et al.* 2015).

É amplamente aceito que a diversidade de espécies de mixozoários está atualmente subestimada (Lom e Dyková, 2006). Muitas infecções por mixozoários são inócuas, não imediatamente aparentes, mas algumas causam importantes doenças nas populações de peixes de ambientes naturais e de criação e atualmente são considerados uma ameaça emergente para a ictiofauna, pois infectam uma grande variedade de espécies economicamente importantes (Feist e Longshaw, 2006). A espécie de mixozoário mais popular e, também, uma das mais importantes no contexto econômico é a *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903, agente etiológico da “doença do rodopio”, uma patologia fatal que acomete jovens salmonídeos, (Hallett e Bartholomew, 2009). Foi introduzida através do comércio de peixes salmonídeos da Europa na América do Norte, e, atualmente, ocorre em todos os estados dos Estados Unidos e Canadá, onde se tornou um importante agente patogênico e de alto impacto econômico (Hoffman, Dunbar e Bradford, 1962; Gilbert e Granath, 2003; Feist e Longshaw, 2006).

Outra espécie bastante relevante é *Ceratonova shasta* (2014) (sinônimo: *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950) espécie endêmica da região noroeste dos Estados Unidos. É uma das espécies mais virulentas dentro de Myxozoa, pois infecta o trato digestório de peixes salmonídeos (principalmente salmão e truta), causando infecções crônicas, processos inflamatórios severos com a consequente ocorrência de eventos hemorrágicos intestinais, principalmente em indivíduos jovens, levando a altas taxas de mortalidade em populações de peixes de ambientes naturais e de criação (Lom e Dyková, 1992; Atkinson *et al.* 2011; Hallett *et al.* 2015; Bartholomew *et al.* 2022).

Inúmeras outras espécies de mixozoários são relevantes e preocupantes, pois acometem várias espécies de peixes economicamente importantes tanto de ambientes naturais quanto de criação, como *Henneguya ictaluri* Pote, Hanson e Shivaji 2000, agente etiológico da doença proliferativa das brânquias em *Ictalurus punctatus* Rafinesque 1818,

causa altas taxas de mortalidade principalmente em exemplares jovens em sistemas de criação na região sul dos Estados Unidos (Feist e Longshaw, 2006).

1.7 Estudo de Myxozoa no Brasil

No Brasil, o conhecimento da diversidade de mixozoários ainda é muito escasso, como para a maioria dos grupos de parasitas em geral, bem como os possíveis danos que podem causar em seus hospedeiros, tendo em vista que o país abriga a mais rica e diversificada ictiofauna de água doce e marinha do planeta (Malabarba *et al.* 1998; Buckup, Menezes e Ghazzi, 2007; Reis *et al.* 2016).

Recentemente, devido a vários esforços e investimentos em pesquisas na área, houve um grande aumento de estudos e descrição de novas espécies de mixozoários em importantes peixes de diferentes espécies e bacias hidrográficas, como as bacias dos rios Amazonas, Paraná Paraguai, Araguaia-Tocantins, São Francisco e Paraíba do Sul, e também em peixes oriundos de pisciculturas (exemplos: Adriano *et al.* 2002, 2005a, 2005b, 2012; Naldoni *et al.* 2009, 2011, 2019a, 2020; Abrunhosa *et al.* 2017; Casal *et al.* 2017; Milanin *et al.* 2018; Capodifoglio *et al.* 2015, 2016, 2019, 2020), e estudos recentes de Naldoni *et al.* 2021 identificaram uma espécie de malacosporídeo em uma ampla gama de peixes de águas amazônicas brasileiras.

Dentre as espécies de mixozoários descritas em peixes nativos da ictiofauna brasileira, algumas têm se mostrado patogênicas ou com grande potencial para causar danos em seus hospedeiros (Adriano *et al.* 2012), como é o caso de *Henneguya multiplasmodialis* Adriano *et al.* 2012, que infecta as brânquias, formando grandes plasmódios que cobrem totalmente os filamentos e o arco branquial do *Pseudoplatystoma corruscans* Spix e Agassiz, 1829 (pintado) e do *Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1776 (cacharas) de ambiente natural no Pantanal Mato-Grossense. *Henneguya pseudoplatystoma* Naldoni *et al.* 2009, acomete as brânquias de *Pseudoplatystoma corruscans* Spix e Agassiz, 1829 (pintado) e causa importante redução da função branquial em peixes oriundos de pisciculturas dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (Naldoni *et al.* 2009). Em brânquias do peixe *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (tilápias do Nilo), oriundas de um sistema de recreação no estado de São Paulo, Teixeira e colaboradores (2018) encontraram uma alta prevalência de *Henneguya* sp. e *Myxobolus* sp. Análises histopatológicas mostraram a presença de várias alterações morfológicas branquiais em

decorrência da presença dos mixozoários, como hiperplasia e degeneração do epitélio branquial, fusão lamelar, reações inflamatórias, entre outras (Teixeira *et al.* 2018).

Novos estudos identificam e descrevem novas espécies de mixozoários infectando diferentes hospedeiros, fornecendo evidências de que a diversidade de espécies é provavelmente subestimada. De acordo com estudos de Naldoni e colaboradores (2011), que avaliou os padrões de infecções por mixozoários em peixes de água doce sul-americanos, constatou que cada espécie de peixe pode ser acometida por mais de duas espécies de mixozoários. A estimativa da diversidade desses parasitas na América do Sul pode alcançar até 16.000 espécies apenas nesta região biogeográfica. Desta forma, é possível estimar que o número de espécies de cnidários endoparasitas, mixozoários, podem competir ou mesmo exceder o número de espécies de cnidários de vida livre (Okamura *et al.* 2015).

Levantamentos parasitológicos ou registros individuais de espécies que parasitam peixes ornamentais de águas dulcícolas e marinhas são escassos quando comparados aos outros peixes de ambientes naturais e de sistemas de criação, em todos os continentes, principalmente em águas continentais sul-americanas da bacia Amazônica (Coe, Freitas e Araújo, 2011; Mathews *et al.* 2015). Em função da demanda global, aumenta-se o risco de disseminação transfronteiriça de doenças infecciosas através da dispersão de animais vivos (Farley, 1992; Whittington e Chong, 2007). Como tal, há uma necessidade crescente do conhecimento de parasitas que infectam peixes ornamentais (Camus *et al.* 2013).

1.8 Marcadores moleculares de importância em estudos de Myxozoa

Durante grande parte do século 20, diversos estudos de Myxozoa utilizavam somente análises morfológicas dos esporos para a descrição e identificação de espécies (Lom e Arthur, 1989; Ferguson *et al.* 2008). A morfologia dos mixozoários tem sido o principal critério de identificação de espécies (Kudo, 1933; Molnár, 1994), entretanto, de acordo com Molnár *et al.* (2002), a classificação zoológica utilizando apenas os métodos morfológicos pode dificultar a identificação, taxonomia e descrição de novas espécies, devido à alta similaridade que os mixozoários compartilham. Por exemplo, a falta de caracteres adequadas pode ser problemática para distinguir mixósporos morfológicamente simples, como espécies de *Myxobolus*, que podem levar a ambiguidades taxonômicas (Atkinson *et al.* 2015).

Atualmente essas dificuldades são resolvidas por meio de abordagens moleculares, pois ao contrário do fenótipo, a fidelidade do DNA é mantida independente do tempo e do ciclo de vida (Atkinson *et al.* 2015).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular vêm sendo empregadas em diversos estudos na ictioparasitologia e têm sido de grande valia aliadas na taxonomia e na caracterização de isolados (Criscione *et al.* 2005; Figueiredo *et al.* 2008). Nos estudos de Myxozoa, as análises moleculares contribuem notavelmente na sistemática, auxiliando na identificação das espécies e na compreensão das relações evolutivas destes organismos (Okamura *et al.* 2015).

As abordagens moleculares para resolver as relações entre os mixosporídeos têm se baseado principalmente na análise da sequência de DNA ribossômico (rDNA). O principal marcador molecular amplamente utilizado nos estudos de Myxozoa é o *Small Subunit Ribossomal* (SSU rDNA). Esse gene é utilizado por ser heterogêneo, possuindo regiões mais variáveis e outras conservadas, assim sendo um marcador útil para comparações de organismos de uma variedade de níveis taxonômicos (Hillis e Dixon, 1991).

O gene *Large Subunit Ribossomal* (LSU rDNA) possui propriedades semelhantes ao SSU rDNA, porém é relativamente maior e contém proporcionalmente um maior número de sítios variáveis, sendo assim, considerado um marcador bastante útil em estudos taxonômicos e filogenéticos (Medina *et al.* 2001; Evan *et al.* 2008). Em mixosporídeos, entretanto, ele ainda é pouco explorado, assim o gene é limitado a poucas espécies devido à menor disponibilidade de dados disponíveis nas bases (Atkinson *et al.* 2015). Neste estudo, usamos o LSU rDNA como uma fonte adicional de informação molecular.

A região intergênica ribossomal ITS-1 (*Internal transcribed spacer*) é um marcador amplamente utilizado em estudos que visam as variações genéticas intraespecíficas, e têm sido útil para discriminar subpopulações de mixozoários de diferentes áreas geográficas ou hospedeiros (Andre *et al.* 1999; Atkison e Bartholomew, 2010; Zatti *et al.* 2017a).

2. HIPÓTESE

- Existe uma diversidade de espécies de mixozoários infectando *Corydoras* spp. e *Paracheirodon axelrodi* da bacia Amazônica.

- Os genes LSU rDNA e ITS-1 são bons marcadores moleculares para a identificação de novas espécies de mixozoários e estudos filogenéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo identificar, com base em caracteres morfológicos e moleculares (sequenciamento dos genes ribossomais SSU rDNA, LSU rDNA e a região codificadora ITS-1), a fauna de parasitas da classe Myxozoa encontrado parasitando os peixes dos gêneros *Corydoras* e *Paracheirodon* da bacia Amazônica, do Rio Nhamundá, Amazonas.

3.2 Objetivos Específicos

- I.** Identificar e descrever as espécies de parasitas mixozoários presentes em cada uma das três espécies de peixes estudadas, *Corydoras agassizii*, *Corydoras schwatzii*, e *Paracheirodon axelrodi*.

- II.** Avaliar, mediante sequenciamento do gene ribossomil SSU rDNA a posição filogenética os mixozoários parasitas das três espécies de peixes dos gêneros *Corydoras* e *Paracheirodon*, quando comparada com espécies parasitas de outros hospedeiros e de outras regiões;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no laboratório de Imunologia e Parasitologia de peixes (LIP), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP). As coletadas foram realizadas entre o segundo semestre de 2021 e início de 2022.

Na região do rio Nhamundá, Amazonas, os peixes foram capturados por pescadores locais com redes de pesca, tarrafas, peneiras ou armadilhas e transportados vivos via transporte aéreo para o Laboratório de Imunologia e Parasitologia de Peixes, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em Pirassununga.

As capturas foram autorizadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade de São Paulo processo CEUA/USP nº 9975090921. Após a eutanásia (overdose de benzocaína) e a mensuração dos peixes, foi realizada a análise externa, com exposição das brânquias e da cavidade visceral para detectar quaisquer alterações nas características dos órgãos e presença de plasmódios e/ou cistos de mixozoários. Órgãos ou tecidos infectados por mixozoários foram coletados e fixados seguindo os protocolos das técnicas empregadas para posterior análise (microscopia e análise molecular). No total, 100 espécimes de peixes ornamentais (40 espécimes de *C. agassizii*, 30 espécimes de *C. schwartzi* e 24 espécimes de *P. axelrodi*) foram examinados no estudo.

5. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão divididos em dois capítulos, apresentando espécies descritas de mixozoários parasitas de dois gêneros de peixes ornamentais, *Corydoras* e *Paracheirodon*, que são de relevância no comercial do mercado internacional de aquarofilia. Essas espécies foram coletadas no rio Nhamundá, Amazonas, Brasil.

O capítulo 1 descreve uma nova espécie de *Henneguya* sp. infectando os filamentos branquiais do peixe ornamental *C. schwartzi* e uma nova espécie de *Myxobolus* sp. infectando o arco branquial de *C. agassizii*. Este é o primeiro relato de *Myxobolus* infectando *C. agassizii* e o primeiro relato de *Henneguya* parasitando *C. schwartzi*.

No capítulo 2, uma nova espécie de *Myxobolus* sp. é descrito, infectando o cérebro de *P. axelrodi*. Este representa o segundo relatado de um mixosporídeo infectando essa espécie de peixe ornamental no mundo.

CAPÍTULO 1.

Two novel myxosporeans (Cnidaria: Myxozoa) infecting *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriforme: Callichthyidae) from the Nhamundá river, Brazil

A formatação segue o padrão do periódico Parasitology Research

Two novel myxosporeans (Cnidaria: Myxozoa) infecting *Corydoras Lacépède, 1803* (Siluriforme: Callichthyidae) from the Nhamundá river, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to report, through morphological and sequencing of ribosomal DNA (SSU rDNA, ITS-1, and LSU rDNA), two novel myxobolid myxosporeans infecting species of *Corydoras*, an important Amazonian ornamental fish. Of the 66 specimens of *Corydoras* examined 15.7% revealed plasmodia of new species of myxozoans. Of a total of 40 specimens of *C. agassizii* examined 12.5% had the branchial arch parasitized by *Myxobolus* n. sp. 1. The morphological analysis revealed *Myxobolus* n. sp. 1 myxospores had oval shape body and polar capsules equal in size, occupying more than half the length of the myxospore. Sequencing of the SSU rDNA and ITS-1 generated a partial sequence of 2.024 bp, and the LSU rDNA generated a partial sequence of 1.224 bp. Of a total of 36 specimens of *C. schwartzi* examined 27.7% had the gill filament parasitized by *Henneguya* n. sp. 1. In *Henneguya* n. sp. 1 myxospores with an ellipsoid shape in valvular view and a round shape in the anterior pole. Sequencing of the SSU rDNA and ITS-1 generated a partial sequence of 2.329 bp, and LSU rDNA partial sequence 1.426 pb. Phylogenetic analysis revealed a cluster according to the Order/Family of the host. These findings provide valuable insights into the diversity and characteristics of myxosporean infections in *Corydoras* species, expanding our understanding of their biology and highlighting the need for further research in this field.

Keywords: Ornamental Fish; Fish Parasite; SSU rDNA; ITS-1; LSU rDNA; *Myxobolus*.

Dois novos mixosporídeos (Cnidaria: Myxozoa) infectando *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriforme: Callichthyidae) do rio Nhamundá, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi relatar, por meio de análise morfológica e sequenciamento do DNA ribossomal (SSU rDNA, ITS-1 e LSU rDNA), dois novos mixozoários mixosporídeos infectantes do gênero *Corydoras*, peixe ornamental amazônico de grande importância. De um total de 66 espécimes de *Corydoras* examinados, 15,7% apresentaram plasmódios de espécies desconhecidas de mixozoário. De 40 espécimes de *C. agassizii* examinados, 12,5% apresentavam o arco branquial parasitado por *Myxobolus* n. sp. 1. A análise morfológica revelou que o *Myxobolus* n. sp. 1 apresentou mixósporos ovais com duas cápsulas polares alongadas e simétricas, que ocupam mais da metade do comprimento do esporo. O sequenciamento parcial do SSU rDNA e ITS-1 gerou uma sequência parcial de 2.024 pb, e a sequência parcial do LSU rDNA de 1.224 pb. Identificamos também plasmódios de uma espécie desconhecida de *Henneguya* em espécimes de *C. schwartzi*, de um total de 36 espécimes examinadas 27,7% apresentavam os filamentos branquiais parasitados por *Henneguya* n. sp. 1. Em *Henneguya* n. sp. 1 os mixósporos possuem forma elipsoide na visão valvular e forma arredondada no polo anterior. O sequenciamento do SSU rDNA e ITS-1 gerou uma sequência parcial de 2.329 pb, e do LSU rDNA, com uma sequência de 1.426 pb. A análise filogenética revelou um agrupamento de acordo com a ordem/família do hospedeiro. Essas descobertas fornecem informações valiosas sobre a diversidade e características das infecções por mixosporídeos em espécies de *Corydoras*, ampliando nosso entendimento de sua biologia e destacando a necessidade de mais pesquisas nessa área.

Palavras-chave: Peixes Ornamentais; Parasita de peixes; SSU rDNA; ITS-1; LSU rDNA; *Myxobolus*.

1. Introduction

Myxozoans (Cnidaria: Endocnidozoa) are a diverse group of cnidarians, with approximately 2.600 described species, accounting for 20% of the total species diversity within the Cnidarian Phylum (Okamura et al. 2018). These organisms have undergone extreme reduction as an adaptation to parasitism, consisting of only a few cells and exhibiting significantly smaller size and reduced tissue complexity compared to their free-living cnidarian counterparts (Holland et al. 2011). The life cycle of myxozoan parasites involves alternating between vertebrate hosts, predominantly fish, and invertebrate hosts, primarily annelids. This complex life cycle is facilitated by characteristic myxospores, which serve as transmission stages between the invertebrate and vertebrate hosts in both freshwater and marine environments (Lom and Dyková, 2006).

Annelids and bryozoans are well-established as definitive hosts (invertebrate hosts), while fish predominantly serve as the largest group of known intermediate hosts. However, myxozoans also exploit a wide range of other animal groups, including amphibians, reptiles, birds, and mammals (Fiala et al. 2015). This remarkable adaptability and opportunistic nature enable myxozoans to demonstrate a high degree of flexibility in exploring hosts across different animal groups (Holzer et al. 2018).

Myxozoans belong to the Subphylum Endocnidozoa within the Phylum Cnidaria (Giribet and Edgecombe 2020). Within the myxozoans group, there are two major clades: the Myxosporea, which is relatively diverse in terms of species, and the Malacosporea, which has fewer species (Fiala et al. 2015). Among the Myxosporea clade, two genera, *Myxobolus* Bütschli, 1882, and *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxobolidae), stand out as some of the most species-rich myxozoan genera. These two genera alone account for nearly half of the total known species diversity within the entire myxozoan group. *Myxobolus* Bütschli, 1882 is the most species-rich genus, with 979 described species (Eiras et al. 2021), while *Henneguya* Thélohan, 1892 is the second most species-rich genus within the Myxobolidae family, comprising over 254 species (Rangel, Santos and Rocha 2023).

Although there have been several species surveys conducted on myxozoans in South American fish, there remains a scarcity of information specifically focusing on freshwater ornamental fish, particularly in the Amazon region (Mathews et al. 2018). This

knowledge gap is significant considering the vast species richness found within the world's largest interconnected freshwater fluvial system, the Amazon basin (Junk et al. 2007; Moreau and Coomes, 2006, 2007). The Amazon basin serves as a crucial source of ornamental freshwater fish for the global aquarium industry. In fact, the Amazon State alone is responsible for exporting approximately 93% of the world's ornamental fish, generating an annual income of approximately US\$3 million (CIEAM 2019).

Corydoras Lacépède, 1803, stands out as one of the most commercially sought-after ornamental fish genera in Brazil. It is also the most species-rich genus within the Siluriformes order, comprising approximately 180 valid species (Tencatt et al. 2023). Widely distributed throughout South America, the genus exhibits its greatest diversity within the Amazon basin, where more than half of the known *Corydoras* species can be found (Eschmeyer 2015; Tencatt and Ohara 2016; Tencatt et al. 2023).

Despite the significant commercial importance and species diversity within the genus *Corydoras*, the knowledge of myxozoan infections in these fish is still limited, with only five reported cases to date (Mathews et al. 2015, 2016a, 2016b, 2018, 2020). In this study, we aimed to expand this understanding by utilizing a combination of morphological analysis and sequencing of small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA) and large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA). Our research focused on identifying and describing two previously unknown myxozoan species found in economically valuable ornamental fish species in the Amazon basin.

To the best of our knowledge, there is currently no information available regarding myxosporean infections in specimens of *C. agassizii*. This study presents the first description of a newly discovered species of *Myxobolus*, which infects the branchial arch of *C. agassizii* collected from the Nhamundá River in the Amazon region of Brazil. Additionally, we report the first instance of a *Henneguya* parasite infecting the gill filaments of *C. schwartzi*, also collected from the Nhamundá River in the Amazon region of Brazil.

The findings of this study provide significant insights into the myxosporean infections in these two species of *Corydoras* in the Amazon region. The identification of a new *Myxobolus* species infecting *C. agassizii* and the occurrence of *Henneguya* in *C. schwartzi* highlight the diversity of myxosporeans in this ecologically important region.

2. Material and Methods

Forty specimens of *Corydoras agassizii* and thirty-six specimens of *Corydoras schwartzi* were caught between December 2021 and January 2022 from the Nhamundá River, in the municipal region of Nhamundá, in the State of Amazonas, Brazil. The fish were caught using nets and transported via air to the Laboratory of Fish Immunology (LIP) at the Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA/USP), Campus Pirassununga/São Paulo.

Upon arrival at the laboratory, the fish were euthanized using an overdose of benzocaine solution. All fish handling and/or euthanasia were approved by the Ethics Committee for Animal welfare of the School of Animal Science and Food Engineering, of the University of São Paulo (USP Process: 9.957.090.0921). Subsequently, the fish were necropsied and the organs tissues, and fluids were examined under stereomicroscopy to detect possible alterations in characteristics and the presence plasmodia. Host tissue infected with myxosporean plasmodia were fixed of in buffered 10% formalin for morphological of characterization of myxospores and in absolute ethanol for molecular analyses.

The plasmodia were ruptured and myxospores released were photographed using a Leica DMLB 5000 microscope coupled with a Leica Application Suite software version 3.4.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Morphometric data of the myxospores were obtained in accordance with Lom and Arthur (1989). The dimensions of the myxospores were expressed in micrometres and are reported as mean \pm standard deviation (SD), and the range dimensions are provided in parentheses. Measurements and photographs were acquired from 30 mature myxospores of a plasmodium found infecting *Corydoras schwartzi* fish and 36 mature myxospores of a plasmodium found infecting *Corydoras agassizii* fish. Smears containing myxospores were air-dried on to glass slides, fixed with ethyl methanol and stained with Giemsa.

Plasmodia fixed in absolute ethanol were separated from the host tissue, individually ruptured and washed with Phosphate Buffered Saline (PBS). DNA of the myxosporeans were extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., California, USA), following the manufacturer's instructions. Subsequently, the extracted DNA was quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) at 260 nm, enabling the determination of DNA concentration.

For amplification of the SSU rDNA, ITS-1, and LSU rDNA regions, polymerase chain reaction (PCR) was performed. specific primers, as listed in Table 1, were employed to target the desired regions during the PCR amplification process.

PCR assays were performed with a final volume of 25 μ l, containing 10-50ng of genomic DNA. The reaction consisted of 12.5 μ l Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, California, USA), 0.5 μ l of each primer (10 pmol), 1 μ l of DNA (10 – 50 ng/ μ l), and 10.5 μ l of ultrapure water. The PCR amplification were performed in a ProFlex PCR System (Applied Biosystems TM Inc., California, USA). The PCR protocol for amplification was as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of desnaturation (95 °C for 60s), hybridization (60 °C for 60s or 62°C for ITS-1 and LSU-rDNA), and extension (72 °C for 90s) and a final extended elongation step at 72 °C for 5 minutes.

The PCR products obtained were subjected to agarose gel electrophoresis using a 1.5% agarose gel stained with SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). A running buffer of TAE (Tris borate EDTA) at 80 V was utilized, and the gel was visualized using a Stratagene transilluminator 2020E. To confirm the presence of appropriately sized bands, direct comparison was made with the molecular weight marker 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Following gel electrophoresis, the PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, California, USA), following the manufacturer's instructions. The purified products were then directly sequenced in both directions using PCR primers (5 pmol) on a first-generation automatic sequencer (Sanger Method), specifically the ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with POP7 polymer. For sequencing, the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit was used, along with an internal control utilizing pGEMTM-3Zf DNA (+) provided by Applied Biosystems. The sequencing was performed at the Center for Biological Resources and Genomic Biology (CREBIO) of the São Paulo State University (UNESP). The obtained sequences were visualized, assembled, and edited using BioEdit 7.2.5 softwares (Hall 1999). They were then compared to other myxosporean sequences available in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) platform using Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTn) search, allowing for comprehensive sequence analysis and identification.

Table 1. Primers used in this study for amplification and sequencing of the SSU rDNA, LSU rDNA genes and ITS-1.

Primers	Sequence 5'-3'	DNA	Paired with	Reference
18e	CTGGTTGATCCTGCCAGT	SSU	MC3	Hillis & Dixon 1991
MC5	CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA	SSU	MC3	Molnár et al. 2002
MC3	GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA	SSU	MC5	Molnár et al. 2002
Henn.6F	TGGTCGCAAGGCTGAAACT	SSU	Henn.1R	unpublished data
Henn.1R	ACGCTGATCGCAGTTCCA	SSU	Henn.6F	Zatti et al. 2022
Henn.8F	GCGCGCTACAATGACGATG	ITS-1	NC13	Zatti et al. 2022
NC13	GCTGCGTTCTTCATCGAT	ITS-1	Henn.8F	Gasser et al. 1998
NLF160	ACCTCCACTCAGGCAAGATTA	LSU	NLR1270	Van der Auwera et al. 1994
NLF1050	AATCGAACCATCTAGTAGCTGG	LSU	NLR3284/NLR1270	Bartošová et al. 2009
NLR1270	TTCATCCCGCATCGCCAGTTC	LSU	NLF160/NLF1050	Bartošová et al. 2009
CerZat.6F	GACGCGCATGAATGGACTAAC	LSU	NLR3284	unpublished data
NLR3284	TTCTGACTTAGAGGCGTTCAG	LSU	Cer.6F	Van der Auwera et al. 1994

Source: own authorship

Phylogenetic analysis was conducted using the partial sequence of the SSU rDNA obtained from 40 myxosporeans. For this analysis, species with the closest similarity, as indicated by the Max Score from BLASTn in the GenBank database, were selected. Sequences with a length greater than 800 bp were considered. The outgroup consisted of the species *Ceratomyxa amazonensis* (KX236169) and *Ceratomyxa vermiformis* (KX278420).

To align the sequences, ClustalW (Thompson et al. 1994) implemented in the BioEdit program (Hall 1999) was utilized. Maximum Likelihood analysis was performed using the PhyML 3.0 program (Guindon et al. 2010). A bootstrap analysis with 1.000 replicates was carried out to validate the robustness of the tree branches. The resulting phylogenetic tree was visualized using the FigTree v2.0.8 program (Rambaut 2008) and subsequently edited using Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., CA, USA).

3. Results

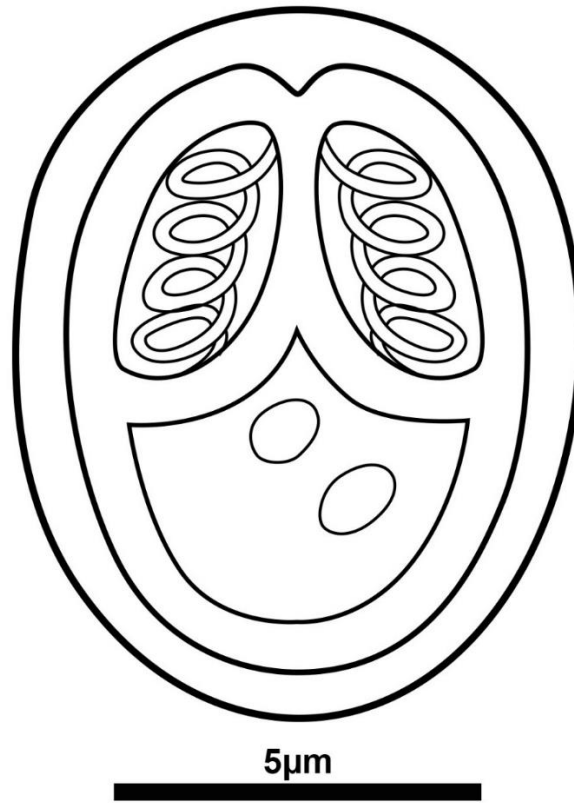
Ten (27.7%) had plasmodia harboring myxospores of the *Henneguya* type in the gill filament of wild specimens of *C. schwartzi*, while five (12.5%) had plasmodia containing myxospores of the *Myxobolus* type in the branchial arch of wild specimens of *C. agassizii*. As the morphological and rDNA sequence analyses revealed that both are new myxosporean species and their description are provide below.

Description of *Myxobolus* n. sp 1 (Figures 1 and 2).

Plasmodia were found in the branchial arch of five specimens of *C. agassizii* captured from the Nhamundá River in the municipal region of Nhamundá, in the State of Amazonas, Brazil. Plasmodia of *Myxobolus* n. sp. 1 were rounded and white, presente in 12.5% (5/40) of the fish examined in Nhamundá River, and the intensity of infection ranged from one to two plasmodia per fish. No plasmodia were observed in any other sites.

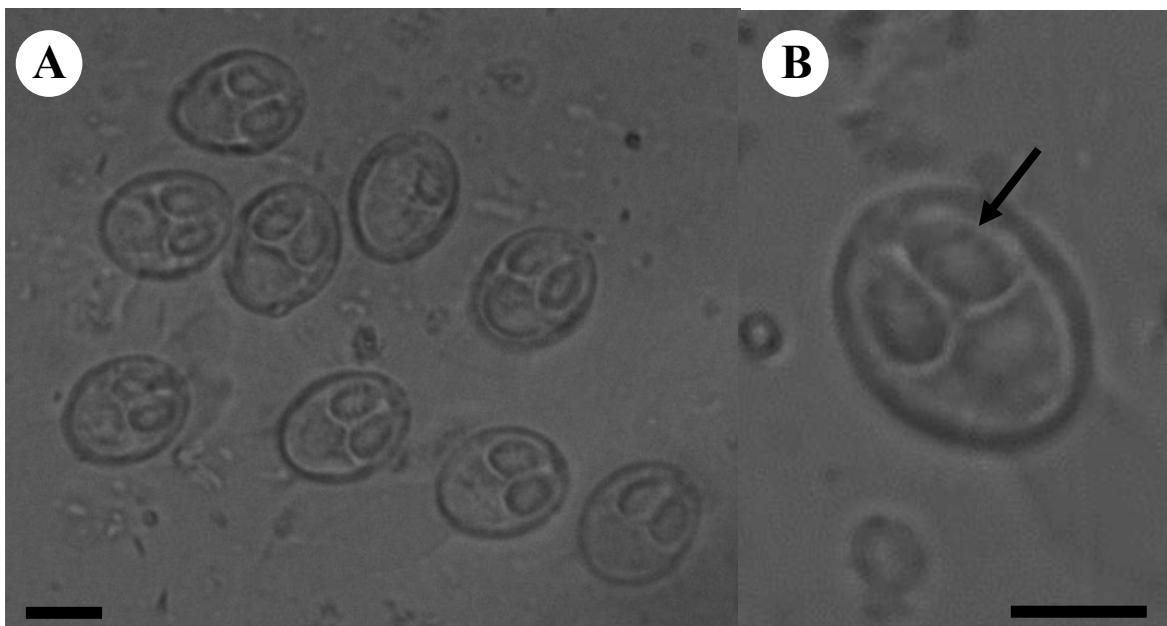
Mature myxospore (Figures 1 and 2) had an oval body shape in frontal view, contained two polar capsules. They were (n=36): $9.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (7.9-10.2) in length and $7.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (6.7-8.5) in width. The two polar capsules were equal in size and occupied about half of the myxospore. They were $3.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (3.3-4.2) in length and $2.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (1.8-2.9) in width. The polar filament showed mostly three and four polar tubule coils.

Figure. 1 Schematic representation of the myxospores of *Myxobolus* parasite of *Corydoras* spp. from the Amazon basin. *Myxobolus* n. sp. 1 parasite of the branchial arch of *Corydoras agassizii*. Scale bar = 5 μ m.



Source: own authorship

Figure. 2 Photomicrographs of mature myxospores of *Myxobolus* n. sp. 1, parasite of the branchial arch of *Corydoras agassizii* from the Amazon basin. **A.** Numerous myxospores after plasmodium rupture. **B.** Frontal view of *Myxobolus* n. sp. 1 found infecting the branchial arch. Note the polar capsule (black arrow). Scale bar = 5 μ m.



Taxonomic summary

Type host: *Corydoras agassizii* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Callichthyidae).

Type locality: Nhamundá River, municipality of Nhamundá, Amazonas State, Brazil (2°11'09" S, 56°42'46" W).

Site of infection: branchial arch.

Prevalence: 12.5% (05 infected in 40 examined).

Molecular data: A partial SSU rDNA and ITS-1 sequence of 2.024 bp was deposited in GenBank and a partial LSU rDNA sequence of 1.224 bp was deposited in GenBank (accession number OR270023).

The morphological/morphometrical data, biological traits, and SSU rDNA, ITS-1 and LSU rDNA sequences of *Myxobolus* n. sp. 1 was compared with other species of *Myxobolus* described (Eiras et al 2005, 2014, 2021), but differences were observed at least in one of the characters such as myxospores or polar capsules dimensions, number polar tubules coils, biological traits, and SSU rDNA (when available).

BLASTn analysis, based on the partial SSU rDNA complete ITS-1 sequence, revealed that the closest species was *Myxobolus aureus* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli, and Maia 2013 (KF2963481), with 86.89% of similarity. BLASTn analysis, based on the partial LSU rDNA sequence, revealed that the closest species was *Myxobolus branchicola* Don, Zhao, Tang and Sou, 2011 (JN616264), with 83% of similarity.

Table 2. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* species described from the Amazon basin. Dimensions are given in micrometers (μm) and expressed as mean \pm standard deviation follows by range in parentheses. Myxospore length (SL), myxospore width (SW), myxospore thickness (T), polar capsule length (CL), polar capsule width (CW), number of polar filament coils (NCF), dashes (--) no data.

Species	Myxospore (μm)						Type host and site of infection	Type locality
	SL	SW	T	CL	CW	NCF		
<i>Myxobolus</i> n. sp. 1 This study	9.2 \pm 0.4 (7.9-10.2)	7.5 \pm 0.3 (6.7-8.5)	--	3.6 \pm 0.2 (3,3- 4,2)	2.3 \pm 0.2 (1.8-2.9)	3-4	<i>Corydora agassizii</i> branchial arch	Nhamundá River, Amazonas State
<i>Myxobolus adrianoi</i> Mathews, Madrid, Martins, Rigoni and Morandini, 2020	22.4 \pm 0.3	16.3 \pm 0.1	--	14.3 \pm 0.2	6.5 \pm 0.1	5	<i>Corydoras schwartzi</i> serosa layer of intestine	Purus River, Amazonas State
<i>Myxobolus pirapitingai</i> Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira, Silva and Maia, 2020	10–11.1	7–7.6	5.4–6.3	3.5–4	2–2.6	6-7	<i>Piaractus brachypomus</i> pyloric caecum	Tapajós River, Pará State
<i>Myxobolus arapiuns</i> Capodifoglio, Meira, Silva, Corrêa, Adriano and Maia, 2020	12.9 (11.6–3.7)	7.5 \pm 0.3 (6.8- 8.2)	5.4 \pm 0.2 (5.1 to 5.6)	5.4 (4.9–6.0)	2.2 (1.9–2.4)	4-5	<i>Piaractus brachypomus</i> pyloric cecum	Tapajós River, Pará State
<i>Myxobolus longissimus</i> Capodifoglio, Adriano, Silva and Maia, 2019	19.1 (18-20)	9.4 (8.6-10.4)	8.3 (7.6-8.9)	10.5 (9.7-11.1)	2.5 (2.1-2.4)	9-10	<i>Colossoma macropomum</i> intestine and gill arch;	Tapajós River, Pará State
<i>Myxobolus matosi</i> Capodifoglio, Adriano, Silva and Maia, 2019	9.6 (9.1–10.8)	7.0 (6.5–7.6)	5.0 (4.6–5.5)	4.3 (3.3–5.0)	1.9 (1.6–2.2)	--	<i>Colossoma macropomum</i> surface of operculum	Tapajós River, Pará State
<i>Myxobolus tapajosi</i> Zatti et al. 2018	15 (13.5-17)	10.7 (9.6-11.4)	--	5.8 (4.6-7.1)	3 (2.3-3.8)	6-7	<i>Brachyplatystoma rousseauixii</i> Gill filaments	Tapajós River, Pará State

Species	Myxospore (µm)						Type host and site of infection	Type locality
	SL	SW	T	CL	CW	NCF		
<i>Myxobolus figueirae</i> Naldoni et al. 2018	9.5 (9.1–10)	6.4 (5.8–6.9)	4.5 (4.4–4.5)	4.1 (3.5–4.6) 3.2 (2.4–3.6)	2.1 (1.7–2.6) 1.4 (1.2–2.1)	7-8	<i>Phractocephalus hemioliopterus</i> Skin	Tapajós River, Pará State
<i>Myxobolus marajoensis</i> Abrunhosa et al. 2017	10.9 (10–11.6)	5.1 (4.2–5.4)	--	5.3 ± 0.6	1.6 ± 0.36	--	<i>Rhambdia quelen</i> Intestine	Marajó Island, Pará State
<i>Myxobolus axelrodi</i> Camus et al. 2017	20.5 ± 0.7 (19-21.8)	6.6 ± 0.5 (5.7-7.9)	5.1 ± 0.4 (4.8-5.9)	9.9 ± 0.8 (8-11.2) 4.1 ± 0.3 (3.5-4.5)	3.8 ± 0.3 (3.2-4.8) 2 ± 0.1 (1.8-2.3)	15-17	<i>Paracheirodon axelrodi</i> Cérebro e retinas	fish imported from Amazon basin, Brazil to USA
<i>Myxobolus niger</i> Mathews et al. 2016	11.3 ± 0.4	6.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	5.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	6–7	<i>Corydoras melini</i> Gill arch	Negro River, Amazonas
<i>Myxobolus</i> sp. Matos et al. 2014	8 ± 0.2	5.8 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.6 ± 0.3	1.2 ± 0.2	--	<i>Pimelodus ornatus</i> Heart	Arari River, Marajó Island, Pará State
<i>Myxobolus myleus</i> Azevedo et al. 2012	19.3 (19–20)	8.3 (7.5–9.0)	4.0 (3.5–4.5)	13.2 (12.5–13.5)	3.0 (2.5–3.5)	19–21	<i>Myleus rubripinnis</i> Bile	Sapuará Lagoon, Amazonas
<i>Myxobolus</i> sp. Maciel et al. 2011	9.55 (9–10.2)	4.98 (4.6–5.1)	--	5.52 (4.9–6.3)	1.57 (1.3–1.7)	--	<i>Colossoma macropomum</i> Blood	Fish farm - Manaus, Amazonas
<i>Myxobolus heckelii</i> Azevedo et al. 2009	12.7 (12.2–13.1)	6.6 (6.3–6.9)	4.0 (3.7–4.4)	2.9 (2.7–3.3)	1.7 (1.4–2.0)	4-5	<i>Entomophiles heckelii</i> Gill filaments	Tocantins River, Pará
<i>Myxobolus metynnis</i> Casal et al. 2006	13.1 (12.9–13.5)	7.8 (7.5–8.3)	3.9 (3.4–4.5)	5.2 (5.0–5.5)	3.2 (3.0–3.6)	8–9	<i>Metynnis argenteus</i> Orbicular region	Estuarine region of the Amazon River, Pará

Species	Myxospore (µm)						Type host and site of infection	Type locality
	SL	SW	T	CL	CW	NCF		
<i>Myxobolus insignis</i> Eiras et al. 2005	14.5 (14–15)	11.3 (11–12)	7.8 (7–8)	7.6 (7–8)	4.2 (3–5)	6	<i>Semaprochilodus insignis</i> Gill lamellae	Amazon River, Amazonas
<i>Myxobolus desaequalis</i> Azevedo et al. 2002	18.3 (17.6–19.1)	11.2 (10.6–11.9)	4.4 (4.0–5.0)	11.2 (10.7–11.9) 4.9 (4.5–5.2)	4.9 (4.5–5.2) 2.8 (2.5–3.1)	4–5	<i>Apteronotus albifrons</i> Gill lamellae	Amazon River, Pará
<i>Myxobolus maculatus</i> Casal et al. 2002	21 (19.7–23)	8.9 (7.9–9.5)	7.5 (7.2–7.9)	12.7 (11.8–13.8)	3.2 (3.0–3.6)	14–15	<i>Metynnis maculatus</i> Kidney	Estuarine region of the Amazon River, Pará
<i>Myxobolus brasiliensis</i> Casal et al. 1996	10.17 (9.4–10.9)	5.28 (4.7–5.9)	3.69 (3.2–4)	5.30 (5–5.48)	1.4 (1.4–1.4)	9–11	<i>Bunocephalus coracoideus</i> Lamela branquial	Estuarine region of the Amazon River, Pará
<i>Myxobolus colossomatis</i> Molnár and Bekési, 1993	11.8 (11.4–12.2)	6.9 (6.6–7.2)	--	6.0 (5.8–6.6)	2.1 (1.8–2.5)	7–8	<i>Colossoma macropomum</i> Several organs	Pond-cultured Amazon River

Source: own authorship

Description of *Henneguya* n. sp. 1 (Figs. 3 and 4).

In the present study, plasmodia found in the gill filament of ten specimens of *C. schwartzi* captured in the Nhamundá River in the municipal region of Nhamundá, in the State of Amazonas, Brazil. Plasmodia of *Henneguya* n. sp. 1 were observed in 27.7 % (10/36) of the fish examined in Nhamundá River. No plasmodia were observed in any other sites.

Plasmodia found in the gill filaments were rounded and white. Mature myxospores of *Henneguya* n. sp. 1 had an ellipsoid shape, measuring (n=30): 19.0 ± 3.5 (12.3-26.1) μm in length, 8.2 ± 1.5 (5.1-11.2) μm in width and a thickness of 6.6 ± 0.9 (5.2-7.7) μm . Caudal processes were measuring 45.5 ± 2.5 (40.2-49.7) μm . At the anterior pole of the myxospore, two elongated capsules were present, occupying approximately $\frac{3}{4}$ of the myxospore body. Total myxospore length was of 64.8 ± 2.5 (56.2-73.07) μm . The polar capsules were equal in size, measuring 5.09 ± 1.1 (3-6.8) μm in length and 2.5 ± 0.4 (2-3.9) μm in width, and had 3-4 polar tubule coils (Figures. 3 and 4).

Figure. 3 Photomicrographs of mature myxospores of *Henneguya* n. sp. 1, parasite of the gill filament of *Corydoras schwartzi*. **A.** Mature myxospore. **B.** Numerous myxospores after plasmodium rupture. Scale bar = 5 μm

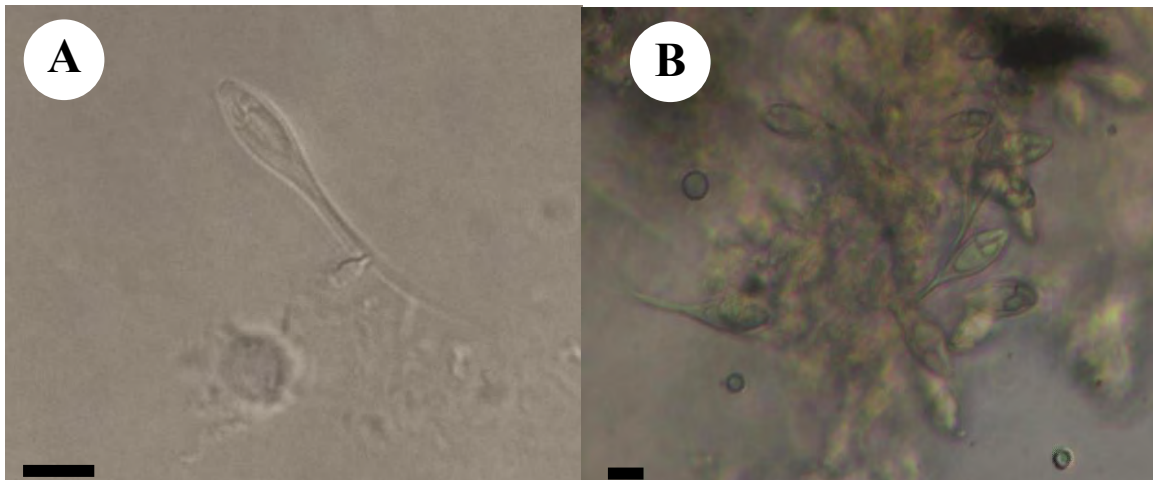
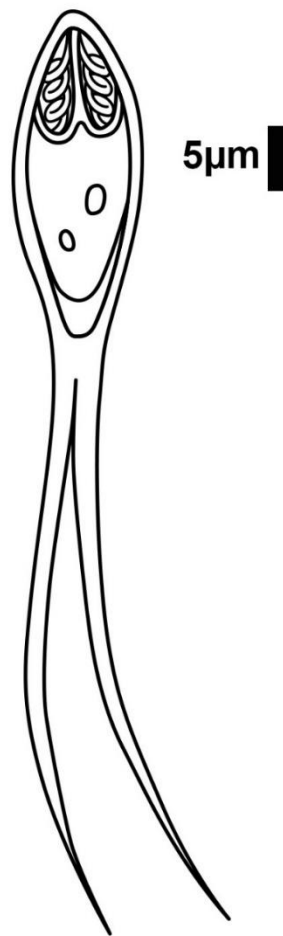


Figure. 4 Schematic representation of the myxospores of myxosporean *Henneguya* parasite of *Corydoras* spp. from the Amazon basin. *Henneguya* n. sp. 1 parasite of the gill filaments of *Corydoras schwartzi*. Scale bar = 5 μ m.



Source: own authorship

Taxonomic summary

Type host: *Corydoras schwartzi* Rössel, 1963 (Siluriformes: Callichthyidae).

Type locality: Nhamundá River Nhamundá, Amazonas, Brazil (2°11'09" S, 56°42'46" W).

Site of infection: gill filaments.

Prevalence: 27.7% (10 infected in 36 examined)

Molecular data: A partial SSU rDNA and ITS-1 sequence of 2.329 bp was deposited in GenBank and a partial LSU rDNA sequence of 1.426 bp was deposited in GenBank (accession number OR268881).

The morphological/morphometrical data, biological traits, and SSU rDNA, ITS-1 and LSU rDNA sequences of *Henneguya* n. sp. 1 was compared with other species of *Henneguya* described (Eiras 2002; Eiras and Adriano, 2012; Rangel et al. 2023), but differences were observed at least one of the characters as myxospores or polar capsules dimensions, number polar tubules coils, biological traits, and SSU rDNA (when available).

BLASTn analysis, based on the partial SSU rDNA complete ITS-1 sequence, revealed that the closest species was *Henneguya guanduensis* Vieira, Pelegri, Abdallah and Azevedo, 2019 (MK415825), with 92.02% of similarity. BLASTn analysis, based on the partial LSU rDNA sequence, revealed that the closest species was *Henneguya sutherlandi* Griffin, Pote, Wise, Greenway, Mauel and Camus, 2008 (OK030697), with 89% of similarity.

Table 3. Comparative data of myxospore dimensions of all *Henneguya* species described from the Amazon basin. Dimensions are given in micrometers (μm) and expressed as mean \pm standard deviation followed by range in parentheses. Total myxospore length (TL), myxospore body length (BL), caudal appendage length (Appl), myxospore width (W), myxospore thickness (T), polar capsule length (CL), polar capsule width (CW), number of polar filament coils (NCF), dashes (--) no data.

Species	Myxospore (μm)					Polar capsules (μm)		NCF	Type host and site of infection	Type locality
	TL	BL	Appl	W	T	CL	CW			
<i>Henneguya</i> n. sp. 1 This study	64.8 \pm 2.5 (56.2-73)	19 \pm 3,5 (12.3-26.1)	45.5 \pm 2.5 (40.2-49.7)	8.2 \pm 1.5 (5.1-11.2)	6.6 \pm 0.9 (5.2-7.7)	5.0 \pm 1.1 (3-6.8)	2.5 \pm 0.4 (2-3.9)	2-3	<i>Corydora schwartzi</i> gill filaments	Nhamundá River, Amazonas
<i>Henneguya amazonica</i> Azevedo et al. 2011; Rocha, Matos and Azevedo, 1992	59.3 \pm 0.56 (55-65.9)	13.9 \pm 0.16 (11.5-14.9)	45.4 \pm 0.61 (41.7-52.1)	5.7 \pm 0.06 (5.2-6.3)	--	3.3 \pm 0.02 (2.7-3.6)	1.5 \pm 0.04 (1.1-1.9)	6	<i>Crenlcichla lepldota</i> gill lamellae	Amazonas River, Amazonas
<i>Henneguya brachypomus</i> Capodifoglio et al. 2020	57.5 \pm 3.5 (52.4-61.6)	13.0 \pm 0.5 (11.7-13.8)	44.7 \pm 3.0 (40.5-48.1)	4.3 \pm 0.2 (4.0-4.6)	3.8 \pm 0.2 (3.5-4.3)	6.3 \pm 0.5 (5.6-7.3)	1.6 \pm 0.2 (1.3-2.0)	8-9	<i>Piaractus brachypomus</i> gill lamellae	Tapajós River, Pará
<i>Henneguya tapajoensis</i> Zatti et al. 2018	54.6 \pm 3.9 (47.2-62.2)	16.4 \pm 1.2 (14.5-19.1)	39 \pm 3.9 (31.7-46.5)	7 \pm 0.4 (5.7-9.3)	5 \pm 0.1 (4.8-5.1)	4.2 \pm 0.5 (2.9-5)	2.1 \pm 0.4 (1.5-2.8)	4-5	<i>Cichla pinima</i> gill filaments	Tapajós River, Pará
<i>Henneguya tapariensis</i> Capodifoglio et al. 2020	53.4 \pm 2.8 (47.4-59.0)	13.5 \pm 0.4 (12.5-14.4)	40.3 \pm 2.7 (35.0-44.8)	3.6 \pm 0.2 (3.1-3.9)	2.5 \pm 0.4 (1.9-3.2)	5.0 \pm 0.4 (4.1-5.9)	1.3 \pm 0.1 (1.0-1.7)	4-5	<i>Piaractus brachypomus</i> gill lamellae	Tapajós River, Pará
<i>Henneguya longisporoplasma</i> Zatti et al. 2022	53.4 \pm 2.9 (48.5-59.2)	12.6 \pm 0.6 (11.7-13.4)	40.7 \pm 2.8 (36.5-45.9)	5.7 \pm 0.5 (4.7-6.5)	5.3 \pm 0.5 (5-5.6)	3.5 \pm 0.3 (2.8-4)	1.9 \pm 0.2 (1.8-2.3)	4-5	<i>Plagioscion squamosissimus</i> gill filaments, fins, and kidney	Tapajós River, Pará

Species	Myxospore (µm)					Polar capsules (µm)		NCF	Type host and site of infection	Type locality
	TL	BL	Appl	W	T	CL	CW			
<i>Henneguya multiradiatus</i> Mathews et al. 2020	44.5 ± 0.6 (43.9–45.1)	18.7 ± 31 0.9 (16.8–19.6)	--	7.1 ± 0.2 (6.6–7.4)	5.5 ± 0.3 (4.9–5.6)	9.1 ± 0.1 (8.8–9.4)	1.7 ± 0.1 (1.6–1.8)	10–11	<i>Brochis multiradiatus</i> serous membrane	Napo River, Peru
<i>Henneguya sacacaensis</i> Ferreira et al. 2020	46.5 ± 5.47	16.5 ± 2.64	30 ± 6.87	5.1 ± 0.31	--	3.83 ± 0.31	1.6 ± 0.20	7–9	<i>Satanoperca jurupari</i> gill filaments	Curia River, Amapá
<i>Henneguya santarenensis</i> Naldoni et al. 2018	31.9 ± 3 (26.3–36.1)	10.8 ± 0.5 (9.6–11.9)	21 ± 3.1 (16.6–25.6)	4.3 ± 0.3 (3.7–4.9)	3.6 ± 0.2 (3.4–3.7)	4.6 ± 0.4 (3.8–5.5)	1.4 ± 0.2 (1–1.7)	15	<i>Phractocephalus hemiolipterus</i> gill lamellae	Tapajós River, Pará
<i>Henneguya tucunarei</i> Zatti et al. 2018	43.8 ± 4.1 (36.1–49.6)	14 ± 0.8 (12.1–15.7)	28.1 ± 4.3 (19.6–35.6)	6.1 ± 0.7 (4.9–7.8)	--	3.4 ± 0.5 (2.5–4.6)	2 ± 0.3 (1.3–2.6)	3–4	<i>Cichla monoculus</i> gill filaments	Tapajós River, Pará
<i>Henneguya jariensis</i> Zatti et al. 2018	46.7 ± 1.5 (43.9–49.2)	13.4 ± 0.7 (11.9–14.6)	33.2 ± 1.7 (30.2–37)	6.5 ± 0.5 (4.9–7.3)	--	4 ± 0.3 (3.4–4.3)	2 ± 0.1 (1.7–2.4)	4	<i>Cichla monoculus</i> fins	Jari River, Amapá
<i>Henneguya paraensis</i> Velasco et al. 2016	42.30 ± 0.35 (41.65–42.95)	12.8 ± 0.42 (12.38–13.22)	29.5 ± 0.73 (28.77–30.23)	8.6 ± 0.32 (8.18–8.92)	--	7.4 ± 0.16 (6.67–7.56)	2.6 ± 0.08 (2.52–2.68)	5–7	<i>Cichla temensis</i> gill filaments	Tocantins River, Pará
<i>Henneguya melini</i> Mathews, Maia and Adriano, 2016	40.8 ± 0.3 (40.3–41.1)	15.5 ± 0.2 (15.3–15.70)	25.30 ± 0.10 (25.2–25.4)	4.7 ± 0.1 (4.6–4.8)	--	4.8 ± 0.5 (4.3–5.3)	1.7 ± 0.3 (1.4–2)	5–6	<i>Corydoras melini</i> gill filaments	Negro River, Amazonas
<i>Henneguya aequidens</i> Videira et al. 1984	41 ± 1.5	15 ± 0.9	27 ± 0.6	6 ± 0.8	--	3 ± 0.3	3 ± 0.3	4–6	<i>Aequidens plagiozonatus</i> gill filaments	Peixe Boi River, Pará
<i>Henneguya torpedo</i> Chen and Ma, 1998; Azevedo et al. 2011	48.62 ± 0.51 (48.3–48.9)	28.53 ± 0.36 (28.3–30.1)	19.64 ± 0.44 (19.2–19.9)	7.25 ± 0.31 (7–7.5)	3.06 ± 0.2 (2.9–3.1)	6.41 ± 0.26 (6.3–6.6)	1.84 ± 0.19 (1.7–1.9)	5–6	<i>Brachyhypopomus pinnicaudatus</i> brain and spinal cord	Peixe Boi River, Pará

Species	Myxospore (µm)					Polar capsules (µm)		NCF	Type host and site of infection	Type locality
	TL	BL	Appl	W	T	CL	CW			
<i>Henneguya arapaima</i> Adriano et al. 2009; Feijó et al. 2008	51.6 ± 3.4 (48.4–53.1)	14.2 ± 0.8 (13.5–15.2)	38.3 ± 2.9 (38–41.2)	5.7 ± 0.5 (5.1–6.1)	4.9 ± 0.2 (4.7–5.3)	6.5 ± 0.2 (6.3–6.8)	6.3 ± 0.1 (6.3– 6.8) 6.3 ± 0.1 (6.2–6.6)	5	<i>Arapaima gigas</i> gill arch and gall bladder	Araguaia River, Goiás
<i>Henneguya rondoni</i> Naldoni et al. 2011; Azevedo et al. 2008	17.7 (16.9–18.1)	7 (6.8–7.3)	10.7 (10.3–11)	3.6 (3–3.9)	2.5 (2.2–2.8)	2.5 (2.2–2.8)	0.85 (0.79–0.88)	6–7	<i>Gymnorhamphichthys rondoni</i> lateral nerves	Amazonas River, Pará
<i>Henneguya rhamdia</i> Adriano et al. 2012; Matos et al. 2004	50 ± 1.8	13.1 ± 1.1	36.9 ± 1.6	5.2 ± 0.5	--	4.7 ± 0.4	1.1 ± 0.2	10–11	<i>Rhamdia quelen</i> gill filaments	Peixe Boi River, Pará
<i>Henneguya schizodon</i> Carriero et al. 2013; Eiras et al. 2004	28.9 (27–30)	13.1 (12–14)	16.3 (15–17)	3.3 (3–4)	--	5.4 (5–6)	1.3 (1–1.5)	8–10	<i>Schizodon fasciatum</i> kidney	Amazonas River, Amazonas
<i>Henneguya friderici</i> Azevedo et al. 2011; Casal, Matos and Azevedo, 2003	33.8 (28.7–39.3)	10.4 (9.6–11.8)	23.3 (19.1–28.7)	5.7 (4.8–6.6)	4.9	4.9 (4.25–5.9)	2.1 (1.59–2.62)	7–8	<i>Leporinus friderici</i> gills, gut, kidney, and liver	Amazonas River, Pará
<i>Henneguya astyanax</i> Feijó et al. 2008; Vital et al. 2003	47.8 ± 0.71	15.2 ± 0.77	32.6 ± 1.11	5.7 ± 0.71	4.2 ± 0.31	5.0 ± 0.13	1.5 ± 0.07	8–9	<i>Astyanax keithi</i> , gill filaments	Amazonas River, Pará
<i>Henneguya curimata</i> Azevedo et al. 2008; Azevedo et al. 2002	35.4 (34.2–36.1)	16.6 (16–17.4)	19.1 (18.3–19.9)	6.2 (5.8–6.6)	--	3.3 ± 0.02 (2.7–3.6)	1.5 ± 0.04 (1.1–1.9)	10–11	<i>Curimata inornata</i> kidney	Amazonas River, Pará
<i>Henneguya testicularis</i>	27.5 (27–28.5)	14 (14–14.5)	13.5 (13–14.5)	6.5 (6–6.5)	--	9 (8.5–9.5)	2 (2–2.5)	12–13	<i>Moenkhausia oligolepis</i> testicle	Amazonas River, Pará

Species	Myxospore (µm)					Polar capsules (µm)		NCF	Type host and site of infection	Type locality
	TL	BL	Appl	W	T	CL	CW			
Matos, Tajdari and Azevedo, 2005; Azevedo, Corral and Matos, 1997										
<i>Henneguya malabarica</i> Eiras et al. 2004; Azevedo and Matos, 1996	28.3 (26.6–29.8)	12.6 (11.8–13.1)	17.1 (16.2–18.9)	4.8 × 3.6	--	3.7 (3.0–4.3)	1.8 (1.6–2.2)	6–7	<i>Hoplias malabaricus</i> gill filaments	Estuarine region, Pará
<i>Henneguya adherens</i> Eiras et al. 2003; Azevedo and Matos, 1995	32.3 (30.7–35.1)	12.4 (10.5–13.8)	20.5 (18–21.7)	5.8 (5.1–6.5)	--	3.1 (2.8–3.5)	1.2 (1–1.6)	3–4	<i>Acestrorhynchus falcatus</i> gill filaments	Amazonas River, Amazonas
<i>Henneguya quelen</i> Abrunhosa et al. 2018	40.0 ± 2.8 (37.0–42.8)	15.6 ± 0.8 (14.3–16.4)	24.3 ± 2.2 (21–26.5)	4.1 ± 0.3 (3.9–4.4)	--	5.5 ± 0.5 (5.2–6.0)	1.6 ± 0.2 (1.4–1.8)	--	<i>Rhamdia quelen</i> kidney	Paracauari River, Pará
<i>Henneguya peruviana</i> Mathews et al. 2018	24.2 ± 1.3 (22.9–25.5)	13.4 ± 0.9 (12.5–14.3)	10.7 ± 1.2 (9.5–11.9)	3.9 ± 0.1 (3.8–4.0)	--	3.3 ± 0.2 (3.1–3.5)	1.6 ± 0.2 (1.4–1.8)	4–5	<i>Hyphessobrycon Loretoensis</i> Gill filaments	Nanay River, Peru
<i>Henneguya loretoensis</i> Mathews, Naldoni and Adriano, 2018	36.2 ± 0.1 (36.1–36.3)	14.3 ± 0.1 (14.2–14.4)	21.9 ± 0.1 (21.8–22.0)	5.1 ± 0.1 (4.9–5.3)	--	5.1 ± 0.1 (4.9–5.3)	2.4 ± 0.2 (2.1–2.7)	5	<i>Corydoras leucomelas</i> Gill filaments	Nanay River, Peru

Source: own authorship

Remarks

This study represents the third documentation of *Myxobolus* infection in *Corydoras* fish from South America. The species *Myxobolus niger* Mathews, Maia and Adriano, 2016, described from the gill arch of *C. melini* Lönnberg and Rendahl, 1930 (Mathews et al. 2016a), and *Myxobolus adrianoi* Mathews, Madrid, Mertins, Rigoni and Morandini, 2020, described from the serosa layer of the intestine of *C. schwartzi* Rössel, 1963 (Mathews et al. 2020), were compared with the new discovered *Myxobolus* species. This comparison revealed significant morphological and morphometric differences between the three *Myxobolus* species found in the genus *Corydoras*. The new identified myxospore is considerably smaller in both length and width (9.2 μm in *Myxobolus* n. sp. 1 vs. 22.4 μm in *M. adrianoi* and 16.3 μm in *M. niger* in length; 7.5 μm in *Myxobolus* n. sp. 1 vs. 11.3 μm in *M. adrianoi* and 6.8 μm in *M. niger* in width). Similarly, the two polar capsules are smaller and narrower (3.6 μm in *Myxobolus* n. sp. 1 vs. 14.3 μm in *M. adrianoi* and 6.5 μm in *M. niger* in length; 2.3 μm in *Myxobolus* n. sp. 1 vs. 5.0 μm in *M. adrianoi* and 2.0 μm in *M. niger* in width). Moreover, differences can be observed in the number of coils in the polar filament, with the present study showing three to four coils, *M. adrianoi* having four coils, and *M. niger* having six to seven coils.

The organ and tissue specificity has been considered a taxonomic key for the identification of freshwater histozoic platysporines, particularly for species belonging to the genus *Myxobolus* (Molnár 2002; Molnár and Székely 2014). Accordingly, differences are observed in the infected tissue when comparing the two species of *Myxobolus* infecting *Corydoras* spp., for which information is available in the literature, with the new species described herein (gill arch in *M. niger* and serosa layer of intestine in *M. adrianoi* and branchial arch in *Myxobolus* n. sp. 1). Unfortunately, data on the partial sequences of the SSU rDNA gene from these species are not available for comparison and insertion in the phylogenetic analysis.

The newly described species, *Myxobolus* n. sp. 1, was compared to all previously identified *Myxobolus* species from the Amazon basin (Table 2). Among the Amazonian species, the myxospores of *Myxobolus* n. sp. 1 exhibited morphological similarities to those of *Myxobolus matosi* Capodifoglio et al. 2019, and *Myxobolus figueirae* Naldoni et al. 2018. However, in comparison to *M. matosi*, the new species displayed a slightly smaller body length (9.2 μm vs. 9.6 μm) and slightly wider myxospores (7.5 μm vs. 7

μm). *Myxobolus* n. sp. 1 also had shorter polar capsules (3.6 μm vs. 4.3 μm) (Table 3). These species further differ in their fish hosts and sites of infection: *Myxobolus* n. sp. 1 infects the branchial arch of a Callichthyidae host, while *M. matosi* infects the surface of the operculum of a Serrasalminidae host.

When comparing *Myxobolus* n. sp. 1 to *M. figueirae*, several morphological differences were observed. *Myxobolus* n. sp. 1 had a slightly longer length (9.2 μm vs. 9.5 μm) and a longer width (7.5 μm vs. 6.4 μm). The polar capsule length of *Myxobolus* n. sp. 1 was slightly smaller (3.6 μm vs. 4.1 μm), and it had a lower number of polar filament coils (3-4 vs. 7-8) (Table 2). These species also differ in their fish hosts and sites of infection: *Myxobolus* n. sp. 1 infects the branchial arch of a Callichthyidae host, while *M. figueirae* infects the skin of a Pimelodidae host.

When comparing *Myxobolus* n. sp. 1 to other *Myxobolus* species from South America and other continents (Eiras et al 2005, 2014, 2021), it exhibited morphological similarities to *M. sandrae* Reuss, 1906, which is found in Russia and parasitizes the muscle of *Sander lucioperca* Linnaeus, 1758. *Myxobolus* n. sp. 1 and *M. sandrae* share similar dimensions in terms of myxospore length (9.2 μm vs. 9.2 μm), body width (7.5 μm vs. 7.2 μm), polar capsule length (3.6 μm vs. 3.5 μm), and polar capsule width (2.3 μm vs. 2.0 μm). However, the myxospores of *M. sandrae* have a wide sutural edge with approximately six sutural markings, mostly around the posterior half of the myxospore, while *Myxobolus* n. sp. 1 n. sp. is ovoid in shape. Additionally, these species differ in their fish hosts, geographical areas of occurrence, and tissue tropisms. *Myxobolus* n. sp. 1 parasitizes the branchial arch of *C. agassizii* captured in the Amazon basin in Brazil, whereas *M. sandrae* parasitizes the muscle of *S. lucioperca* in Russia.

The morphological characteristics of *Henneguya* n. sp. 1 were compared with those of all *Henneguya* species previously reported to infect *Corydoras* fish from South America, making it the third species in this category. The comparison included *Henneguya melini* Mathews, Maia and Adriano, 2016, described from the gill filaments of *C. melini* (Mathews et al. 2016b), and *Henneguya loretoensis* Mathews, Naldoni and Adriano, 2018, described from the gill filaments of *C. leucomelas* Eigenmann and Allen, 1942 (Mathews et al. 2018). Although two species of *Henneguya* have previously been described as parasites of the gill filaments of *Corydoras* spp., morphometric comparisons revealed significant differences between *H. melini*, *H. loretoensis*, and the new described

species *Henneguya* n. sp. 1, particularly in terms of total length and length of caudal appendages (Table 3).

Indeed, the comparison showed a large number of noticeable morphological and morphometric differences between the three *Henneguyas* described in the genus *Corydoras*. The newly identified myxospores are substantially superior in total myxospore length (64.8 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 40.8 μm in *H. melini* vs 36.2 μm in total length in *H. loretoensis*), larger and wider in body length and width (19.0 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 15.5 μm in *H. melini* vs 14.3 μm in length in *H. loretoensis* and 8.2 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 4.7 μm in *H. melini* vs 5.1 μm in width *H. loretoensis*). In the same way, the caudal appendage are larger (45.5 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 25.3 μm in *H. melini* vs 21.9 μm in caudal appendage length in *H. loretoensis*). The two polar capsules are similar (5.0 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 4.8 μm in *H. melini* vs 5.1 μm in polar capsule length in *H. loretoensis* and 2.5 μm in *Henneguya* n. sp. 1 vs 1.7 μm in *H. melini* vs 2.4 μm in polar capsule width *H. loretoensis*). Differences may also be observed in the number of coils in the polar filament (two to three in the present study, five coils in *H. melini* and five to six coils in *H. loretoensis*).

The new species, *Henneguya* n. sp. 1, also was compared of all *Henneguyas* spp. species described from the Amazon basin (Table 3). When considering Amazonian species, the myxospores of *Henneguya* n. sp. 1 morphologically resembled those of *Henneguya amazonica* Rocha, Matos and Azevedo, 1992 (Rocha et al. 1992) and *Henneguya brachypomus* Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira Silva and Maia (Capodifoglio et al. 2020). However, compared to *H. amazonica*, the new species had a slightly larger total length (64.8 μm vs 59.3 μm) and larger body length (19.0 μm vs 13.9 μm) and wider myxospores slightly more (8.2 μm vs 5.7 μm). The caudal appendage length resembled (45.5 μm vs 45.4 μm). *Henneguya* n. sp. 1 has larger and wider polar capsules (5.0 μm vs 3.3 μm in length and 2.5 μm vs 1.5 μm in width. Differences may also be observed in the number of coils in the polar filament (two to three in the present study, six coils in *H. amazonica*). Those species also differ in their fish hosts and site of infection: *Henneguya* n. sp. 1 infects gill filaments of a Callichthyidae host and *H. amazonica* infects secondary gill lamellae of a Cichlidae. Indeed, the comparison revealed significant morphological and morphometric differences among the three *Henneguya* species described in the genus *Corydoras*. The newly identified myxospores of *Henneguya* n. sp. 1 exhibit notable variations compared to *H. melini* and *H. loretoensis*.

The myxospores of *Henneguya* n. sp. 1 are considerably larger in total length (64.8 µm) compared to *H. melini* (40.8 µm) and *H. loretoensis* (36.2 µm). Moreover, they possess a greater body length and width (19.0 µm and 8.2 µm, respectively) compared to *H. melini* (15.5 µm and 4.7 µm) and *H. loretoensis* (14.3 µm and 5.1 µm). Additionally, the caudal appendages of *H. schwartzi* are longer (45.5 µm) compared to *H. melini* (25.3 µm) and *H. loretoensis* (21.9 µm). The polar capsules of *Henneguya* n. sp. 1 are similar in size to those of *H. melini* and *H. loretoensis*, with slight variations (5.0 µm vs 4.8 µm vs 5.1 µm in length and 2.5 µm vs 1.7 µm vs 2.4 µm in width, respectively). Furthermore, differences can be observed in the number of coils in the polar filament, with two to three coils in the present study, five coils in *H. melini*, and five to six coils in *H. loretoensis*.

In comparison with other *Henneguya* species from South America and other continents (Eiras 2002; Eiras and Adriano, 2012; Rangel et al. 2023), *Henneguya* n. sp. 1 exhibits morphological similarities with *Henneguya aegea* Katharios et al. 2020, which is found in Japan. Both species share similar dimensions in terms of total myxospore length (*Henneguya* n. sp. 1: 64.86 µm, *H. aegea*: 64.9 µm), body width (*Henneguya* n. sp. 1.: 8.2 µm, *H. aegea*: 8.2 µm), thickness (*Henneguya* n. sp. 1: 6.6 µm, *H. aegea*: 6.2 µm), and length of the caudal appendage (*Henneguya* n. sp. 1: 45.5 µm, *H. aegea*: 42.6 µm). However, there are notable differences between the two species. The body of *H. aegea* is oval-shaped, while the body of *Henneguya* n. sp. 1 is ellipsoid. Additionally, these species differ in their fish hosts, geographical areas of occurrence, and tissue tropisms. *Henneguya* n. sp. 1 parasitizes the gill filaments of freshwater fish from the Callichthidae family, specifically those captured in the Amazon basin, Brazil. On the other hand, *H. aegea* infects the heart (plasmodia in the bulbus arteriosus and the ventricle) of marine fish from the Sparidae family, particularly those obtained from aquaculture in Japan.

Henneguya guanduensis found in *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828 in the gills and intestine captured in the Batalha River, State of São Paulo, Brazil in which the BLASTn analysis, based on the partial SSU rDNA sequence, revealed that it is the closest species to *Henneguya* n. sp. 1 with 92.02% similarity was also compared morphometrically. Exhibited large differences in relation to total length, body width, caudal process, the *Henneguya* in this study is almost twice the size of *H. guanduensis*, both share only the same host family.

Pylogenetic analysis

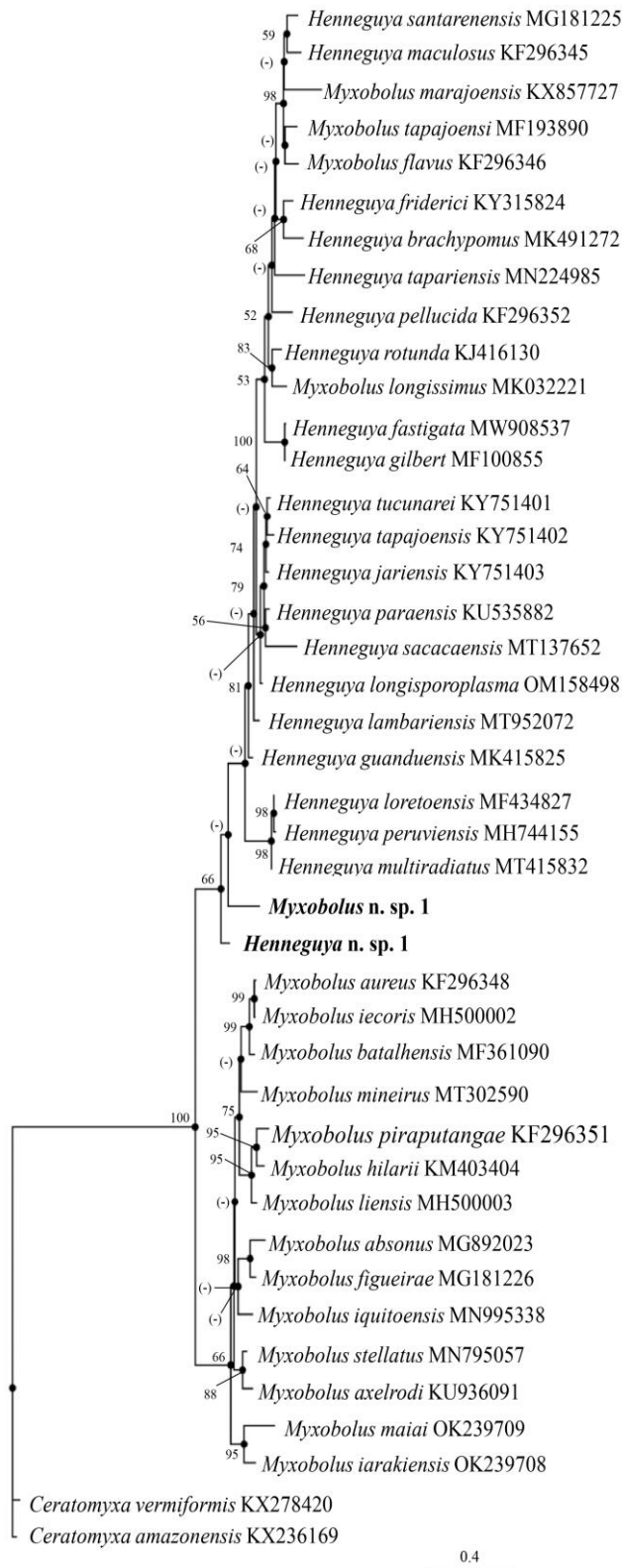
Maximum likelihood analyses, utilizing the SSU rDNA sequences of closely related myxosporean species to the ones studied here, along with well-supported bootstrap values according to BLASTn, revealed that *Myxobolus* n. sp. 1 and *Henneguya* n. sp. 1 are sister species to *H. loretoensis* Mathews, Naldoni and Adriano, 2017. These three species from a subclade that also includes *H. multiradiatus* Mathews et al. 2020, and *H. peruviensis* Mathews et al. 2018, which are parasites of Amazonian ornamental fish (Figure.5).

Table 4. Comparative data of the genetic identity of SSU rDNA of *Henneguya* spp. parasites of the Amazonian ornamental fish. The area above the diagonal shows % pairwise distance identity. The area below the diagonal shows nucleotide differences.

Species	1	2	3	4
1 <i>Henneguya</i> n. sp. 1 (this study)	-	7.92	11.92	7.29
2 <i>Henneguya multiradiatus</i>	415	-	4.75	1.14
3 <i>Henneguya peruviensis</i>	427	67	-	4.0
4 <i>Henneguya loretoensis</i>	457	16	59	-

Source: own authorship

Figure. 5 Maximum likelihood tree inferring phylogenetic relationship between *Myxobolus* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 1 and closely-related myxobolids based on the analysis of SSU rDNA sequences. The above nodes indicate confidence levels. Dashed are shown for values under 50%.



Source: own authorship

4. Discussion

Although previous studies in the Amazon basin have documented a significant number of *Henneguya* spp. and *Myxobolus* spp. infecting wild fishes (Rocha, Matos and Azevedo 1992; Eiras et al. 2004; Carriero et al. 2013; Moreira et al. 2014a, 2014b; Mathews et al. 2018, 2020; Capodifoglio et al. 2019, 2020; Ferreira et al. 2020; Zatti et al. 2017a, 2017b, 2022), there is limited information on myxosporean species described in ornamental fish from the region. *Corydoras* spp. exhibit remarkable diversity and are extensively traded in the international aquatic pet industry. Despite their popularity, there are few studies investigating myxosporean infections in these smaller catfish species (Mathews et al. 2018, 2020; Abrunhosa et al. 2018; Figueredo et al. 2023). In this context, our study presents the first report of a myxosporean species infecting *C. agassizii* from the Amazon region. Additionally, we provide the first report of a *Henneguya* spp. infecting *C. schwartzi* from the Amazon region. Notably, our study is only the second to report a myxosporean species infecting *C. schwartzi*.

These findings contribute to the expanding knowledge of myxosporean diversity in ornamental fish species and highlight the importance of further research in understanding the impact of these parasites on the health and conservation of *Corydoras* spp. in the Amazon region.

Phylogenetic analysis of *Henneguya* n. sp. 1 revealed its association with *H. multiradiatus* Mathews et al. 2020, *H. peruviensis* Mathews et al. 2018, and *H. loretoensis* all of which are described as parasites of Amazonian ornamental fish. However, a significant number of morphological differences in mature myxospores can be observed (Table 3). Furthermore, these species also differ in their SSU rDNA data. *H. loretoensis* was found to be the closest related species to *Henneguya* n. sp. 1., with a difference of 7.29% (Table 4).

The results contribute to the expansion of our understanding of myxosporean parasites in ornamental fish from the Amazon Basin. However, there is a limited number of published surveys on myxosporeans in Amazonian ornamental fish. Therefore, further studies are needed not only to enhance our knowledge of myxosporean diversity but also to evaluate their pathogenicity. This is particularly important considering that the Amazon Basin is the primary source of wild-caught freshwater fish for the multi-billion dollar global aquarium trade (Moreau and Coomes 2007; Hallett et al. 2015).

The present study significantly enhances our understanding of the diversity of myxosporean parasites in Amazonian ornamental fish. It describes two new species and provides valuable insights into the phylogenetic relationships and host-parasite interactions of myxosporeans infecting these native fish. Through the examination of myxospore morphology, morphometric measurements, and molecular data (SSU rDNA, ITS-1 and LSU rDNA), this study successfully identified and described two new species: *Myxobolus* n. sp. 1, which parasitizes the branchial arch of *C. agassizii*, and *Henneguya* n. sp. 1, which infects the gill filament of *C. schwartzi*. Overall, this study significantly contributes to the knowledge of myxozoan biodiversity in Brazil.

5. References

- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J.L., Hamoy, I., Matos, E.R. (2018). A new species of Myxosporea, *Henneguya quelen*, from silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriforme: Pimelodidae) in Amazonian region Parasitol. Res., 117, pp. 3809-3820.
- Capodifoglio KRH, Adriano EA, Silva MRM, Maia AAM. (2019). The resolution of the taxonomic dilemma of *Myxobolus colossomatis* and description of two novel myxosporeans species of *Colossoma macropomum* from Amazon basin. Acta Trop.
- Capodifoglio KRH, Meira CM, da Silva MRM, Corrêa LL, Adriano EA, Maia AAM. (2020). Morphology and molecular data of two novel cnidarian myxosporean (Myxobolidae) infecting *Piaractus brachypomus* from the Amazon basin. Acta Trop.
- Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PS, Maia AAM (2013) Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. PLoS ONE 8: e73713.
- CIEAM. (2019). Mercado Da Pesca Ornamental Movimenta R\$ 5 Milhões No Am E Atrai Atenção Internacional. Cieam, Manaus, 20 Nov. 2019.
- Eiras, J.C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxobolidae). Syst. Parasitol., v. 52, p. 43-54.
- Eiras, J.C., Malta, J.C., Varela, A., Pavanelli, G.C. (2004). *Henneguya schizodon* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Schizodon fasciatus* (Characiformes, Anostomidae). Parasite 11: 169-173.
- Eiras, J.C; Molnár, K.; Lu, Y.S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Systematic Parasitology 61:1-46.
- Eiras, J.C.; Adriano, E.A. A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012.
- Eiras, J.C.; Zhang, J.; Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. Systematic Parasitology 88:11-36.
- Eiras JC, Cruz CF, Saraiva A, Adriano EA. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. Folia Parasitol (Praha).
- Eschmeyer, W. N. (2015). Catalog of fishes: genera, species, references. San Francisco, CA, California Academy of Sciences. 3v., ill. Available from <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp/>.
- Ferreira RLDS, Silva DTD, Araújo PG, Hamoy I, Matos E, Videira MN. (2020). *Henneguya sacacaensis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing gills of the acará bicudo *Satanoperca jurupari* (Osteichthyes: Cichlidae) in eastern Amazon. Rev Bras Parasitol Vet.
- Fiala I, Hlavničková M, Kodádková A, Freeman MA, Bartošová-Sojtková P, Atkinson SD. (2015). Evolutionary origin of *Ceratonova shasta* and phylogeny of the marine myxosporean lineage. Mol Phylogenet Evol. 2015 May;86:75-89.
- Figueredo RTA, Müller MI, Arana S, Long PF, Adriano EA. (2023). Phylogenetic and host-parasite relationship analyses of *Henneguya caquetaia* sp. nov (Myxosporea: Myxobolidae) infecting an Amazonian cichlid fish. Microb Pathog.

Giribet G, Edgecombe GD (2020) The Invertebrate Tree of Life. Princeton University Press, Princeton, USA.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Ser. 41, oo. 95-98.

Holland JW, Okamura B, Hartikainen H, Secombes CJ. (2011). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. Proc Biol Sci. 2011 Feb 22;278(1705):546-53.

Holzer AS, Bartošová-Sojtková P, Born-Torrijos A, Lövy A, Hartigan A, Fiala I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. Mol Ecol. 2018 Apr;27(7):1651-1666.

Junk, W.J.; Soares, M.G.M.; Bayley, P.B. (2007). Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. Aquatic Ecosystem Health & Management, 10(2): 153-173.

Lom, J. Arthur, J.R. (1989). A Guideline for the Preparation of Species Description in Myxosporea. J. Fish Dis., v.12, p.151-156.

Lom J, Dyková I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol (Praha). 2006 Mar;53(1):1-36. PMID: 16696428.

Mathews, P.D., Silva, M.R.M., Maia, A.M.A., Adriano, E.A. (2015). Ultrastructure and ssrRNA sequencing of *Myxidium amazonense* n. sp. a myxosporean parasite of *Corydoras melini* from the Rio Negro river, Amazonas state, Brazil.

Mathews, P.D., Maia, A.A.M., Adriano, E.A., (2016a.) Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. Acta Trop. 158, 214–219.

Mathews, P.D., Maia, A.A.M., Adriano, E.A., (2016b). *Henneguya melini* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Corydoras melini* (Teleostei: Siluriformes) in the Amazon region: morphological and ultrastructural aspects. Parasitol. Res. 115, 3599-3604.

Mathews PD, Mertins O, Pereira JOL, Maia AAM, Adriano EA. (2018). Morphology and 18S rDNA sequencing of *Henneguya peruviansis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), a parasite of the Amazonian ornamental fish *Hyphessobrycon loretoensis* from Peru: A myxosporean dispersal approach. Acta Trop.

Mathews, P.D. , Madrid, R.R.M., Mertins, O. Rigoni, V.L.S., Morandini, A.C (2020). A new *Myxobolus* (Cnidaria: myxosporea) infecting the ornamental catfish *Corydoras schwartzi* from the Purus River in Brazil. Eur. J. Taxon., 620.

Molnár, K. (2002). Site preference of myxosporeans in the gill. Diseases of Aquatic Organisms 48: 197–207.

Molnár K, Székely C. (2014). Tissue preference of some myxobolids (Myxozoa: Myxosporea) from the musculature of European freshwater fishes. Dis Aquat Organ.

Moreira, G.S.A., Adriano, E.A., Silva, M.R.M., Ceccarelli, P.S., Maia, A.A., (2014a). Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River. Brazil. Parasitol. Res. 113, 81–90.

Moreira, G.S.A., Adriano, E.A., Silva, M.R.M., Ceccarelli, P.S., Maia, A.A.M., (2014b).The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guacu River,

Brazil. Parasitol. Res. 113, 1703–1711.

Moreau MA, Coomes OT (2006) Potential threat of the international aquarium fish trade to silver arawana *Osteoglossum bicirrhosum* in the Peruvian Amazon. *Oryx* 40:152–160.

Moreau, M.; Coomes, O. T. (2007). Aquarium fish exploitation in western Amazonia: conservation issues in Peru. *Environmental Conservation*. v. 34, p. 1222. 2007.

Rangel LF, Santos MJ, Rocha S. (2023). Synopsis of the species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Cnidaria: Myxosporea: Myxobolidae) described since 2012. *Syst Parasitol*

Rocha E, Matos E, Azevedo C (1992) *Henneguya amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. *Eur J Protistol* 28(3):273–278.

Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. (2018). Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. *Integr Comp Biol*. 2018 Dec 1;58(6):1132-1145. doi: 10.1093/icb/icy039. PMID: 29860443.

Tencatt LFC, Gomes VC, Evers H-G. (2023). A new species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from the rio Madre de Dios basin, Peruvian Amazon, with comments on *Corydoras aeneus* identity. *Neotrop Ichthyol*.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gilson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994), pp. 4673-4680.

Zatti, S.A., Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L., Maia, A.A.M., Adriano, E.A. (2017a). *Ceratomyxa gracillima* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea) provides evidence of panmixia and ceratomyxid radiation in the Amazon basin. *Parasitology*, <https://doi.org/10.1017/S0031182017002323>.

Zatti, S.A., Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L., Maia, A.A.M., Adriano, E.A. (2017b). Amazonian waters harbour an ancient freshwater *Ceratomyxa* lineage (Cnidaria: Myxosporea). *Acta Tropica*, 169: 100–106.

Zatti, S.A., Marinho, A.M.R., Adriano, E.A., Maia, A.A.M. (2022). Integrative Taxonomy Reveals a Panmictic Population of *Henneguya longisporoplasma* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) in the Amazon Basin. *Acta Parasitol*.

CAPÍTULO 2.

***Myxobolus* n. sp. 2 (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the brain of the neon tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae) from Brazilian Amazon**

A formatação segue o padrão do periódico Parasitology Research

***Myxobolus* n. sp. 2 (Myxosporaea: Myxobolidae) infecting the brain of the neon tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae) from Brazilian Amazon**

ABSTRACT

A total of 24 specimens of the *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956, (Teleostei: Characidae), were collected from the Nhamundá River in the state Amazonas, Brazil (2°11'09" S, 56°42'46" W). Fragments of the brain tissue were extracted for analysis via microscopy, and 3 specimens (12.5%) presented parasites of the genus *Myxobolus*. The myxospores were $11.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ (8.2-13.5) in length, $8.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (6.37-10.22) in width, and $5.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (4.9-6.2) in thickness in lateral view. There were two symmetric polar capsules measuring $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (2.0-4.7) in length and $2.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (1.2-2.8) in width, and the polar capsule contained a coiled polar filament with approximately 3-4 turns. Some fragments were conserved in ethanol for molecular genetic analysis. A partial sequence of 1.857 bp from SSU rDNA and 1.302 bp from LSU rDNA were obtained from brain tetra-neon myxospore samples, which did not match any sequences in the database. Phylogenetically, this parasite was loosely grouped within a clade containing *Myxobolus* spp. from other Amazonian hosts of the Characiformes and Siluriformes orders. The morphological data, together with molecular phylogeny, supported the designation of a new species *Myxobolus* n. sp. 2.

Keywords: Myxozoa; Tetra-neon; Ornamental fish; SSU rDNA; LSU rDNA.

***Myxobolus* n. sp. 2 (Myxosporea: Myxobolidae) um parasita que infecta o cérebro do tetra-neon *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae) da Amazônia brasileira**

RESUMO

Um total de 24 espécimes de *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Teleostei: Characidae), foram coletados no rio Nhamundá, no estado do Amazonas, Brasil (2°11'09" S, 56°42'46" W). Fragmentos de tecido cerebral foram extraídos para análise em microscopia, sendo que 3 espécimes (12.5%) apresentavam parasitas do gênero *Myxobolus*. Os esporos tinham $11.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ (8.2-13.5) de comprimento, $8.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (6.37-10.22) de largura e espessura de $5.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (4.9-6.2) na vista lateral, duas capsula polares simétricas de $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (2.0-4.7) de comprimento, $2.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (1.2-2.8) de largura e a cápsula polar continha um filamento polar enrolado com aproximadamente 3-4 voltas. Sequências de 1.857 pb do SSU rDNA e 1.302 pb do LSU rDNA foram obtidas a partir de amostras de esporos de tetra-neon do cérebro, que não correspondiam a nenhuma sequência no banco de dados. Filogeneticamente, esse parasita foi agrupado fracamente dentro de um clado contendo *Myxobolus* spp. de outros hospedeiros amazônicos da ordem Characiformes e Siluriformes. Os dados morfológicos juntamente com a filogenia molecular, apoiaram a designação de uma nova espécie *Myxobolus* n. sp. 2.

Palavras-chave: Myxozoa; Tetra-neon; Peixe ornamental; SSU rDNA; LSU rDNA.

1. Introduction

Paracheirodon axelrodi Schultz, 1956 holds significant economic importance for the state of Amazonas, accounting for over 80% of the 30-40 million live ornamental fish exported annually from the region to the global market (Chao 2001). Furthermore, this species is one of the main ones among the ten groups of ornamental fish species exported by Brazil (Rezende and Fujimoto 2021). Despite its economic relevance, there is a limitation in parasitological surveys or reports of specific parasitic species in *Paracheirodon* spp. Little is known about its parasitic fauna, especially regarding myxozoan parasites (Evans and Lester 2001; Novotný and Dvořák 2006; Hongslo and Jansson 2009; Camus et al. 2017).

Among fish parasites, those belonging to the Myxozoa Grassé, 1970, stand out as some of the most significant. Commonly referred to as myxosporeans, Myxozoa are cosmopolitan endoparasites belonging to the phylum Cnidaria (Okamura et al. 2018). Throughout their evolutionary process, myxosporeans have undergone considerable morphological simplifications compared to free-living cnidarians. Within their complex life cycle, they have adopted annelids as invertebrate hosts and more commonly fish as vertebrate hosts, although they have also been reported to parasitize reptiles, aquatic birds, and small mammals (Friedrich et al. 2000; Yokoyama and Masuda 2001; Bartholomew et al. 2008; Hartigan et al. 2012; Székely et al. 2015; Okamura et al. 2015).

According to the literature, myxosporeans are plasmodium-forming parasites that contain myxospores within them. When these spores are found in invertebrate hosts, they are known as actinospores, while in vertebrate hosts, they are known as myxospores (Eiras, 2005). So far, more than 2.600 species of myxozoans have been identified in freshwater and marine environments worldwide (Okamura et al. 2018). Although most myxozoan infections are asymptomatic (Lom and Dyková 1992), some species are known to be highly pathogenic, causing severe diseases in their hosts (Okamura et al. 2015).

The genus *Myxobolus* Bütschli, 1882 is the most diverse genus with 979 described species, the majority of which primarily infect fish in both freshwater and marine environments worldwide (Eiras et al. 2021). This number represents approximately 37% of the known Myxozoa fauna, and it continues to increase with new records from around the world (Batueva 2020). Some of these parasites have been described as highly pathogenic, capable of causing diseases in their hosts. Depending on the infected organ

or infestation, they can lead to mortality and result in significant economic losses (Zatti et al. 2022).

According to literature data, only one species of myxosporean has been described infecting the fish *Paracheirodu axelrodi*, namely *Myxobolus axelrodi* Camus et al. 2017, parasitizing the brain and retinas of imported specimens from Brazil. This study represents the second report of a myxozoan infecting the genus *Paracheirodu*. The morphological, morphometric, and molecular characterization of the parasite is described here.

2. Material and Methods

2.1 Fish Collection

Twenty-four specimens of *Paracheirodon axelrodi* were captured in the Nhamundá River in Amazonas State, Brazil, in December 2021. After being capture, the fish were transported via air transportation to the Laboratory of Fish Immunology and Parasitology (LIP) at the Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA/USP).

The fish were euthanized with an overdose of benzocaine, measured and examined, searching for plasmodia. This methodology was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of São Paulo (USP Process: 9.957.090.0921). Subsequently, the fish were necropsied and the organs tissues, and fluids were examined under stereomicroscopy to detect possible alterations in characteristics and the presence plasmodia. Host tissue infected with myxosporean plasmodia were fixed in buffered 10% formalin for morphological characterization of myxospores and in absolute ethanol for molecular analyses.

2.2 Morphological Characterization

The plasmodia were ruptured and myxospores released were photographed using a Leica DMLB 5000 microscope coupled with a Leica Application Suite software version 3.4.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Morphometric data of the myxospores were obtained in accordance with Lom and Arthur (1989). The dimensions of the myxospores were expressed in micrometres and are reported as mean \pm standard deviation (SD), and the range dimensions are provided in parentheses. Measurements and photographs were acquired from 42 mature myxospores of a plasmodium found infecting *P. axelrodi* fish. Smears containing myxospores were air-dried on to glass slides, fixed with ethyl methanol and stained with Giemsa.

2.3 Molecular Characterization

For molecular analysis, plasmodia were isolated from the tissue of specimens of *P. axelrodi*, placed in tubes and fixed in absute ethanol. DNA was extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, USA), according to the manufacturer's

instructions protocol and quantified using a spectrophotometer at 260 nm. Amplification of the SSU rDNA, ITS-1 and LSU rDNA were performed in a final volume of 25µl, containing 10-50ng of genomic DNA. The reaction consisted of 12.5 µl Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, California, USA), 0.5 µl of each primer (10 pmol), 1 µl of DNA (10 – 50 ng/µl), and 10.5 µl of ultrapure water. The PCR amplification were performed in a ProFlex PCR System (Applied Biosystems™ Inc., California, USA). The PCR protocol for amplification was as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of desnaturation (95 °C for 60s), hybridization (60 °C for 60s or 62°C for LSU-rDNA), and extension (72 °C for 90s) and a final extended elongation step at 72 °C for 5 minutes. Subsequently, polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed targeting the SSU rDNA and LSU rDNA regions, using the listed primers (Table 1).

Table 1. Primers used in this study for amplification and sequencing of the SSU rDNA and LSU rDNA genes.

Primers	Sequence 5'-3'	DNA	Paired with	Reference
18e	CTGGTTGATCCTGCCAGT	SSU	MC3	Hillis & Dixon, 1991
MC5	CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA	SSU	MC3	Molnár et al. 2002
MC3	GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA	SSU	MC5	Molnár et al. 2002
Henn.6F	TGGTCGCAAGGCTGAAACT	SSU	Henn.1R	Dados não publicados
Henn.1R	ACGCTGATCGCAGTTCCA	SSU	Henn.6F	Zatti et al. 2022
Henn.8F	GCGCGCTACAATGACGATG	SSU	Henn.1R	Zatti et al. 2022
NLF160	ACCTCCACTCAGGCAAGATTA	LSU	NLR1270	Van der Auwera et al. 1994
NLF1050	AATCGAACCATCTAGTAGCTGG	LSU	NLR3284/NL R1270	Bartošová et al. 2009
NLR1270	TTCATCCCGCATCGCCAGTTC	LSU	NLF160/NLF 1050	Bartošová et al. 2009
CerZat.6F	GACGCGCATGAATGGACTAAC	LSU	NLR3284	Dados não publicados
NLR3284	TTCTGACTTAGAGGCGTTCAG	LSU	Cer.6F	Van der Auwera et al. 1994

Source: own authorship

The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis in a TAE buffer (Tris–Acetate EDTA, Tris 40 mM, Acetic Acid 20 mM, EDTA 1 mM), stained

with Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA) and analyzed with a Stratagene 2020E transilluminator. The sizes of the amplified fragments were estimated by comparison with the 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA). The PCR products of the two amplified samples were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA). After purification, the amplicons were sequenced using the same primer pairs used for amplification. Sequencing was performed using the first-generation automated DNA sequencer (Sanger method) ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA) with POP7 polymer, the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, and internal control with pGEM™-3Zf(+) DNA provided by Applied Biosystems. The sequencing was carried out at the Biological Resources and Genomic Biology Center (CREBIO) of São Paulo State University (UNESP).

2.4 Sequence Alignment Phylogenetic Analysis

The DNA sequences obtained were visualized and assembled using BioEdit software version 7.2.5 (Haal 1999) with the assistance of the ClustalW algorithm (Thompson et al. 1994) incorporated in this program, using the default settings and were compared with other myxozoan sequences available in the NCBI database using Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

The obtained partial SSU rDNA sequence and 42 sequences from the NCBI database of Myxobolids parasites were used in phylogenetic analysis. For this analysis, species with the closest similarity, as indicated by the Max Score from BLASTn in the GenBank database, were selected. Sequences with a length greater than 800 bp were considered. *Ceratomyxa amazonensis* (KX236169) and *Ceratomyxa vermiformis* (KX278420) were used as outgroup. The nucleotide sequences were aligned using ClustlW (Thompson et al. 1994) and edited using the BioEdit program (Hall 1999) was utilized Maximum Likelihood analysis was performed using the PhyML 3.0 program (Guindon et al. 2010). A bootstrap analysis with 1.000 replicates was carried out to validate the robustness of the tree branches. The resulting phylogenetic tree was visualized using the FigTree v2.0.8 program (Rambaut 2008) and subsequently edited using Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., CA, USA).

3. Results

Description of *Myxobolus* n. sp. 2 (Figures. 1 and 2)

Of the twenty-four *P. axelrodi* specimens examined, three (12.5%) were infected with myxosporean plasmodia. All organs and tissues were examined, and mature plasmodia were specifically found in the brain. The plasmodia contained typical *Myxobolus* genus myxospores within them (Figures 1 and 2). As the morphological and rDNA sequence analyses revealed that both are new myxosporean species and their description are provided below.

3.1 Taxonomic Summary

Phylum Cnidaria Verrill, 1865.

Subphylum Endocnidozoa Schuchert 1996.

Class Myxozoa Grassé, 1970.

Subclass Myxosporea Bütschli, 1881.

Order Bivalvulida Shulman, 1959.

Family *Myxobolidae* Thélohan, 1892.

Genus *Myxobolus* Bütschli, 1882.

Species *Myxobolus* n. sp. 2 (Fig.1 and Fig.2)

Host type: *Paracheiroidon axelrodi* (Schultz, 1956), Characiformes: Characidae

Type of locality: Nhamundá River, Nhamundá municipality, Amazonas state, Brazil (Geographic coordinates: 2°11'09" S, 56°42'46" W).

Site of infection: Brain

Prevalence: 12.5% (03 infected in 24 examined).

Molecular data: A partial SSU rDNA and ITS-1 sequence of 1.857 bp was deposited in GenBank and a partial LSU rDNA sequence of 1.302 bp was deposited in GenBank.

3.2 Morphological Characterization

Myxospores: Round, mature myxospores measuring $11.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ (8.2-13.5) in length, $8.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (6.37-10.22) in width and $5.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (4.9-6.2) in thickness were observed. The two polar capsules were elongated and equally sized and measured $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (2.0-4.7) in length and $2.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (1.2-2.8) in width. Their polar filaments had 3 to 4 coils (Figures 1 and. 2).

Figure. 1 Photomicrographs of mature *Myxobolus* n. sp. 2, parasite of the brain of *Paracheirodon axelrodi* from the Amazon basin. **A.** Frontal view of *Myxobolus* n. sp. 2 found infecting the branchial arch. Note the polar capsule (white arrow). **B.** Numerous myxospores after plasmodium rupture. Scale bar = $5 \mu\text{m}$.

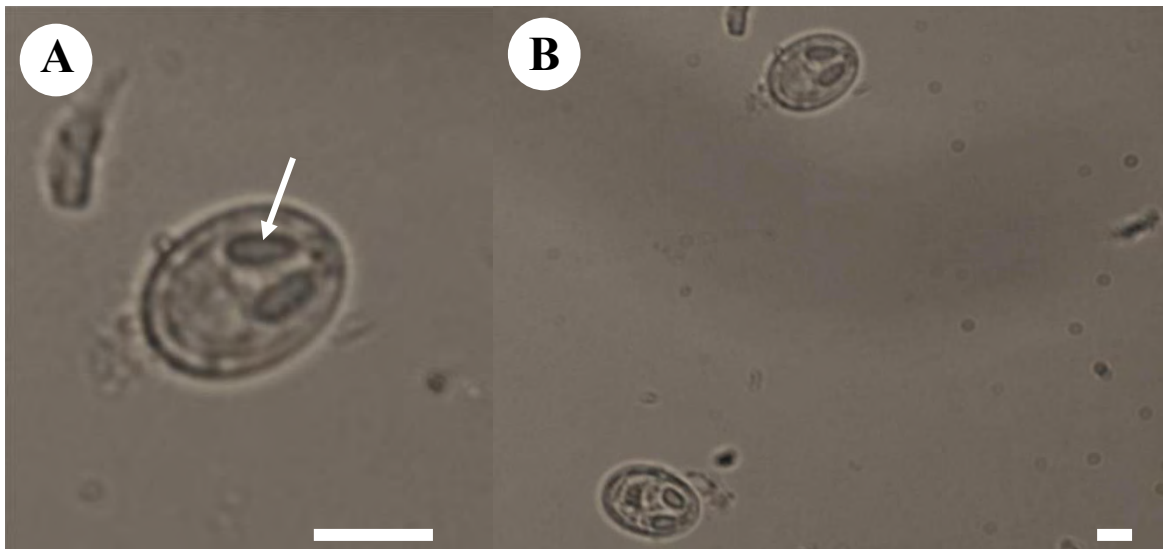
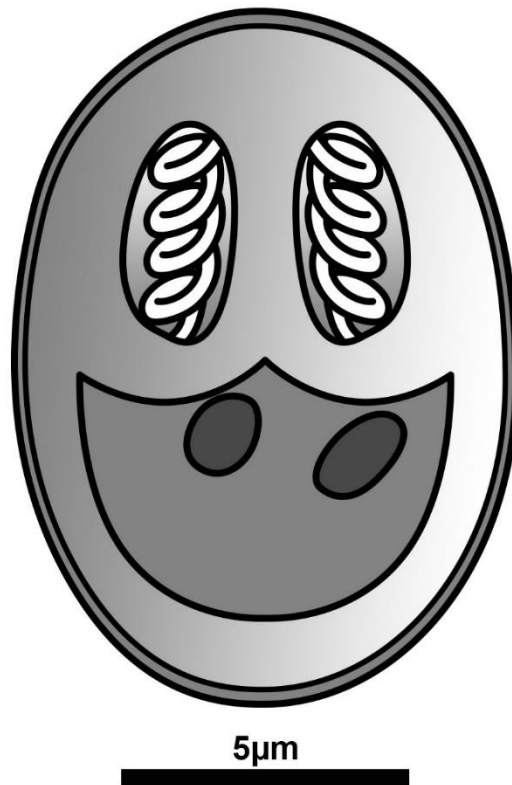


Figure. 2 Schematic representation of the mature myxospore of *Myxobolus* n. sp. 2 parasitizing the brain of *Paracheirodon axelrodi*. Scale bar = 5 μ m.



Source: own authorship

Table 2. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* n. sp. 2 with those of other *Myxobolus* spp. species from South America and more specifically those infecting fish from the Order Characiformes. All dimensions are given in μm . Spore length (L), spore width (W), spore thickness (T), polar capsule length (PCL), polar capsule width (PCW), number of turns in the polar filament (NT).

Species	Myxospore (μm)						Fish species (family)	Site of infection
	L	W	T	PCL	PCW	NT		
<i>Myxobolus</i> n. sp. 2 This study	11.3 \pm 1.8 (8.2-13.5)	8.3 \pm 1.1 (6.37-10.22)	5.6 \pm 0.5 (4.9-6.2)	3.6 \pm 0.7 (2.0-4.7)	2.1 \pm 0.4 (1.2-2.8)	3-4	<i>Paracheirodon axelrodi</i> (Characidae)	Brain
<i>Myxobolus macroplasmoidal</i> Molnár et al. 1998	11 (10.5-12)	8.5 (8-9)	5.2 (5-5.5)	4.5 (4-5)	2.8 (2-3)	6	<i>Salminus maxillosus</i> (Characidae)	Abdominal cavity
<i>Myxobolus hilarii</i> Capodifoglio et al. 2016	11.5 (9.8-13.4)	11 (9.7-12.4)	7.6 (6.7-9)	6.5 (6-7.2)	4 (3.6-5.3)	5-7	<i>Brycon hilarii</i> (Bryconidae)	Kidney
<i>Myxobolus colossomatis</i> Molnár and Békési, 1993	11.8 (11.4-11.2) 10.5 (10.3-10.9)	6.9 (6.6-7.2) 8 (7.2-8.5)	3.7 (3.5-4)	6 (5.8-6.6)	2.1 (1.8-2.5)	7-8	<i>Colossoma macropomum</i> (Characidae)	Connective tissue of the gills, heart, serosa of intestine, liver, muscle
<i>Myxobolus oliveirai</i> Milanin et al. 2010	11.2	7.4	4.6	5.6	2.3	6-8	<i>Brycon hilarri</i> (Bryconidae)	Gill
<i>Myxobolus axelrodi</i> Camus et al. 2017	20.5 (19-21.8)	6.6 (5.7-7.9)	--	9.9 (8-11.2); 2 (1.8-2.3)	3.8 (3.2-4.8) 2 (1.8-2.3)	--	<i>Paracheirodon axelrodi</i> (Characidae)	Brain and retinas
<i>Myxobolus metynnis</i> Casal et al. 2006	13.1 (12.9-13.5)	7.8 (7.5-8.3)	3.9 (3.4-4.5)	5.2 (5-5.2)	3.2 (3-3.6)	8-9	<i>Metynnis argenteus</i> (Characidae)	Orbicular subcutaneous tissue
<i>Myxobolus associatus</i> Nemeček, 1926	15	10	--	7	--	--	<i>Leporinus mormyrops</i> (Anostomidae)	Kidney

<i>Myxobolus aureus</i> Carriero et al. 2013	12.6	8.3	5.5	5.7	2.9	7-8	<i>Salminus brasiliensis</i> (Characidae)	Liver
<i>Myxobolus colossomatis</i> Müller et al. 2013	10.3	6.4	--	4.4	1.8	7-8	<i>Paractus mesopotamicus</i> (Characidae)	Gills
<i>Myxobolus cunhai</i> Penido, 1927	(9-11)	(4-6)	--	--	--	--	<i>Pygocentrus piraya</i> (Characidae)	Intestine
<i>Myxobolus cunes</i> Adriano et al. 2016	10	5.7	1.7	5.7	1.7	8-9	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Characidae)	Connective tissue of gall bladder, urinary bladder, gills, spleen, liver, fin and heart
<i>Myxobolus curimatae</i> Zatti et al. 2015	13.2 (12-14.7)	9.7 (7-10.8)	--	5.2 (4.1-5.8)	2.5 (1.7-3.9)	9-10	<i>Prochilodus costatus</i> (Prochilodontidae)	Gills
<i>Myxobolus fanciscoi</i> Eiras et al. 2010	6.4 (6-6.9)	6 (5.8-6.4)	3.2	2	1.5	3	<i>Prochilodus argenteus</i> (Curimatidae)	Fins
<i>Myxobolus filamentum</i> Naldoni et al. 2015	9 (7.5-9.7)	6.2 (5.2-7.3)	5.3 (4.8-5.7)	4.7 (3.8-5.5)	1.7 (1.3-2.2)	10-11	<i>Brycon hilarii</i> (Bryconidae)	Gills
<i>Myxobolus insignis</i> Eiras et al. 2005	14.5 (14-15)	11.3 (11-12)	7.8 (7-8)	7.6 (7-8)	4.2 (3-5)	6	<i>Semaprochilodus insignis</i> (Curimatidae)	Gills
<i>Myxobolus lomi</i> Azevedo et al. 2014	14.2 (11.8-15.8)	11.1 (8.7-12.5)	--	6.4 (5.2-7.9) 6 (4.7-7.4)	3.1 (2.3-4) 2.9 (2.2-4.2)	8-11	<i>Prochilodus lineatus</i> (Prochilodontidae)	Gills
<i>Myxobolus maculatus</i> Casal et al. 2002	21 (19.7-23)	8.9 (7.9-9.5)	7.5 (7.2-7.9)	12.7 (11.8-13.8)	3.2 (3-3.6)	14-15	<i>Metynnis maculatus</i> (Characidae)	Kidney
<i>Myxobolus myleus</i> Azevedo et al. 2012	19.3 (19-20)	8.3 (7.5-9)	4 (3.5-4.5)	13.2 (12.5-13.5)	3 (2.5-3.5)	19-21	<i>Myleus rubripinnis</i> (Characidae)	Gallbladder

<i>Myxobolus noguchii</i> Pinto, 1928	13.6	8.5	--	6.8	2.2	--	<i>Serrasalmus spilopleura</i> (Characidae)	Gills
<i>Myxobolus paranensis</i> Bonetto and Pignalberi, 1965	(12-15)	(7-8)	--	(6-7)	2.5	--	<i>Salminus maxillosus</i> (Characidae)	Testes, ovary
<i>Myxobolus pantanalis</i> Carriero et al. 2013	9.3	6.5	--	4.2	2	4-5	<i>Salminus brasiliensis</i> (Characidae)	Gills
<i>Myxobolus peculiaris</i> Martins and Onaka, 2006	25.2 (25-25.3)	15.4 (15-15.5)	--	10.7 (10.5-10.9)	4.4 (4-4.8)	4-5	<i>Cyphocharax nagelli</i> (Curimatidae)	Gills
<i>Myxobolus porofilus</i> Adriano et al. 2002	5.7	4.8	--	1.6	1.1	3	<i>Prochilodus lineatus</i> (Curimatidae)	Visceral cavity
<i>Myxobolus piraputangae</i> Carriero et al. 2013	10.1	8.7	6.7	5.2	3	4-5	<i>Brycon hilarii</i> (Bryconidae)	Kidney
<i>Myxobolus pygocentris</i> Penido, 1927	(15-16)	(9-11)	--	(9-11)	3-4)	--	<i>Pygocentrus piraya</i> (Characidae)	Intestine
<i>Myxobolus salminus</i> Adriano et al. 2009	(9.6-10.5)	(5.8-6.6)	(4.7-5.3)	(4.3-4.8)	(1.5-1.9)	7-8	<i>Salminus brasiliensis</i> (Characidae)	Gills
<i>Myxobolus serrasami</i> Walliker, 1969	14.4 (12.5-18)	8.6 (7-10)	--	7.7 (6-9)	3.1 (2.5-4)	--	<i>Serrasalmus rhombeus</i> (Characidae)	Spleen, kidney, liver
<i>Myxobolus testicularis</i> Tajdari et al. 2005	8.6 (8.2-9.1)	7.2 (6.7-7.5)	2.7 (2.4-3)	3.5 (3.3-3.8)	1.7 (1.3-2)	5-6	<i>Hemiodus microlepis</i> (Hemiodontidae)	Testis
<i>Myxobolus umidus</i> Carriero et al. 2013	13.5	7.8	7.7	5.1	2.7	4-5	<i>Brycon hilarri</i> (Bryconidae)	Spleen
<i>Myxobolus arapiuns</i> Capodifoglio et al. 2020	12.9	7.5	--	5.4	2.2	4-5	<i>Piaractus brachypomus</i> (Serrasalminidae)	Pyloric caecum
<i>Myxobolus matosi</i> Capodifoglio et al. 2019	9.6	7	5	4.3	1.9	--	<i>Colossoma macropomun</i> (Serrasalminidae)	Inner surface of operculum

<i>Myxobolus longissimus</i> Capodifoglio et al. 2019	19.1	9.4	8.3	4.3	2.5	9-10	<i>Colossoma macropomun</i> (Serrasalimidae)	Intestine and gill arch
<i>Myxobolus pirapitingae</i> Capodifoglio et al. 2020	10.4	7.2	5.8	3.8	2.6	7-8	<i>Piaractus brachypomus</i> (Serrasalimidae)	Pyloric caecum
<i>Myxobolus batalhensis</i> Vieira et al. 2017	15.2	8.5	5.2	5.2	2.8	6-9	<i>Salminus hilarri</i> (Bryconidae)	Ovary
<i>Myxobolus brycon</i> Azevedo et al. 2011	6.9	4.2	2.5	4.2	1.9	8-9	<i>Brycon hilarri</i> (Bryconidae)	Gill
<i>Myxobolus vetuschicanus</i> Naldoni et al. 2020	10.7	7.1	5.3	4.4	1.5	8	<i>Salminus franciscanus</i> (Bryconidae)	Fins
<i>Myxobolus mineirus</i> Naldoni et al. 2020	13.4	10	6.5	4.4	2.3	8	<i>Brycon orthotaenia</i> (Bryconidae)	Mesentery
<i>Myxobolus iecoris</i> Naldoni et al. 2019	12.8	8.7	6.9	5.9	2.3	8-9	<i>Salminus franciscanus</i> (Bryconidae)	Liver
<i>Myxobolus lienis</i> et al. Naldoni et al. 2019	12	8.3	7	4.6	2.8	5-6	<i>Brycon orthotaenia</i> (Bryconidae)	Spleen
<i>Myxobolus orthotaenae</i> Naldoni et al. 2020	10.7	8.1	6.8	4.9	2.7	8	<i>Brycon orthotaenia</i> (Bryconidae)	Liver
<i>Myxobolus ovarium</i> Naldoni et al. 2020	9.8	6.5	4.9	4.7	2.1	9	<i>Brycon orthotaenia</i> (Bryconidae)	Ovary

Source: own authorship

Table 3. Comparative data of myxospore dimensions of all *Myxobolus* n. sp. 2 with those of other *Myxobolus* spp. species from around the world that have been described infecting the brain of vertebrate hosts is presented below. All dimensions are given in μm . Spore length (L), spore width (W), spore thickness (T), polar capsule length (PCL), polar capsule width (PCW), number of turns in the polar filament (NT).

Species	Myxospore (μm)						Host and site of infection	Location
	L	W	T	PCL	PCW	NT		
<i>Myxobolus</i> n. sp. 2 This study	11.3 \pm 1.8 (8.2-13.5)	8.3 \pm 1.1 (6.37-10.22)	5.6 \pm 0.5 (4.9-6.2)	3.6 \pm 0.7 (2.0-4.7)	2.1 \pm 0.4 (1.2-2.8)	3-4	<i>Paracheirodon axelrodi</i> Brain	Brazil
<i>Myxobolus schuberti</i> Li & Desser, 1985	11.5 (8.5-12.5)	8.5 (7.5-10)	6.5	4.5 (3.5-5.5)	2.5 (2-3)	5	<i>Notropis cornutus</i> Brain and heart	Canada
<i>Myxobolus neurotropus</i> Hogge <i>et al.</i> 2008	11.8 (11.2-13)	10.8 (10.4-12.3)	8.8 (8.4-9.1)	5.8 (5.0-6.9)	3.7	--	<i>Oncorhynchus mykiss</i> brain	EUA
<i>Myxobolus mongolicus</i> Pronin, 1973	11.0-12.0	7.2-10.8	--	4.5-6.3	3.0	--	<i>Oreoleuciscus potanini</i> Brain, gut, kidney, testicles	Russia
<i>Myxobolus buri</i> Egusa, 1985	10.6 (9.2-11.8)	9.2 (7.9-10.2)	6.6 (5.5-7.3)	4.5 (3.9-5.4)	2.8 (2.5-3.4)	3-4	<i>Seriola quinqueradiata</i> Bain	Japan
<i>Myxobolus spinacurvatura</i> Maeno <i>et al.</i> 1990	10.5-12.5	9.0-11.0	6.0-7.5	3.5-5.0	2.5-3.5	--	<i>Mugil cephalus</i> Brain, mesentery spleen	Japan
<i>Myxobolus buri</i> Egusa, 1985	10.6 (9.2-11.8)	9.2 (7.9-10.2)	6.6 (5.5-7.3)	4.5 (3.9-5.4)	2.8 (2.5-3.4)	3-4	<i>Seriola quinqueradiata</i> Brain	Japan
<i>Myxobolus bilineatum</i> Bond, 1938	10.5	9.0-10.0	9.0-10.0	--	--	7-9	<i>Fundulus heteroclitus</i>	USA

	(10.0-12.0)						Brain	
<i>Myxobolus lairdi</i> Moser & Noble, 1977	9.9 (9.0-1.0)	9.9 (9.0-11.0)	6.1 (5.0-7.0)	5.0 (4.5-6.0)	1.8 (1.5-2.5)	6-8	<i>Coryphaenoides rupestris</i> Brain, eyes	Norway
<i>Myxobolus cybinae</i> Mitenev, 1971	9.2-14.5	8.8-11.2	6.6-8	5.8-7.5	3.1-4.2	--	<i>Phoxinus phoxinus</i> Brain	Russia
<i>Myxobolus confirmatus</i> Akhmerov, 1960	9.5	9.5	--	5.5	3.5	--	<i>Acanthorhodeus asmussi</i> Brain	Russia
<i>Myxobolus confirmatus</i> Akhmerov, 1960	9.5	9.5	--	5.5	3.5	--	<i>Acanthorhodeus asmussi</i> Brain	Russia
<i>Myxobolus farionis</i> Gonzalez-Lanza & Alvarez-Pellitero, 1984	9.1 (8.5-10.0)	6.6 (6.0-7.5)	4.7 (4.5-5.5)	4.8 (4.5-5.5)	2.3 (2.0-2.8)	8-9	<i>Salmo trutta fario</i> Brain	Spain
<i>Myxobolus cerebralis</i> Hofer, 1903	9.0	7.2	--	4.5	--	5-6	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Brain cartilage	EUA
<i>Myxobolus</i> sp. Holzer <i>et al.</i> 2006	8.8 (7.8-9.2)	6.4 (5.8-7.0)	5.1 (4.7-5.5)	4.0 (3.2-4.7)	2.6 (2.1-3.2)		<i>Salmo trutta trutta</i> Brain	Scotland
<i>Myxobolus hubeiensis</i> Wu & Chen, 1987	12 (11.6-12.4)	11.9 (10.7-12)	8.9 (8.6-9.1)	5.8 (5.2-6.2)	3.9 (3.0-4.5)	6	<i>Saurogobio dabryi</i> Brain	China
<i>Myxobolus cotti</i> El-Matbouli & Hoffman, 1987	12.7-17.7	8.9-10.1	--	5.1-7.6	--	--	<i>Cottus gobio</i> Brain	Germany
<i>Myxobolus hendricksoni</i> Mitchell <i>et al.</i> 1985	13.0 (11-15.5)	12.3 (10-15)	8.6 (8-10)	6.6 (6-7.5)	3.6 (3.5-4)	4-6	<i>Pimephales promelas</i> Brain, primitive meninges	USA
<i>Myxobolus filamentosus</i> Haldar, 1981	13.7 (11.2-17.3)	9.5 (8.1-12.2)	--	5.8 (4-7.1)	3.1 (2-4)	5-6	<i>Puntius filamentosus</i> Cerebral meninges	Índia
<i>Myxobolus neurophilus</i> Guilford, 1963	13.9	6.2	4.9	6.8	1.4-2.4	--	<i>Perca flavescens</i>	USA

	(12-16)	(6-8.5)	(4-6)	(5-8)			Midbrain	
<i>Myxobolus heterolepis</i> Li & Desser, 1985	14 (12.5-14.5)	10 (8.5-10.5)	9.0	6.5 (6-8)	3 (2.5-3.5)	6-7	<i>Notropis heterolepis</i> Brain, eyes	Canada
<i>Myxobolus cephalus</i> Iversen <i>et al.</i> 1971	14.1 (14.0-15.0)	11.0 (10.0-11.0)	9.0 (8.0-10.0)	4.7 (4.0-5.0)	3.2 (3.0-4.0)	4-5	<i>Mugil cephalus</i> Cerebral meninges, branchial arches	USA
<i>Myxobolus articus</i> Ferguson, Atkison, Whipps & Kent, 2008	15.1 (14.1-16.1)	9.7 (8.3-10.2)	--	--	--	--	<i>Oncorhynchus nerka</i> Lower brain	Canada
<i>Myxobolus africanus</i> Formena <i>et al.</i> 1985	15.5 (13.6-17.5)	7.3 (5.7-9.0)	--	6.6 (5.5-9.5)	2.4 (1.6-3.5)	5-6	<i>Hepsetus odoe</i> Brain	Cameroon
<i>Myxobolus articus</i> Pugachev & Khikhlov, 1979	(14.3-16.5)	9.5-10.3	5.5	6-6.9	2.5-3.5	--	<i>Oncorhynchus nerka</i> , <i>Oncorhynchus kisutch</i> , <i>Salvelinus malma</i> , <i>Salvelinus neiva</i> Brain	Russia
<i>Myxobolus freitasi</i> Neto <i>et al.</i> 2021	18.6 (17.7-19.78)	8.6 (8.4-9.0)	--	13.0 (12.5-13.4)	5.6 (5.3-6.0)	14-15 4-5	<i>Brachyhyppopomus</i> <i>beebei</i> Brain tissue	Brazil
				5.0 (4.5-5.3)	2.5 (2.3-6.0)			
<i>Myxobolus inaequus</i> Kent & Hoffman, 1969	19.8 (15.6-22)	8.6 (7.8-9.3)	8.0 (7.7-8.5)	11.8 (9.4-13)	3.6 (3.1-3.9)	--	<i>Eigemannia virescens</i> Brain	Brazil
<i>Myxobolus axelrodi</i> Camus <i>et al.</i> 2017	20.5 (19.0-21.8)	6.6 (5.7-7.9)	5.1 (4.8-5.9)	9.9 (8.0-11.2)	3.8 (3.2-4.8)	15-17	<i>Paracheirodon</i> <i>axelrodi</i> Brain and retinas	Brazil
				4.1 ± 0.3 (3.5-4.5)	2 ± 0.1 (1.8-2.3)			
<i>Myxobolus encephalicus</i> Mulsow, 1911	5-5.5	5-5.5	--	--	--	--	<i>Cyprinus carpio</i> Brain	Germany

Source: own authorship

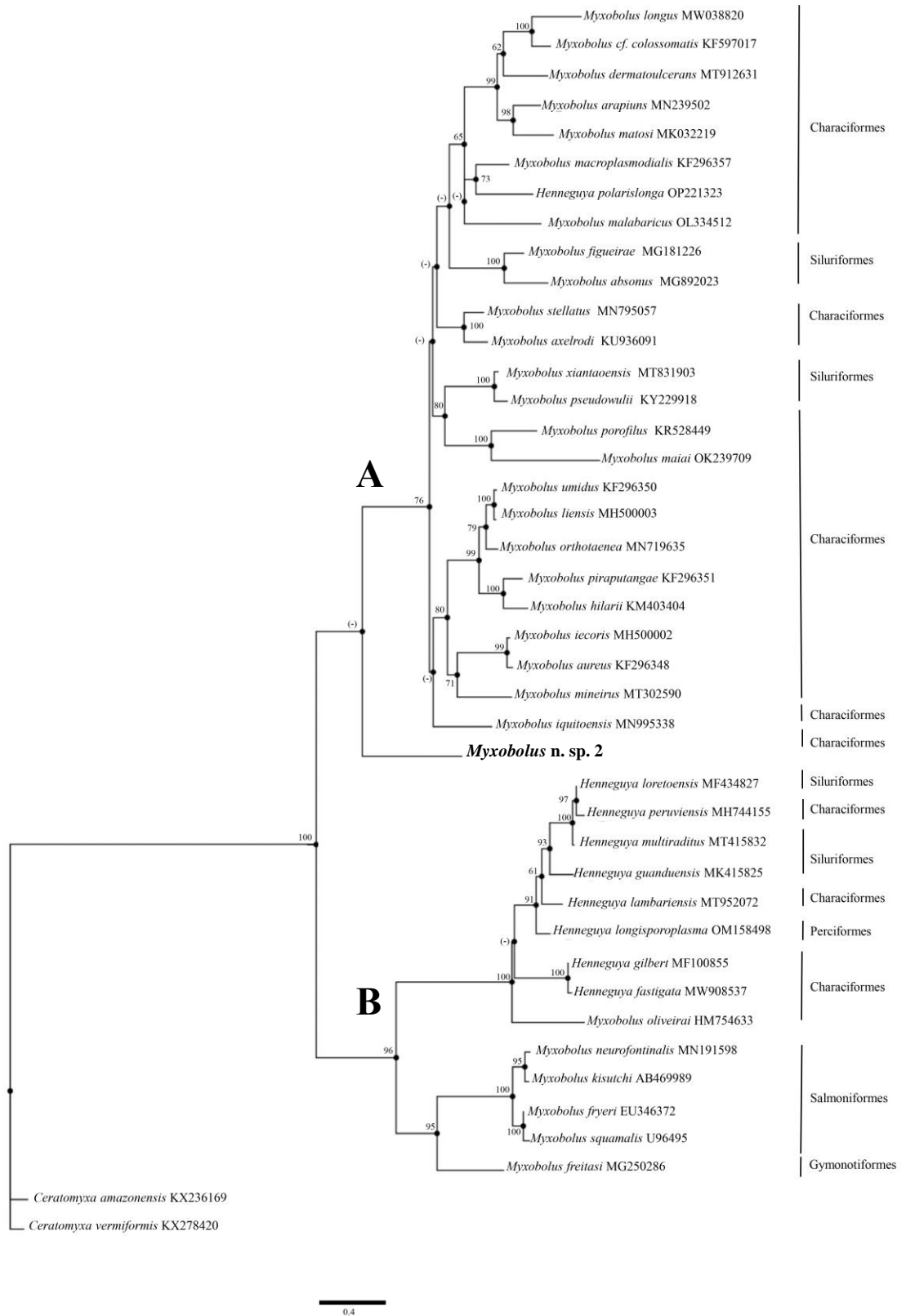
3.3 Molecular Characterization

The PCR of each plasmodia resulted in sequences. The SSU rDNA sequencing of the plasmodia of *Myxobolus* n. sp. 2 collected from the brain of three *P. axelrodi* specimens, generated partial sequences of 1.857 nucleotides (accession number OR287784). The BLASTn search based on the *Myxobolus* n. sp. 2 SSU rDNA sequences identified *Myxobolus batalhensis* Vieira et al. 2017, with a similarity of 87% (query coverage 90%). *M. batalhensis* is a parasite of *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850, described infecting the ovaries and liver of this fish species in the Batalha River, São Paulo, Brazil. BLASTn analysis, based on the partial LSU rDNA sequence, revealed that the closest species was *Henneguya zschokkei* Bartsova and Fiala, 2009, with 84.2% similarity. *H. zschokkei* was found in the muscle of *Salmo salar* Linnaeus, 1758, specimens from the Czech Republic.

3.4 Phylogenetic Analysis

The phylogenetic analysis based on the sequences of the closest myxozoan relatives revealed two main clades, Clade A and B (Fig. 3). Clade A was predominantly composed of *Myxobolus* species infecting fish of the Characiformes and Siluriformes Orders. In the phylogenetic tree, the species *Myxobolus* n. sp. 2 appeared alone, forming a subclade below Clade A, which is composed of *Myxobolus* species described in South America. Clade B was divided into two subclades: a larger one composed of nine *Henneguya* species and one *Myxobolus* species, and a smaller clade consisting of five *Myxobolus* species.

Fig. 3 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on partial SSU rDNA sequences showing the position of *Myxobolus* n. sp. 2 among other myxosporean species present in GenBank. The numbers above the nodes indicate bootstrap confidence values. Dashes (-) indicate values below 50%.



4. Discussion

The international trade of ornamental fish is a thriving industry that generates millions of dollars and drives the translocation and distribution of a wide variety of freshwater and marine fish around the world (Camus et al. 2017; Stilwell et al. 2019). In northern Brazil, especially in the Amazon basin region, it is an important source of income and one of the main activities, often the only one, responsible for the livelihood and subsistence of a significant portion of small fishing communities in small Brazilian municipalities and other countries within the basin (Benzaken et al. 2015; Araújo et al. 2017).

The capture of small ornamental fish in the Amazon basin plays a significant role in the national and international aquarium trade. It is estimated that approximately 30 freshwater species dominate the global market, with *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 representing over 25% of the market in volume and more than 14% in value. Popularly known as the neon tetra, *P. axelrodi* is responsible for almost three-quarters of Brazil's ornamental fish exports (Dey 2016; Anjos et al. 2009; Tavares-Dias 2020).

Although several species of myxosporean have been described in South American fish (Naldoni et al. 2020), there are few studies available on the occurrence of this group of enigmatic parasites that infect ornamental fish, especially native and endemic species from the Amazon basin (Mathews et al. 2020). This is the second report of a myxosporean parasitizing a *Paracheirodon* sp. Morphological, molecular (SSU rDNA and LSU rDNA), and biological characteristics were compared with described *Myxobolus* species worldwide (Eiras et al. 2005, 2014, 2021).

In the comparison between *Myxobolus* n. sp. 2 and other species parasitizing different hosts, significant differences were identified in at least one of the following aspects: size and/or shape of the myxospores, number of polar filaments, geographical areas of infected hosts, specific hosts, and genetic divergences.

The morphological characteristics of *Myxobolus* n. sp. 2 were compared with all the species of *Myxobolus* described infecting the species fishes from South America and more specifically those infecting fish from the Order Characiformes. *Myxobolus* n. sp. 2 exhibited morphological similarities to *M. macropasmodialis* Molnár et al. 1998, described infecting the abdominal cavity of the *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, in Brazil, river Mogi-Guacu, São Paulo, with similar morphometric dimensions (Table 2). However, these species differ in their SSU rDNA data. *M. macropasmodialis*

(KF296357) was found to be the closest related species with similar morphometric dimensions between the *Myxobolus* spp. species from South America and more specifically those infecting fish from the Order Characiformes, but have a differences of 14.05%.

The morphological characteristics of *Myxobolus* n. sp. 2 were compared with all the species of *Myxobolus* described infecting the brains of host fishes (Table 3). Among the thirty species of *Myxobolus*, only one species, *Myxobolus axelrodi* Camus et al. 2017, has been described infecting the brain and retinas of *P. axelrodi*. However, the morphological dimensions of these two species are quite distinct, with similarities only in terms of the host and site of infection. For example, the length of the myxospore in *M. axelrodi* is 20.5 μm , while in *Myxobolus* n. sp. 2 it is 11.3 μm . Similarly, the width of the myxospore in *M. axelrodi* is 5.1 μm , while in *Myxobolus* n. sp. 2 it is 8.3 μm , and the thickness in *M. axelrodi* is 6.6 μm , while in *Myxobolus* n. sp. 2 it is 5.6 μm . Furthermore, the polar capsules of *M. axelrodi* are pear-shaped and of unequal sizes, while the polar capsules of *Myxobolus* n. sp. 2 are symmetrical and arranged obliquely to each other. The polar filaments of *Myxobolus* n. sp. 2 have 3 to 4 turns, while those of *M. axelrodi* have approximately 15 to 17 turns in the larger capsule and 5 to 6 turns in the smaller polar capsule. In addition to the morphometric differences of the myxospores, *M. axelrodi* also differs from *Myxobolus* n. sp. 2 in myxospore morphology. In *M. axelrodi*, the myxospore is elongated and tear-shaped with a pointed apex, while the myxospores of *Myxobolus* n. sp. 2 are completely rounded and oval when viewed frontally. Comparative analysis of genetic identity of the SSU rDNA between *Myxobolus* n. sp. 2 and *M. axelrodi* revealed a difference of 14.51%, with 207 differing nucleotides (1857/1910).

In comparison to other species of *Myxobolus* described infecting the brains of host fishes, *Myxobolus* n. sp. 2 exhibited morphological similarities to *M. schuberti* Li and Desser, 1985, described infecting the brain and heart of the fish *Notropis cornutus* Mitchill, 1817, in Canada, with similar morphometric dimensions. However, the myxospore dimensions of *Myxobolus* n. sp. 2 are slightly smaller compared to *M. schuberti*: myxospore length (11.3 vs. 11.5 μm), myxospore width (8.3 vs. 8.5 μm), myxospore thickness (5.6 vs. 6.5 μm), length of polar capsules (3.6 vs. 4.5 μm), width of polar capsules (2.1 vs. 2.5 μm), and the number of coiled polar filaments is lower (3-4 vs. 5 turns). Furthermore, there are differences in the host genus (*Luxilus* for *M. schuberti* and *Paracheiroduon* for *M. Myxobolus* n. sp. 2.), highlighting the distinct geographical

areas of occurrence (Lake Sansajewun and Openingo, Ontario, Canada for *M. schuberti* and Nhamundá River, Amazonas, Brazil for *Myxobolus* n. sp. 2). These arguments strongly support the distinction between the two *Myxobolus* species. Unfortunately, data on the SSU rDNA gene sequence of *M. schuberti* are not available for comparison and inclusion in the phylogenetic analysis.

In this study, we adopted a comprehensive molecular approach, utilizing both the SSU rDNA and LSU rDNA genes, to obtain a more complete understanding of the phylogenetic relationships of the myxosporidians. The combination of these two genes has proven effective in studies of phylogenetic diversity, providing additional support for phylogenetic tree nodes at various taxonomic levels (Medina et al. 2001; Mallatt and Winchell 2002; Collins et al. 2006; Evans et al. 2008). Although complete LSU rDNA sequences can vary considerably, ranging from approximately 3.100 to 3.900 bp (Bartošová and Hypša 2009), in this study, a partial LSU sequence of 1.302 bp was obtained. Due to the lack of sufficient LSU rDNA data available in GenBank, only the phylogenetic analysis of SSU rDNA sequences was conducted.

The phylogenetic analysis revealed that *Myxobolus* n. sp. 2 forms a distinct clade within a broader clade composed of *Myxobolus* species found in South America. These results are in line with previous studies that provided strong evidence that host affinity and geographic location play important roles in Myxobolidae phylogenies (Adriano et al. 2012; Carriero et al. 2013; Gupta and Kaur 2017; Zatti et al. 2018). It is important to note that *Myxobolus* n. sp. 2 is the second species of *Myxobolus* described parasitizing *Paracheirodon* sp., with limited reports of myxozoan parasites in Characiformes fish.

Based on the morphological and morphometric analysis, as well as the comparison of SSU rDNA and LSU rDNA sequences with other available sequences, it can be concluded that *M. n. sp. 2*, found in this study, represents a new species. The distinct morphological differences compared to other known species, along with the lack of matching with available SSU rDNA sequences in BLASTn, support the identification of this mixosporean species as a new discovery. This finding contributes to the advancement of our knowledge about the diversity of myxozoans in Brazil.

5. References

- Adriano, E.A., Carriero, M.M., Maia, A.A.M., Silva, M.R.M., Naldoni, J., Ceccarelli, P.S., Arana, S. (2012) Phylogenetic and host–parasite relationship analyses of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. *Vet Parasitol* 185:110–120.
- Anjos, H.D.B.; Amorim, R.M.S.; Siqueira, J.A.; Anjos, C.R. (2009). Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(2): 259-274.
- Araújo, J. G.; Santos, M. A. S.; Rebello, F. K.; Isaac, V. J. (2017). Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 43, n. 2, p. 297- 307.
- Batueva, M.D. (2020) Morphological, histological, and molecular aspects of *Myxobolus zaiakae* n. sp., a parasite of the roach *Rutilus rutilus*, in Lake Baikal. *Dis Aquat Org* 142:75-82.
- Bartholomew, J.L., Atkinson, S.D., Hallett, S.L., Lowenstine, L.J., Garner, M.M., Gardiner, C.H., Rideout, B.A., Keel, M.K., Brown, J.D. (2008) Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int J Parasitol* 38:1199–1207.
- Benzaken, B.S.; Vera, A.; Asher, B.; Raimundo, R. (2015). Ornamental fishery in Rio Negro (Amazon region), Brazil: combining social, economic and fishery analyses. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 6(4): 1-4.
- Camus A.C., Dill J.A., Rosser T.G., Pote L.M. & Griffin M.J. (2017). *Myxobolus axelrodi* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) a parasite infecting the brain and retinas of the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae). *Parasitology Research* 116: 387–397.
- Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PS, Maia AAM (2013) Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS ONE* 8: e73713.
- Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Medina, M., Schierwater, B. (2006). Cnidarian phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol.* 2006, vol. 55 1(pg. 97-115).
- Chao, N. L. (2001). The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the Rio Negro basin, Brazil: a review of project piaba (1989-99). In: CHAO, N. L. (Ed.). *Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil: Projeto Piaba*. Manaus: EDUA, 2001. p. 161-204.
- Dey, V.K. (2016). *The Global Trade in Ornamental Fish*. *Infofish International*, 4(1): 52-55.
- Eiras, J.C; Molnár, K.; Lu, Y.S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bu^{''} tschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). *Systematic Parasitology* 61:1-46.
- Eiras, J.C.; Zhang, J.; Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bu^{''} tschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology* 88:11-36.
- Eiras JC, Cruz CF, Saraiva A, Adriano EA. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporidia) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitol (Praha)*.
- Evans, B.B., Lester, R.J.G. (2001). Parasites of ornamental fish imported into Australia. *EAFP Bul*; 21(2): 51-55.
- Friedrich et al. 2000; Yokoyama and Masuda 2001; Bartholomew et al. 2008; Hartigan et al. 2012; Székely et al. 2015.

- Gupta A, Kaur H. (2017). A new pathogen, *Myxobolus holzeri* (Myxosporea: Myxozoa) causing severe gill disease in an Indian major carp *Labeo rohita* in a cold water wetland, Punjab (India). *Microb Pathog.* 201.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 41, oo. 95-98.
- Hartigan A, Peacock L, Rosenwax A, Phalen DN, Šlapeta J (2012) Emerging myxosporean parasites of Australian frogs take a ride with fresh fruit transport. *Parasit Vectors* 5:208.
- Hongslo T, Jansson E (2009) Health survey of aquarium fish in Swedish pet-shops. *Bull Eur Assn Fish P* 29:163–174.
- Lom, J. Arthur, J.R. (1989). A Guideline for the Preparation of Species Description in Myxosporea. *J. Fish Dis.*, v.12, p.151-156.
- Mathews P.D., Madrid R.R.M, Mertins O., Rigoni V.L.S. & Morandini A.C. (2020). A new *Myxobolus* (Cnidaria: Myxosporea) infecting the ornamental catfish *Corydoras schwanzi* from the Purus River in Brazil. *European Journal of Taxonomy* 620: 1–14, 2020.
- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D., and Sogin, M. L. (2001). Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9707–9712.
- Novotný L, Dvořák P (2006) Manifestation of mycobacteriosis in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956) during the *Pleistophora hypohessobryconis* (Schäperclaus, 1941) infection. *Folia Vet* 50:80–82, 2006.
- Okamura B., Gruhl A., Bartholomew J.L.(2015) An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura B., Gruhl A. & Bartholomew J.L. (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development:1–20*. Springer, Cham, Switzerland, 2015.
- Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integr Comp Biol* 58:132–1145
- Rezende, F.P., Fujimoto, R.Y. (2021). *Peixes Ornamentais no Brasil*. Embrapa, Brasília, DF.
- Tavares-Dias, M. (2020). *Espécies de peixes ornamentais capturados pela pesca no estado do Amapá/ Marcos Tavares-Dias - Macapá: Embrapa Amapá.*
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gilson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994), pp. 4673-4680.
- Zatti, S. A., Atkinson, S. D., Maia, A. A. M., Bartholomew, J. L., & Adriano, E. A. (2018). *Ceratomyxa gracillima* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea) provides evidence of panmixia and ceratomyxid radiation in the Amazon basin. *Parasitology*, 145(9), 1137-1146.
- Zatti, S.A., Marinho, A.M.R., Adriano, E.A., Maia, A.A.M. (2022). Integrative Taxonomy Reveals a Panmictic Population of *Henneguya longisporoplasma* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) in the Amazon Basin. *Acta Parasitol.*
- Yokayama, H.; Masuda, K. (2001). *Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific Giant octopus *Paractopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae). *Bull. Eur. Fish Pathol.*, 21(6), 266.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos durante as pesquisas realizadas para o desenvolvimento desta tese permitiram concluir que:

- Espécies de peixes amazônicos pesquisadas são infectadas por diferentes mizozoários;
- Três novas espécies de mixozoários foram descritas a partir dos peixes ornamentais analisados;
 - *Myxobolus* n. sp. 1, encontrado infectando os no arco branquial de *C. agassizii* no rio Nhamundá, AM, de acordo com as análises morfológicas e moleculares, é uma espécie ainda não descrita;
 - *Henneguya* n. sp. 1, encontrada infectando as brânquias *C. schwartzi* no rio Nhamundá, AM, de acordo com as análises morfológicas e moleculares, é uma espécie ainda não descrita;
 - *Myxobolus* n. sp. 2, encontrado infectando o cérebro de *P. axelrodi* no rio Nhamundá, AM, de acordo com as análises morfológicas e moleculares, é uma espécie ainda não descrita;
- Com base nas análises filogenéticas, podemos concluir que as espécies de mixozoários analisadas apresentam tendência em agrupar por afinidade de hospedeiro e área geográfica.

7. REFERÊNCIAS

- Adriano, E.A. Arana, S. Ceccarelli, P.S. Cordeiro, N.S. (2002). Prevalência de parasitos do filo Myxozoa em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Osteichthyes: Characidae) em rios do pantanal Mato-grossense, Brasil. Bol. Téc. CEPTA, 15 (2002), pp. 31-38.
- Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS. (2005a). Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* n. sp. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 100:177–181.
- Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS. (2005b). An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. Parasite 12:221–227.
- Adriano, E.A., Carriero, M.M., Maia, A.A.M., Silva, M.R.M., Naldoni, J., Ceccarelli, P.S., Arana, S. (2012) Phylogenetic and host–parasite relationship analyses of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. Vet Parasitol 185:110–120.
- Adriano, E.A., Zatti, S.A., Okamura, B. (2022) How to build single-celled cnidarians with worm-like motility: Lessons from Myxozoa. J Anat.
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J.L. Santos, A.K. Hamoy, I. Matos, E. (2017). *Myxobolus marajoensis* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae), parasite of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* from the Brazilian Amazon region. Braz. J. Vet. Parasitol., 26 (2017), pp. 465-471, 2017.
- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M.; Gomes, L.C. (2005). Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. Megadiversidade, 1: 70-78.
- Alofs KM, Liverpool EA, Taphorn DC, Bernard CR, López-Fernández H (2014). Mind the (information) gap: the importance of exploration and discovery for assessing conservation priorities for freshwater fish. Diversity and Distributions 20 (1): 107-113
- Andree, K.B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S.J., Hedrick, R.P. (1999). Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. Journal of Parasitology, 85: 68–74.
- Anjos, H.D.B.; Amorim, R.M.S.; Siqueira, J.A.; Anjos, C.R. (2009). Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, 35(2): 259-274.
- APEX-BRASIL (2016). Passo a passo da exportação da aquariofilia: cartilha da Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos. São Paulo, 44 p.
- Aquaculture Brasil. Piscicultura Ornamental: Um Mar De Infinitas Possibilidades. Disponível em: <https://www.aquaculturebrasil.com/noticia/360/piscicultura-ornamental:-um-mar-de-infinitas-possibilidades>.
- Araújo, J., Santos, M.A., Rebello, F., Victoria, I. (2017). Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca. 43. 297-307.
- 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. International Journal for Parasitology, 40: 599–604.
- Atkinson, S. D. (2011) Diversity, life cycles and population genetics of freshwater Myxozoa from the Pacific Northwest of North America. PhD Thesis, School of Chemistry & Molecular Bioscience, The University of Queensland, Australia, p. 220.

Atkinson, S.D., Bartošová-Sojtková, P., Whipps, C.M., Bartholomew, J.L. (2015). Approaches for Characterising Myxozoan Species. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. (eds) Myxozoan Evolution, Ecology and Development.

Bartley, D. M. (2000). Responsible ornamental fisheries. FAO Aquaculture Newsletter, n. 24, p. 1014

Bartošová-Sojtková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tým, T., Holzer, A.S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *Int J Parasitol.*

Bartholomew, J.L., Alexander, J.D., Hallett, S.L., Alama-Bermejo, G., Atkinson, S.D. (2022). *Ceratonova shasta*: a cnidarian parasite of annelids and salmonids. *Parasitology*. Dec;149(14):1862-1875

Benzaken, Z. S.; Almeida, V.; Benzaken, A.; Ribeiro, R. (2015). Ornamental fishery in Rio Negro (Amazon region), Brazil: combining social, economic and fishery analyses. *Fisheries and Aquaculture Journal*, v. 6, n. 4.

Beheregaray LB, Möller LM, Schwartz TS, et al. (2010). Marcadores microssatélites para o cardeal tetra *Paracheirodon axelrodi*, um peixe comercialmente importante da Amazônia central. *Mol Ecol Notas*. 4 :330–332.

Biosecurity, N.Z. (2005). Import risk analysis: ornamental fish. Ministry of Agriculture and Forestry, New Zealand.

Bleher, H. (2006). Bleher's discus. Vol. I. Pavia, Italy, Aquapress. 671 pp.

Botelho Filho, G. F. (1990). Síntese da história da aquariofilia. Rio de Janeiro: Interciência, 88.

Brasil (2014) Ministério da Pesca e Aquicultura. Instrução Normativa nº 21, de 11 de setembro de 2014. Estabelecer critérios e procedimentos para o controle do trânsito de organismos aquáticos vivos com fins de ornamentação e aquariofilia no território nacional. Diário Oficial da União: seção 1, p. 56, 12 set. 2014.

Brasil (2018). Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. AliceWeb: relatórios de dados de importação e exportação de peixes ornamentais de 1989 a 2017. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br>. Acesso em: 5 fev. 2018.

Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de JANEIRO: Museo Nacional.

Campos, R.P. (2018). A new species of *Hypopygus Hoedeman* (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) from the rio Trombetas system, Amazon basin, Brazil. *Zootaxa*.

Camus, A C. et al. (2013). *Francisella noatunensis* subsp. orientalis infection in Indo-Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. *Journal of fish diseases*, v. 36, n. 7, p. 681–4, jul. 2013.

Camus A.C., Dill J.A., Rosser T.G., Pote L.M. & Griffin M.J. (2017). *Myxobolus axelrodi* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) a parasite infecting the brain and retinas of the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae). *Parasitology Research* 116: 387–397.

Capodifoglio, K.R.H., Adriano, E.A.P., Silva, M.M., Maia, A.A.M. (2015). Supplementary data of *Henneguya leporinicola* (Myxozoa, Myxosporidia) a parasite of *Leporinus macrocephalus* from fish farms in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Parasitologica*, vol. 60, no. 3, 2015, pp. 451-458.

Capodifoglio, K.R., Adriano, E.A., Milanin, T., Silva, M.R., Maia, A.A. (2016). Morphological, ultrastructural and phylogenetic analyses of *Myxobolus hilarii* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a renal parasite of farmed *Brycon hilarii* in Brazil. *Parasitol Int*.

Capodifoglio KRH, Adriano EA, Silva MRM, Maia AAM. (2019). The resolution of the taxonomic dilemma of *Myxobolus colossomatis* and description of two novel myxosporeans species of *Collossoma macropomum* from Amazon basin. *Acta Trop*.

Capodifoglio KRH, Meira CM, da Silva MRM, Corrêa LL, Adriano EA, Maia AAM. (2020). Morphology and molecular data of two novel cnidarian myxosporean (Myxobolidae) infecting *Piaractus brachypomus* from the Amazon basin. *Acta Trop*.

Carvalho de Lima Á, Araujo-Lima CRM (2004). The distributions of larval and juvenile fishes in Amazonian rivers of different nutrient status. *Freshwater Biology* 49 (6): 787-800, 2004.

Casal G, São Clemente SC, Lopes L, Rocha S, Felizardo N, Oliveira E, Al-Quraishy S, Azevedo C. (2017). Ultrastructural morphology and phylogeny of *Henneguya gilbert* n. sp. (Myxozoa) infecting the teleostean *Cyphocharax gilbert* (Characiformes: Curimatidae) from Brazil. *Parasitol Res*.

CIEAM. (2019). Mercado Da Pesca Ornamental Movimenta R\$ 5 Milhões No Am E Atrai Atenção Internacional. Cieam, Manaus, 20 Nov. 2019.

Chao, N. L. (2001). The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the Rio Negro basin, Brazil: a review of project piaba (1989-99). In: CHAO, N. L. (Ed.). Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil: Project Piaba. Manaus: EDUA, 2001. p. 161-204.

Chuquipiondo C. (2007). Alternativas de Producción de Peces Ornamentales en la Amazonía Peruana. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 54, 123-127.

Coe, C.M., Freitas, M.C., Araújo, R.C.P., (2011). Diagnóstico da cadeia produtiva de peixes ornamentais no município de Fortaleza, Ceará. *Magistra*, 23(3), 107-114.

Collins, R.A. Ribeiro, E.D. Machado, V.N. Hrberk, T. Farias, I.P. (2015). A preliminar inventory of the catfishes of the lower Tio Nhamundá, Brazil (Ostariophysi, Siluriformes). *Biodiversity Data Journal*, 3:4162.

Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*, 14: 2247–2257.

Dey, V. K. (2016). The global trade in ornamental fish. *Infotish International*, n. 4, p. 52-55.

EMBRAPA (2021). Rezende, F.P.; Fuimoto, R.Y. Peixes Ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade. *Embrapa Pesca e Aquicultura*. 297 p .

Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. (2008). *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*.

Eiras JC, Barman GD, Chanda S, Panigrahi AK. (2023). An update of the species of Myxosporea (Cnidaria, Myxozoa) described from Indian fish. *J Parasit Dis*. 2023 Mar;47(1):12-36.

Evans, B.B., Lester, R.J.G. (2001). Parasites of ornamental fish imported into Australia. *EAFP Bul*; 21(2): 51-55.

Evans, N., Lindner, A., Raikova, E.V., Collins, A.G., Cartwright, P. (2008) Phylogenetic placement of the enigmatic parasite, *Polypodium hydriforme*, within the phylum Cnidaria. BMC Evol Biol 8:139.

FAO. (2015). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy

Farley, C.A. (1992). Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve molluscs and associations with geographic transfers of populations. Rosenfield, R. Mann (Eds.), Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems, University of Maryland, College Park, pp. 139-154

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., v. 94, o.1322-1334.

Ferreira, E. J. G. (1993). Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da futura UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil. Acta Amazonica, 23(1\4, suplemento), 1– 89.

Ferreira, V. A. M.; Rodrigues, T. T. E.; Silva, P. G.; Yamamoto, K. C.; Freitas, C. E. C.; Nogueira, A. J. (2017). Caracterização socioeconômica da pesca ornamental no município de Barcelos, Amazonas, Brasil. Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana, v.3, p.1-20.

Ferreira, V.A.M.; Rodrigues, T. T. E.; Silva, P. G.; Freitas, C. E. C.; Yamamoto, K. C. (2020). Avaliação do comércio de peixes ornamentais do estado do Amazonas – Brasil. Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana, 1696-8352.

Feist, S.W., Longshaw, M., Canning, E.U., Okamura, B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmo* - nae. Dis Aquat Org 45: 61–68.

Feist, S.W., Longshaw, M. Phylum Myxozoa. In: Woo PTK (ed.) Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire pp 230-296, 2006.

Fiala, I., Bartošová-Sojková, P., Okamura, B., Hartikainen, H. (2015). Radiação adaptativa e evolução. Em: B. Okamura, A. Gruhl & JL Bartholomew (Eds.) Evolução, ecologia e desenvolvimento de Myxozoa. Suíça: Springer International Publishing, pp. 107–100. 69-84.

Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A.G. (2008). Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. Revista Brasileira de Zootecnia, 37: 8–14

FishBase. (1999). FishBase 99 CD-ROM. ICLARM, Manila

Freitas, T. M. S; Souza, S. B. S; Prudente, B. S; Montag, L. F. A. (2017). Length-weight relationship in ten fish species from the Nhamundá River, the Amazon Basin, Brazil. Acta Amazonica, v. 47, n. 1, p. 75-78, 2017.

Fricke, R., Eschemeyer, W.N., Gong, J.D.(2023). Eschemeyer's catalog of fishes: species by family/subfamily. San Francisco: California. Academy of Science; 2023.

Froese, R. Pauly, D. (2018). FishBase. Available at: www.fishbase.org. Accessed on February, 2018.

Gadelha, A.I.; Lima R., D. B. L. (2010). Artigo: Os Recursos Da Natureza – I Parte. Secex

Garcia-Ayala JR, Benine RC. (2020). A new Amazonian species of *Brachyhalcinus* (Characiformes: Characidae) from the Trombetas River basin, Brazil. J Fish Biol.

Geisler, R.; Annibel, S.R (1986). Ecology of the cardinal-tetra *Paracheirodon axelrodi* (Pisces, Characoidea) in the river basin of the Rio Negro/Brazil as well as breeding related factors. *Anim. Res. Dev.*, 23:7-39.

Gilbert, M. A., Granath W. O. Jr. (2003). Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease. *The Journal of Parasitology* 89:658–667.

Giribet, G., Edgecombe, G.D. (2020) *The Invertebrate Tree of Life*. Princeton University Press, Princeton, USA.

Hallett, S.L., Bartholomew, J.L. (2009). Development and application of a duplex QPCR for river water samples to monitor the myxozoan parasite *Parvicapsula minibicornis*. *Dis Aquat Organ.* Sep 7;86(1):39-50.

Hallett, S.L., Hartigan, A., Atkinson, S.D. (2015). Myxozoans on the move: Dispersal modes, exotic species and emerging diseases. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer, Switzerland, pp. 343-362.

Hillis, D.M., Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66: 411–453.

Hoffman, G. L., Dunbar, C. B., Bradford, A. (1962) Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. U.S. Fish and Wildlife Service Special Scientific Report Fisheries 427.

Holzer, A.S; Sojková, PB; Born-Torrijos, A.; Lovy, A.; Hartigan, A; Fiala, I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology*. Vol.27, Issue 7, P. 1651-1666

Hongslo T, Jansson E (2009) Health survey of aquarium fish in Swedish pet-shops. *Bull Eur Assn Fish P* 29:163–174

International Trade Centre. International trade in goods statistics by product Imports 2001- 2018: fish. Disponível em: <http://www.intracen.org/itc/market-info-tools/statistics-import-productcountry>.

Iwashita, M.K.P., Maciel, P.O. (2013). Capítulo 7: Princípios básicos de sanidade de peixes. Livro: *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília, DF : Embrapa.

Kim, J.H., Hayward, C.J., Joh, S.J., Heo, G.J.. (2002). Parasitic infections in live freshwater tropical fishes imported to Korea. *Dis Aquat Org*; 52(2): 169-173.

Kudo, R. (1933). A Taxonomic Consideration of Myxosporidia. *Transactions of the American Microscopical Society*. 52(3): 195-216.

Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy D., Stiassny, M.L.J., Tedesco, P.A. (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater *Hydrobiologia*, 595 (2008), pp. 545-567.

Lima, A.F., Moro, G.V., Kirschnik, L.N.G., Barroso, R.M. (2013). *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília, DF : Embrapa.

Lima, F.; Britto, M. (2020). A new *Corydoras* (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae) with an unusual sexual dimorphism from the rio Juruene basin, Brasil *Zootaxa*. 4742. 518-530.

Lom, J. Arthur, J.R. (1989). A Guideline for the Preparation of Species Description in Myxosporea. *J. Fish Dis.*, v.12, p.151-156.

Lom, J.; Dyková, I.(1992) Myxosporidia (phylum Myxozoa). In: Lom J.; Dyková I. (Eds.). *Protozoan parasites of fishes. Developments in aquaculture and fisheries science*. v.26.

Elsevier, Amsterdam, Holanda. Lowe-MacConnell, R.H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Edusp, São Paulo, Brasil. p.159-235

Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol*, 53 (2006), pp. 1-36, 10.14411/fp.2006.001.

Lujan, N.K. Birindelli, J.L.O. (2011). A new distinctively banded species of *Pseudolithoxus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Upper Orinoco River. *Zootaxa* 2941: 38-16.

Luque, J.L. (2004). Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG.

Magalhães, A. L. B. (2007). Pólo de piscicultura ornamental de Muriaé, Estado de Minas Gerais: maior fonte dispersora de espécies exóticas do Brasil. *Boletim da SBI*, Rio de Janeiro, v.86, n.1, p.5-6.

Mathews, P.D., Silva, M.R.M., Maia, A.A.M Adriano, A. (2015). Ultrastructure and ssrRNA sequencing of *Myxidium amazonense* n. sp. a myxosporean parasite of *Corydoras melini* from the Rio Negro River, Amazonas state, Brazil. *Parasitol. Res.*, 114 (2015), pp. 4675-4683.

Mathews, P.D., Maia, A.A.M., Adriano, E.A. (2016a.). Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. *Acta Trop.*

Mathews, P.D., Maia, A.A.M., Adriano, E.A. (2016b). *Henneguya melini* n. sp. (Myxosporea: myxobolidae), a parasite of *Corydoras melini* (Teleostei: siluriformes) in the Amazon region: morphological and ultrastructural aspects. *Parasitol. Res.*, 115 (2016), pp. 3599-3604.

Mathews P.D., Naldoni J. & Adriano E.A. (2017). Morphology and small subunit rDNA-based phylogeny of a new *Henneguya* species, infecting the ornamental fish *Corydoras leucomelas* from the Peruvian Amazon. *Acta Tropica* 176: 51–57, 2017.

Mathews P.D., Mertins O., Pereira J.O.L., Maia A.A.M., Adriano E.A. (2018). Morphology and 18S rDNA sequencing of *Henneguya peruviensis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), a parasite of the Amazonian ornamental fish *Hyphessobrycon loretoensis* from Peru: A myxosporean dispersal approach. *Acta Tropica* 187: 207–213.

Mathews P.D., Madrid R.R.M, Mertins O., Rigoni V.L.S. & Morandini A.C. (2020). A new *Myxobolus* (Cnidaria: Myxosporea) infecting the ornamental catfish *Corydoras schwartzi* from the Purus River in Brazil. *European Journal of Taxonomy* 620: 1–14, 2020.

Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (1998). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Poto Alegre, EDIPUCRS, 630p.

Medina, M., Collins, A.G., Silberman, J.D., Sogin, M.L. (2001). Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *PNAS*, 98: 9707–9712.

Milanin, T. Mathews, P.D. Mertins, O. Tavares, L.E.R. Silva, M.R.M. Maia, A.A.M. (2018). Molecular phylogeny of the gill parasite *Henneguya* (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) from fish farm in Brazil. *Microb. Pathog.*, 123 (2018), pp. 372-376, 2018.

Mills, D. (1998). Peixes de aquário. Rio de Janeiro, Ediouro Publicações, p.304.

Mills D, Vevers G. (1982). The Practical Encyclopedia of Freshwater Tropical Aquarium Fishes. Melbourne (Australia): Lansdowne Press.

Molnár, K. (1994). Comment on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. *Parasitologica Hungarica*, v. 27, p. 27:5–20, 1994.

Molnár, K. (2002). Site preference of myxosporeans in the gill. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 197–207.

Moravec F, Wolter J, Körting W. (1999). Some nematodes and acanthocephalans from exotic ornamental freshwater fishes imported into Germany. *Folia Parasitol*; 46(4): 296-310.

Moro, G. V.; Rezende, F. P.; Alves, A. L.; Hashimoto, D. T.; Varela, E. S.; Torati, L. S. (2013). *Espécies de peixe para piscicultura*. Embrapa Pesca e Aquicultura, Brasília, DF.

Morris, D.J., Adams, A. (2006). Proliferative, presaccular stages of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa:Malacosporea) within the invertebrate host *Fredericella sultana* (Bryozoa:Phylactolaemata). *J Parasitol* 92: 984–989

Novotný L, Dvořák P (2006) Manifestation of mycobacteriosis in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956) during the *Pleistophora hypheobryconis* (Schäperclaus, 1941) infection. *Folia Vet* 50:80–82, 2006.

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. *Veterinary Parasitology* 166: 52–59.

Naldoni, J., Arana, S., Maia, A.A., Silva, M.R., Carriero, M.M. Ceccarelli, P.S., Tavares, L.E.R., Adriano, E.A. (2011). Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 17, pp. 247-255, 2011.

Naldoni, J., Zatti, S.A. Silva, M.R.M. Maia, A.A.M. Adriano, E.A. (2019a). Morphological, ultrastructural, and phylogenetic analysis of two novel *Myxobolus* species (Cnidaria: Myxosporea) parasitizing bryconid fish from São Francisco River, Brazil.

Naldoni J, Adriano EA, Hartigan A, Sayer C, Okamura B. (2019b). Malacosporean myxozoans exploit a diversity of fish hosts. *Parasitology*. Jun;146(7):968-978.

Naldoni, J., Pereira, J.O.L., Milanin, T., Adriano, E.A., Da Silva, M.R.M., Maia, A.A.M., (2020). Taxonomy, phylogeny and host-parasite interaction of two novel *Myxobolus* species infecting *Brycon orthotaenia* from the São Francisco River, Brazil. 76:102061.

Naldoni J, Okamura B, Hartikainen H, Corrêa LL, Adriano EA. (2021). Broad but restricted detection of malacosporeans in a Neotropical cradle of diversification. *Parasitology*.

Okamura, B., Gruhl, A., Reft, A.J. Cnidarian origins of Myxozoa, in: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (2015.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, Springer, Switzerland. pp. 45–68.

Okamura B., Gruhl A., Bartholomew J.L.(2015) An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura B., Gruhl A. & Bartholomew J.L. (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*:1–20. Springer, Cham, Switzerland, 2015.

- Okamura, B., Gruhl, A. (2016). Myxozoa + Polypodium: A Common Route to Endoparasitism. *Trends Parasitol.* Apr;32(4):268-271.
- Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integr Comp Biol* 58:132–1145
- Patra, S., Bartošová-Sojková, P., Pecková, H., Fiala, I., Eszterbauer, E., Holzer, A.S. (2018). Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora* (sensu stricto) (Cnidaria: Myxozoa). *Parasit Vectors.* Jun 15;11(1):347.
- Pough, F.H, Janis, C.M., Heiser, J.B. (2008). *A vida dos vertebrados*. 4ª ed., São Paulo: Atheneu Editora.
- Reis, R. E., Albert, J.S., DI Dario, M.M., Mincarone, P., Petry, P. Rocha, L.A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, v. 89, n. 1, p. 12-47.
- Rezende, F.P., Fujimoto, R.Y. (2021). *Peixes Ornamentais no Brasil*. Embrapa, Brasília, DF.
- Rodríguez-Ithurralde, D., Del Puerto, R., Fernández-Bornia F. (2014). Morphological development of *Corydoras aff. paleatus* (Siluriformes, Callichthyidae) and correlation with the emergence of motor and social behaviors. *Iheringia (Série Zoologia)* 104: 189-199, 2014.
- Ruggeri, P; Naldoni, J; Hartikainen, H; Okamura, B. (2020). PCR-RFLP: a targeted method to reveal host specific malacosporean infection profiles (Cnidaria: Myxozoa: Malacosporea). *Diseases of aquatic organisms*. Vol. 141: 91–101.
- Sampaio, C. L. S.; Nottingham, M. C. (2008). *Guia para identificação de peixes ornamentais Brasileiros – Espécies Marinhas*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Renováveis Centro Nacional de Informação, Tecnologias Ambientais e Editoração.
- Santos, A.C., Sousa E., Silva, L.J., Meneghetti, G.A., Pinheiro, J.O.C.(2021). Pesca ornamental: desafios para a consolidação de um sistema sustentável de produção de peixes ornamentais em comunidades ribeirinhas do amazonas. 59º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural – SOBER, Brasília, 2021.
- Stevens, C.H., Croft, D.P., Paull, G.C., Tyler, C.R. (2017). Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture? *Journal of Fish Biology*. Vol. 91, issue 2. Pag. 409-428.
- Tavares-Dias, M. et al. (2009) Metazoan and protozoan parasites of freshwater ornamental fish from Brazil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 469-494
- Tavares-Dias, M. (2020). *Espécies de peixes ornamentais capturados pela pesca no estado do Amapá/ Marcos Tavares-Dias - Macapá: Embrapa Amapá*.
- Tencatt, L. F. C. & Ohara, W. M. (2016) Two new species of *Corydoras* Lacepede, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) from the rio Madeira basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 14 (1), e 150063.
- Tencatt, L.F.C, Gomes, V.C., Evers, H.G. (2023). Uma nova espécie de *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) da bacia do rio Madre de Dios, Amazônia peruana, com comentários sobre a identidade de *Corydoras aeneus*. *Neotrop ictiol.* 2023; 21(2):e230023.

Teixeira, R.J. Eiras, J.C. Spadacci-Morena, D.D. Xavier, J.G. Lallo, M.A.(2018). Infection of the gills of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Myxosporea. *Pesq. Vet. Bras.* 38.

Thlusty, M. (2002). The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, n. 205, p. 203219.

Thlusty, M. (2004). Ornamental aquaculture: small scale of production does not automatically mean small scale of impact. *OFI Journal* , n. 46, p.6-9.

Thlusty, M.F. Rhyne, A.L. Kaufman, L. Hutchinsm, R.E.I.D. Andrews, C. (2013). Dowd S.Opportunities for public aquariums toincrease the sustainability of the aquaticanimal trade. *Zoo biology*. 2013; 32(1): 1–12.

Zatti, S.A., Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L., Maia, A.A.M., Adriano, E.A. (2017a). *Ceratomyxa gracillima* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea) provides evidence of panmixia and ceratomyxid radiation in the Amazon basin. *Parasitology*, <https://doi.org/10.1017/S0031182017002323>.

Zatti, S.A., Marinho, A.M.R., Adriano, E.A., Maia, A.A.M. (2022). Integrative Taxonomy Reveals a Panmictic Population of *Henneguya longisporoplasma* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) in the Amazon Basin. *Acta Parasitol.*

Zuanon, J., Mendonça, F.P., Santo, H.M.V.E., Dias, M.S., Galuch, A.V. and Akama, A. (2015). Guia de peixes da Reserva Adolpho Ducke. Manaus: Editora INPA.

Whittington, R.J. Chong, R. (2007). Global trade in ornamental fish from na Australian perspective: The case for revised import risk analysis ans management strategies. *Prev. Veterinary Medicine*. Vol. 81. Iss.1-3, 14. Pag. 92-116.