

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Mariana Fonseca Rossi

**TAXONOMIA, MORFOLOGIA E FILOGENIA MOLECULAR DE PROTISTAS
CILIADOS (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) ENCONTRADOS EM
RUMINANTES DOMÉSTICOS**

Juiz de Fora
2013

Mariana Fonseca Rossi

**TAXONOMIA, MORFOLOGIA E FILOGENIA MOLECULAR DE PROTISTAS
CILIADOS (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) ENCONTRADOS EM
RUMINANTES DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta d'Agosto

Co-orientadores: Prof. Dr. Roberto Junio Pedroso Dias

Prof^ª. Dr^ª. Isabel Martinele

Juiz de Fora
2013

*“A maior recompensa do nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele, mas
aquilo em que ele nos transforma.”*

John Ruskin

*Dedico este trabalho aos meus pais, André e Lêda Márcia
e, ao meu irmão Arthur, que não mediram esforços
para que eu galgasse mais um importante degrau
em minha vida acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, força divina e poderosa, pelo dom da vida e toda a proteção, luz e força concedida durante esta jornada. Sem a fé depositada Nele, não conseguiria concluir esta etapa.

Aos **meus pais, André e Lêda Márcia**, pela confiança, apoio, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim, compartilhando de todos os momentos desta etapa.

Ao meu **irmão Arthur**, por toda torcida, apoio e carinho em todos os momentos de minha vida. Obrigada por ser meu amigo e sempre cuidar de mim, principalmente nestes dois anos de mestrado.

A todos os meus familiares pela torcida, em especial, aos meus avós, **Noé e Lêda**, pelas orações e à tia **Marta Helena**, pela acolhida e apoio nestes seis anos em que moro em Juiz de Fora.

À **Profa. Dra. Marta d'Agosto**, pela orientação, apoio, confiança e amizade dedicada desde os meus primeiros dias no Laboratório de Protozoologia, ao longo de toda minha Iniciação Científica e nestes dois anos de Mestrado, os meus sinceros agradecimentos. Acredito e espero que o vínculo que criamos ao longo destes anos não se finaliza com esta etapa.

Ao **Prof. Dr. Roberto Junio Pedroso Dias**, pela orientação, incentivo, dedicação, paciência e amizade diária e em todas as etapas deste trabalho, desde o momento da idealização até a concretização de um longo e bonito estudo. Obrigada por confiar em mim e em meu trabalho e espero de coração, que possamos continuar a trabalhar juntos por muito tempo.

À **Profa. Dra. Isabel Martinele**, pela orientação, apoio e confiança ao longo de toda minha Iniciação Científica, período o qual foi fundamental para os meus estudos com os protistas ciliados do rúmen. Obrigada por todos os ensinamentos e tempo dedicado a minha formação nesta linha de pesquisa.

Ao **Dr. Jailton da Costa Carneiro** e a **MSc. Marlice Teixeira Ribeiro**, do Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite, pela ajuda e colaboração durante o processo de alimentação e coletas de conteúdo ruminal nos bovinos e ovinos fistulados. Estendo o agradecimento, aos funcionários da Fazenda Experimental de Coronel Pacheco, **Meirinha e Moreira**, pela atenção e ajuda nas coletas.

À querida amiga, **Noemi Fernandes**, pela amizade e companheirismo desde os primeiros trabalhos com os ciliados do rúmen. Obrigada pelos ensinamentos e pela ajuda com as análises filogenéticas deste estudo. Ainda, pelo acolhida e recepção em sua casa e por todo carinho, desabafos, momentos de ânimo que você me proporcionou.

À querida amiga **Bianca Sartini**, companheira de jornada, pela amizade e carinho diário. Obrigada pelos desabafos, momentos de lazer, de trabalho, de terapia em grupo e por todas as risadas e colaboração durante minha passagem pelo Laboratório de Protozoologia.

Aos queridos amigos do Laboratório de Protozoologia da UFJF, **Thaís Barros, Raquel Tostes, Luísa Oliveira, Alyssa Borges, Roberto Marchesini, Diego**

Marques, Vitor Halfeld, Bianca Souza, Thalys Assumpção, e ao agregado **Ralph Maturano**, por todo o carinho e amizade ao longo desta jornada.

Gostaria de agradecer em especial a amiga **Franciane Cedrola**, companheira na paixão pelos ciliados ruminais, por toda ajuda, noites em claro, colaboração, desabafos e conselhos no dia-a-dia do laboratório. Agradeço também pela realização da técnica de carbonato de prata, me proporcionando imagens belíssimas, que agregaram imenso valor ao meu trabalho.

Às amigas **Beatriz e Lidimara**, por toda ajuda, apoio e colaboração nas análises estatísticas desta dissertação.

Ao **Dr. Akira Ito**, pelos artigos e revisões cedidas, além de toda a ajuda e disponibilidade no processo de identificação das espécies do gênero *Ostracodinium*.

Ao **Prof. Dr. Inácio Domingos da Silva-Neto**, do Laboratório de Protistologia da UFRJ, por toda humildade, simplicidade, colaboração e ajuda na realização e na obtenção das imagens em microscopia eletrônica de varredura e aos seus estagiários, Amanda e Anderson pela acolhida e recepção.

Ao **Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Soares** do Laboratório de Genética Molecular de Eucariotos e Simbiontes do Departamento de Genética da UFRJ por permitir que as análises moleculares fossem realizadas em seu laboratório.

Ao **Dr. Marcus Vinícius Xavier Senra**, agradeço pela imensa paciência e dedicação na realização de todas as análises moleculares da dissertação, cuja colaboração foi essencial para a realização deste trabalho. Estendo o agradecimento à **Jéssica Cavaleiro**, pela colaboração com as reações de sequenciamento.

À **Profa. Dra. Marlene Benchimol**, pela oportunidade e aprendizado profissional e pessoal, e por todos os alunos do Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade de Santa Úrsula, em especial aos amigos **Lígia e Antônio**, por todo carinho e paciência.

À minha mãezinha **Rita** e, ao amigo **Osmar**, por toda dedicação, atenção e prestatividade em todos estes anos de trabalho acadêmico, solucionando sempre assuntos burocráticos da Pós-Graduação.

À minha querida **Rosângela**, exemplo de ser humano, por toda amizade e apoio nos momentos mais difíceis e pelas risadas nos momentos alegres. Não poderia deixar de agradecer pelos almoços deliciosos durante o período de férias do R.U.

À todos os **professores do curso de Pós-Graduação**, por compartilharem experiências e ensinamentos, em especial a **Profa. Dra. Juliane Lopes**, pelos conselhos e consultoria estatística em meus trabalhos acadêmicos.

À amiga-irmã **Ana Carolina**, por sempre me compreender, mesmo nos momentos em que me ausência se fez presente, pela torcida e pela amiga que sempre foi, me escutando e me incentivando em todos os momentos desta etapa.

Não poderia deixar de agradecer ao meu amor e parceiro, **Leonardo**, por todo apoio, carinho e compreensão nos momentos de minha ausência e pela torcida em todos os momentos de minha vida acadêmica. Agradeço também a toda sua família, pela preocupação e apoio.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Desenho 1. Desenhos esquemáticos de protistas ciliados encontrados em ruminantes domésticos com destaque para os caracteres morfológicos de importância taxonômica.....20
- Desenho 2. Chave dicotômica de gêneros de ciliados comumente observados em ruminantes domésticos e desenhos esquemáticos das espécies de ciliados ruminais cuja morfologia da infraciliatura oral foi previamente descrita.....23
- Desenho 3. Desenhos esquemáticos dos padrões de infraciliatura oral descritos para a família Ophryoscolecidae: **a:** padrão-*Entodinium*; **b:** padrão-*Diplodinium*, **c:** padrão-*Diplodinium nanum*, **d:** padrão-*Diplodinium leche*, **e:** padrão-*Diplodinium polygonale*, **f:** padrão-*Eodinium posterovesiculatum*, **g:** padrão-*Ostracodinium gracile*, **h:** padrão-*Ostracodinium mammosum*, **i:** padrão-*Ostracodinium damaliscus*, **j:** padrão-*Enoploplastron stoky*, **k:** padrão-*Epidinium*, **l:** padrão-*Ophryoscolex*.24
- Desenho 4. Árvore filogenética inferida com base em sequências do gene ribossomal 18S-rDNA de espécies de ciliados das classes Litostomatea e Spirotrichea, usando dois métodos de reconstrução filogenética: máxima verossimilhança e agrupamentos de vizinhos.....26
- Desenho 5. Árvore filogenética inferida pelo método de reconstrução filogenética de agrupamento de vizinhos, utilizando sequências do gene 18SSU rRNA.....28
- Desenho 6. Hipótese evolutiva de protistas ciliados da família Ophryoscolecidae baseada na morfologia da infraciliatura oral.....29
- Desenho 7. Árvore filogenética de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA.....125

Desenho 8. Árvore filogenética pictorial de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA.....	127
Desenho 9. Árvore filogenética pictorial de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA.....	129
Prancha I: Fotomicrografias e eletromicrografias de ciliados do gênero <i>Entodinium</i>	68
Prancha II: Fotomicrografias e eletromicrografia de ciliados do gênero <i>Entodinium</i>	70
Prancha III: Fotomicrografias de ciliados do gênero <i>Charonina</i> e fotomicrografias e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero <i>Dasytricha</i>	72
Prancha IV: Fotomicrografias de ciliados do gênero <i>Isotricha</i> e <i>Dasytricha</i>	73
Prancha V: Fotomicrografias de ciliados do gênero <i>Diplodinium</i> e <i>Eremoplastron</i> e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero <i>Diplodinium</i>	76
Prancha VI: Fotomicrografias de ciliados do gênero <i>Polyplastron</i> e <i>Diploplastron</i> e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero <i>Polyplastron</i>	78
Prancha VII: Fotomicrografias de ciliados do gênero <i>Metadinium</i> ; a-c e g: <i>Metadinium minorum</i>	80
Prancha VIII: Fotomicrografias e eletromicrografias de ciliados da espécie <i>Ostracodinium clipeolum</i>	82
Prancha IX: Fotomicrografias e eletromicrografias de ciliados do gênero <i>Ostracodinium</i>	84

Prancha X: Espécies de ciliados do rúmen de bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova submetidos à técnica de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina aperfeiçoado no presente estudo.....	104
Prancha XI: Espécies de ciliados do rúmen de bovino Holandês-Gir sequenciadas no presente estudo.....	123
Gráfico 1. Projeção dos escores das 13 espécies do gênero <i>Entodinium</i> no espaço dos dois primeiros componentes principais.....	51
Gráfico 2. Projeção dos escores das sete espécies do gênero <i>Ostracodinium</i> no espaço dos dois primeiros componentes principais.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do Filo Ciliophora (Lynn, 2008).....	19
Tabela 2. Ocorrência dos protistas ciliados do rúmen observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....	44
Tabela 3. Autovetores da análise de componentes principais para os nove caracteres morfométricos medidos e seus respectivos autovalores e porcentagem de explicação...50	
Tabela 4. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies do gênero <i>Entodinium</i> observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....	53
Tabela 5. Autovetores da análise de componentes principais para os 11 caracteres morfométricos medidos e seus respectivos autovalores e porcentagem de explicação...56	
Tabela 6. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies do gênero <i>Ostracodinium</i> observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....	59
Tabela 7. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies do gênero <i>Metadinium</i> observadas em ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....	61
Tabela 8. Comparação entre as etapas dos protocolos de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal previamente estabelecidos para o estudo com ciliados do rúmen e o novo protocolo estabelecido neste estudo.....	102
Tabela 9. Classificação das espécies, número de acesso e de pares de base das sequências do gene 18S-rDNA de ciliados das subclasses Rhynchostomatia (grupo externo), Haptoria (grupo externo) e Trichostomatia.....	120
Tabela 10. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20$) de espécies da família Blepharocorythidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....	139

Tabela 11. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, n=20) de espécies da família Isotrichidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar..... 140

Tabela 12. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, n=20*) de espécies da família Ophryoscolecidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.....141

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Taxonomia e morfologia de protistas ciliados ruminais.....	16
2. Filogenia molecular de protistas ciliados ruminais.....	24
3. Objetivos.....	30
4. Referências Bibliográficas.....	31
SEÇÃO I - TAXONOMIA E MORFOLOGIA DE PROTISTAS CILIADOS (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) ENCONTRADOS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS	
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
Local de coleta e análises.....	38
Coleta e Processamento das amostras.....	38
Técnicas de microscopia óptica e eletrônica.....	39-40
Identificação e morfometria dos ciliados.....	41
Análise estatística.....	42
RESULTADOS.....	43
Composição dos protistas ciliados em ruminantes domésticos.....	43
Aspectos gerais da morfologia de protistas ciliados em ruminantes.....	45
1- <i>Entodinium</i> : morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral.....	48
2- <i>Ostracodinium</i> : morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral.....	54
3- <i>Metadinium</i> : morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral.....	60
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

SEÇÃO 2 - APERFEIÇOAMENTO DA TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELO
CARBONATO DE PRATA AMONÍACAL PARA PROTISTAS CILIADOS DO
RÚMEN

RESUMO.....	96
INTRODUÇÃO.....	97
MATERIAL E MÉTODOS.....	98
Aprimoramento do método de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina.....	98
RESULTADOS.....	99
DISCUSSÃO.....	100
CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

SEÇÃO 3 - ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA FAMÍLIA
OPHRYOSCOLECIDAE Stein, 1859 (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) COM
BASE NO GENE 18S-rDNA

RESUMO.....	108
INTRODUÇÃO	109
MATERIAL E MÉTODOS	110
Coleta, identificação e fixação dos organismos.....	110
Extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene 18S-rDNA.....	111
Alinhamento e análises filogenéticas.....	112
RESULTADOS	113
DISCUSSÃO.....	115
Sistemática morfológica x Filogenia molecular.....	115
Evolução da infraciliatura oral.....	117
CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
ANEXOS.....	135

RESUMO

A dissertação está dividida em três seções. A **Seção 1** apresenta um estudo morfológico e taxonômico detalhado, no qual 36 espécies de ciliados do rúmen de bovino e ovino foram inventariadas, com base na observação dos ciliados *in vivo*, corados com preparações semipermanentes, impregnados pela técnica do carbonato de prata amoniacal e visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Esta seção traz novas informações sobre os caracteres morfométricos importantes para a taxonomia deste grupo, com a descrição da infraciliatura e a importância do uso de técnicas ciliatológicas pouco usadas na caracterização de ciliados ruminais. Na **Seção 2**, com intuito de revelar a infraciliatura oral e somática para amplo espectro de gêneros e espécies de ciliados ruminais foram realizadas modificações nos protocolos existentes para a técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina e estabelecido um protocolo modificado que permitiu a impregnação da infraciliatura oral e do aparato nuclear de todas as 36 espécies de ciliados do rúmen de bovino e ovino alimentados com cana-de-açúcar. O protocolo proposto é simples, rápido e fácil de ser reproduzido, sendo vantajoso para taxonomistas interessados em realizar estudos de levantamento de biota ruminal e para zootecnistas e ecólogos interessados em entender a estrutura da taxocenose de protistas ciliados ruminais. A **Seção 3** apresenta um estudo filogenético da família Ophryoscolecidae com base em informações do gene 18S-rDNA, incluindo cinco novas sequências. Os principais resultados obtidos foram: ¹evidenciação da monofilia das subfamílias Entodiniinae e Ophryoscolecinae; ²a subfamília Diplodiniinae é considerada parafilética; ³os padrões de infraciliatura oral refletem divergência evolutiva na família Ophryoscolecidae; ⁴evidenciação da monofilia dos padrões de ciliatura oral padrão-*Entodinium*, padrão *Ostracodinium* (*Ostracodinium gracile* e *Ostracodinium mammosum*), padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex*; ⁵a condição ancestral do padrão-*Entodinium* sugerida por alguns autores não pôde ser comprovada usando informações do gene 18S-rDNA. As incongruências observadas entre os dados morfológicos e moleculares refletem a necessidade de se ampliar o número de sequências do gene 18S-rDNA para representantes da família Ophryoscolecidae e investigar a evolução deste grupo usando outros marcadores moleculares.

Palavras-chave: infraciliatura, protozoários, rúmen, técnicas ciliatológicas, 18S-rDNA

ABSTRACT

The dissertation is divided into three sections. **Section 1** provides a detailed taxonomic and morphological study, in which 36 species of rumen ciliates in cattle and sheep were inventoried, based on live observation, semipermanent preparations, pyridinated silver carbonate impregnation and scanning electron microscopy. This section provides new information on important morphometric characters for the taxonomy of this group, with the description of infraciliature and the importance of using techniques ciliatológicas underused in the characterization of rumen ciliates. In **Section 2** aiming to reveal the somatic and oral infraciliature for wide spectrum of genera and species of rumen ciliates, were made modifications to existing protocols for the pyridinated silver carbonate impregnation and established a modified protocol that allowed allowed impregnation of infraciliatura oral and nuclear apparatus of all 36 species of rumen ciliates of cattle and sheep fed with cane sugar bagasse. The proposed protocol is simple, quick and easy to be reproduced, being advantageous for taxonomists interested in perform survey studies of ruminal biota and animal scientists and ecologists interested in understanding the taxocenose and structure of the rumen ciliates. **Section 3** presents a phylogenetic study of the family Ophryoscolecidae based on 18S-rDNA gene information, including five new sequences. The main results were: ¹ confirmation of the monophyly of the Entodiniinae and Ophryoscolecinae subfamilies; ² Diplodiniinae subfamily is considered paraphyletic; ³ oral infraciliature patterns reflect evolutionary divergence in the family Ophryoscolecidae; ⁴ confirmation of monophyly of oral ciliature patterns *Entodinium*-type, *Ostracodinium*-type (*Ostracodinium gracile* and *Ostracodinium mammosum*), *Epidinium*-type and *Ophryoscolex*-type; ⁵ the ancestral condition of *Entodinium*-type suggested by some authors could not be verified using information from 18S-rDNA gene. The inconsistencies observed between the morphological and molecular data reflect the need to increase the number of 18S rDNA gene sequences to family Ophryoscolecidae representatives and investigate the evolution of this group using other molecular markers.

Keywords: infraciliature, ciliatological techniques, protozoa, rumen, 18S-rDNA

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. Taxonomia e morfologia de protistas ciliados ruminais

Os protistas do filo Ciliophora Doflein, 1901 compõem um grupo de eucariontes unicelulares amplamente diversificados morfologicamente que apresentam aproximadamente 8.000 morfoespécies descritas, sendo destas aproximadamente 3.000 morfoespécies de organismos simbioses (LYNN, 2008). Os protistas ciliados compreendem um grupo monofilético, levando em consideração as seguintes características: dimorfismo nuclear (presença de um macronúcleo e um ou mais micronúcleos), tipo de reprodução assexuada (fissão binária transversal) e a complexa infraciliatura (LYNN & CORLISS, 1991).

Os representantes endossimbiontes da classe Litostomatea Small & Lynn, 1981 (LYNN, 2008) (Tabela 1) são encontrados no ambiente ruminal de mamíferos herbívoros domésticos e também no trato digestivo de cavalos, zebras, rinocerontes, hipopótamos, roedores, capivaras, macacos, marsupiais, e até cobras, sapos, e peixes (CORLISS, 1979).

Os ciliados do rúmen são organismos unicelulares, anaeróbicos, não patogênicos e, que variam em tamanho de 20 a 200 μm , cerca de 10 vezes maiores que as bactérias ruminais (OGIMOTO & IMAI, 1981). A ciliatofauna ruminal está presente em duas ordens dentro da Classe Litostomatea: as ordens Vestibulifera de Puytorac et al., 1974 e Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929.

A ordem Vestibuliferida é representada na sua grande maioria por endossimbiontes de herbívoros mamíferos placentários, com exceção de *Balantidium coli* Claparède & Lachmann, 1858, que são parasitos de uma variedade de insetos e hospedeiros vertebrados (CORLISS, 1979). No ambiente ruminal esta ordem está representada pela família *Isotrichidae* Butschli, 1889 que apesar de ser constituída por poucas espécies, pode ser frequentemente observada em ruminantes domésticos (WILLIAMS & COLLEMAN, 1992). Morfologicamente caracterizam-se por apresentarem um vestíbulo, definido como uma cavidade oral ou depressão e a superfície corporal revestida por densas cinécias somáticas (LYNN, 2008).

Tabela 1. Classificação do Filo Ciliophora (Lynn, 2008).

- Phylum CILIOPHORA Doflein, 1901
- Subphylum POSTCILIODESMATOPHORA Gerassimova & Seravin, 1976
 - Class KARYORELICTEA Corliss, 1974
 - Order Protostomatida Small & Lynn, 1985
 - Order Loxodida Jankowski, 1980
 - Order Protoheterotrichida Nouzarède, 1977
 - Class HETEROTRICHEA Stein, 1859
 - Order Heterotrichida Stein, 1859
- Subphylum INTRAMACRONUCLEATA Lynn, 1996
 - Class SPIROTRICHEA Bütschli, 1889
 - Subclass Protocruziidia de Puytorac, Grain, & Mignot, 1987
 - Order Protocruziida Jankowski, 1980
 - Subclass Phacodiniidia Small & Lynn, 1985
 - Order Phacodiniida Small & Lynn, 1985
 - Subclass Licnophoria Corliss, 1957
 - Order Licnophorida Corliss, 1957
 - Subclass Hypotrichia Stein, 1859
 - Order Kiiitrichida Nozawa, 1941
 - Order Euplotida Small & Lynn, 1985
 - Suborder Discocephalina Wicklow, 1982
 - Suborder Euplotina Small & Lynn, 1985
 - Subclass Choreotrichia Small & Lynn, 1985
 - Order Tintinnida Kofoid & Campbell, 1929
 - Order Choreotrichida Small & Lynn, 1985
 - Suborder Leegaardiellina Laval-Peuto, Grain, & Deroux, 1994
 - Suborder Lohmanniellina Laval-Peuto, Grain, & Deroux, 1994
 - Suborder Strobilidiina Small & Lynn, 1985
 - Suborder Strombidinopsina Small & Lynn, 1985
 - Subclass Stichotrichia Small & Lynn, 1985
 - Order Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961
 - Order Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961
 - Order Urostylida Jankowski, 1979
 - Subclass Oligotrichia Bütschli, 1887/1889
 - Order Strombidiida Petz & Foissner, 1992
 - Class ARMOPHOREA Lynn, 2004
 - Order Armophorida Jankowski, 1964 a
 - Order Clevelandellida de Puytorac & Grain, 1976
 - Class LITOSTOMATEA Small & Lynn, 1981**
 - Subclass Haptoria Corliss, 1974**
 - Order Haptorida Corliss, 1974**
 - Order Pleurostomatida Schewiakoff, 1896**
 - Order Cyclotrichiida Jankowski, 1980 *incertae sedis***
 - Subclass Trichostomatia Bütschli, 1889**
 - Order Vestibuliferida de Puytorac et al., 1974**

- Order Entodiniomorphida Reichenow *in* Doflein & Reichenow, 1929**
Suborder Archistomatina de Puytorac et al., 1974
Suborder Blepharocorythina Wolska, 1971
Suborder Entodiniomorphina Reichenow *in* Doflein & Reichenow, 1929
Order Macropodiniida order nov. a
- Class PHYLLOPHARYNGEA de Puytorac et al., 1974
 Subclass Cyrtophoria Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1956
 Order Chlamydodontida Deroux, 1976
 Order Dysteriida Deroux, 1976
 Subclass Chonotrichia Wallengren, 1895
 Order Exogemmida Jankowski, 1972
 Order Cryptogemmida Jankowski, 1975
 Subclass Rhynchodia Chatton & Lwoff, 1939
 Order Hypocomatida Deroux, 1976
 Order Rhynchodida Chatton & Lwoff, 1939
 Subclass Suctoria Claparède & Lachmann, 1858
 Order Exogenida Collin, 1912
 Order Endogenida Collin, 1912
 Order Evaginogenida Jankowski, 1978
 Class NASSOPHOREA Small & Lynn, 1981
 Order Synhymeniida de Puytorac et al., 1974
 Order Nassulida Jankowski, 1967
 Order Microthoracida Jankowski, 1967
 Order Colpodidiida Foissner, Agatha & Berger, 2002 *incertae sedis*
 Class COLPODEA Small & Lynn, 1981
 Order Bryometopida Foissner, 1985
 Order Bryophryida de Puytorac, Perez-Paniagua, & Perez-Silva, 1979
 Order Bursariomorphida Fernández-Galeano, 1978
 Order Colpodida de Puytorac et al., 1974
 Order Cyrtolophosidida Foissner, 1978
 Order Sorogenida Foissner, 1985
 Class PROSTOMATEA Schewiakoff, 1896
 Order Prostomatida Schewiakoff, 1896
 Order Prorodontida Corliss, 1974
 Class PLAGIOPYLEA Small & Lynn, 1985 a
 Order Plagiopylida Jankowski, 1978
 Order Odontostomatida Sawaya, 1940 *incertae sedis*
 Class OLIGOHYMENOPHOREA de Puytorac et al., 1974
 Subclass Peniculia Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1956
 Order Peniculida Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1956
 Order Urocentrida Jankowski, 1980
 Subclass Scuticociliatia Small, 1967
 Order Philasterida Small, 1967
 Order Pleuronematida Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1956
 Order Thigmotrichida Chatton & Lwoff, 1922
 Subclass Hymenostomatia Delage & Hérouard, 1896

Order Tetrahymenida Fauré-Fremiet *in* Corliss, 1956
Order Ophryoglenida Canella, 1964
Subclass Apostomatia Chatton & Lwoff, 1928
Order Apostomatida Chatton & Lwoff, 1928
Order Astomatophorida Jankowski, 1966
Order Pilisuctorida Jankowski, 1966
Subclass Peritrichia Stein, 1859
Order Sessilida Kahl, 1933
Order Mobilida Kahl, 1933
Subclass Astomatia Schewiakoff, 1896
Order Astomatida Schewiakoff, 1896

^atáxon estabelecido com base em dados moleculares, mas sem sinapomorfias morfológicas; * Fonte: LYNN, D. 2008. *The Ciliated Protozoa*. 1ed. Springer. 605p. Posição da classe Litostomatea marcada em negrito.

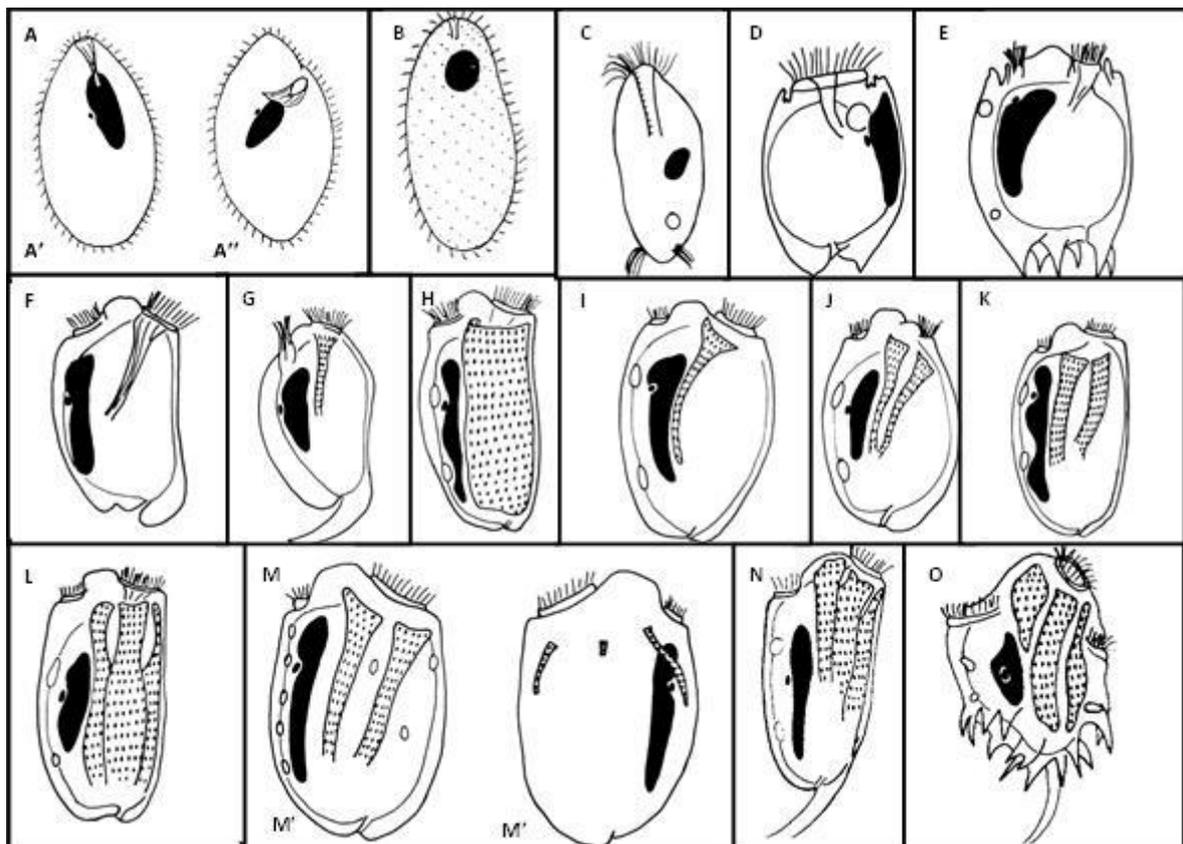
A ordem Entodiniomorphida se caracteriza pela riqueza de espécies e apresenta três subordens: Archistomatina, Puytorac et al., 1974; Blepharocorythina, Wolska, 1971 e Entodiniomorphina, Reichenow *in* Doflein & Reichenow, 1929, sendo as duas primeiras representadas por uma família cada e sendo observados principalmente em cavalos, camelos, elefantes e hipopótamos, com algumas espécies ocorrendo também em bovinos e roedores. A terceira sub-ordem, Entodiniomorphina, compreende muitas famílias, com maior prevalência em ruminantes (STRUDER-KYPKE et al., 2007) e se caracterizam morfológicamente por apresentarem uma ciliatura restrita em faixas e tufo (LYNN, 2008).

Desde a primeira observação destes organismos por GRUBY & DELAFOND (1843), estudos de caráter morfológico, ecológico, taxonômico e filogenético do grupo tem sido abordados (CUNHA, 1914; OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLLEMAN, 1992; D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994; WRIGHT & LYNN, 1997ab; D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999; ITO et al., 2010). No entanto, levando em consideração a ampla diversidade de espécies, apresentando diferentes formatos corporais e complexa organização interna, observa-se uma limitação de trabalhos envolvendo uma morfologia detalhada destes organismos, revisões recentes de gêneros e chaves de identificação taxonômica. Deste modo, torna-se clara a necessidade de se ampliarem os estudos acerca da morfologia e taxonomia dos ciliados ruminais.

A caracterização morfológica destes ciliados tem sido realizada utilizando preparações semipermanentes, incluindo solução à base de iodo (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) e solução de verde brilhante (GURELLI et al., 2012), técnicas de

microscopia eletrônica de varredura (GUIRONG et al., 2000; IMAI et al., 2002; 2004), impregnação pelo protargol (FOISSNER, 1991; D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994; CAMERON et al., 2000) e impregnação pelo carbonato de prata (ITO & IMAI, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009). Estas técnicas evidenciam estruturas que divergem em nível específico entre os ciliados, tais como: aparato nuclear, placas esqueléticas, lobos, espinhos e infraciliatura oral e somática. Na maioria das vezes, apenas uma técnica morfológica não contempla a visualização de todos os caracteres, fazendo com que a identificação destes ciliados seja apenas no nível de gênero e fazendo com que estes caracteres sejam alvos de estudos envolvendo novas técnicas.

A seguir observa-se uma relação de desenhos esquemáticos dos gêneros de protistas ciliados ocorrentes em ruminantes domésticos e as principais características morfológicas para a identificação específica destes organismos.



Desenho 1. Desenhos esquemáticos de protistas ciliados encontrados em ruminantes domésticos com destaque para os caracteres morfológicos de importância taxonômica. Ordem Vestibulifera: Gêneros **A**: *Isotricha* Stein, 1859 (**A'**-*Isotricha prostoma* Stein, 1858; **A''**- *Isotricha intestinalis* Stein, 1858), **B**: *Dasytricha* Schuberg, 1888. Ordem Entodiniomorphida: Gêneros: **C**: *Charonina* Strand, 1928; **D**: *Entodinium* Stein, 1859;

E: *Diplodinium* Schuberg, 1888; **F:** *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932; **G:** *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932; **H:** *Ostracodinium* Dogiel, 1927; **I:** *Eudiplodinium* Dogiel, 1927; **J:** *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932; **K:** *Metadinium* Awerinzew & Mutafova, 1914; **L:** *Enoploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932; **M:** *Polyplastron* Dogiel, 1927 (**M'**: Região dorsal do corpo; **M''**: Região ventral do corpo); **N:** *Epidinium* Crawley, 1923 e **O:** *Ophryoscolex* Stein, 1858. Desenhos: D'AGOSTO (1995).

Somada a todos os caracteres morfológicos já mencionados, a infraciliatura oral tem sido investigada em detalhe em ciliados ruminais com objetivo de ampliar os caracteres usados para diferenciar estes organismos e auxiliar os estudos de taxonomia e sistemática (ITO & IMAI, 1998, 2003, 2006; MISHIMA et al., 2009). A caracterização da região oral por meio da impregnação da infraciliatura se faz importante na caracterização morfológica dos ciliados, uma vez que este caráter apresenta padrões diferenciados, podendo ser utilizado como diagnóstico espécie-específico (ITO & IMAI, 2003, 2005).

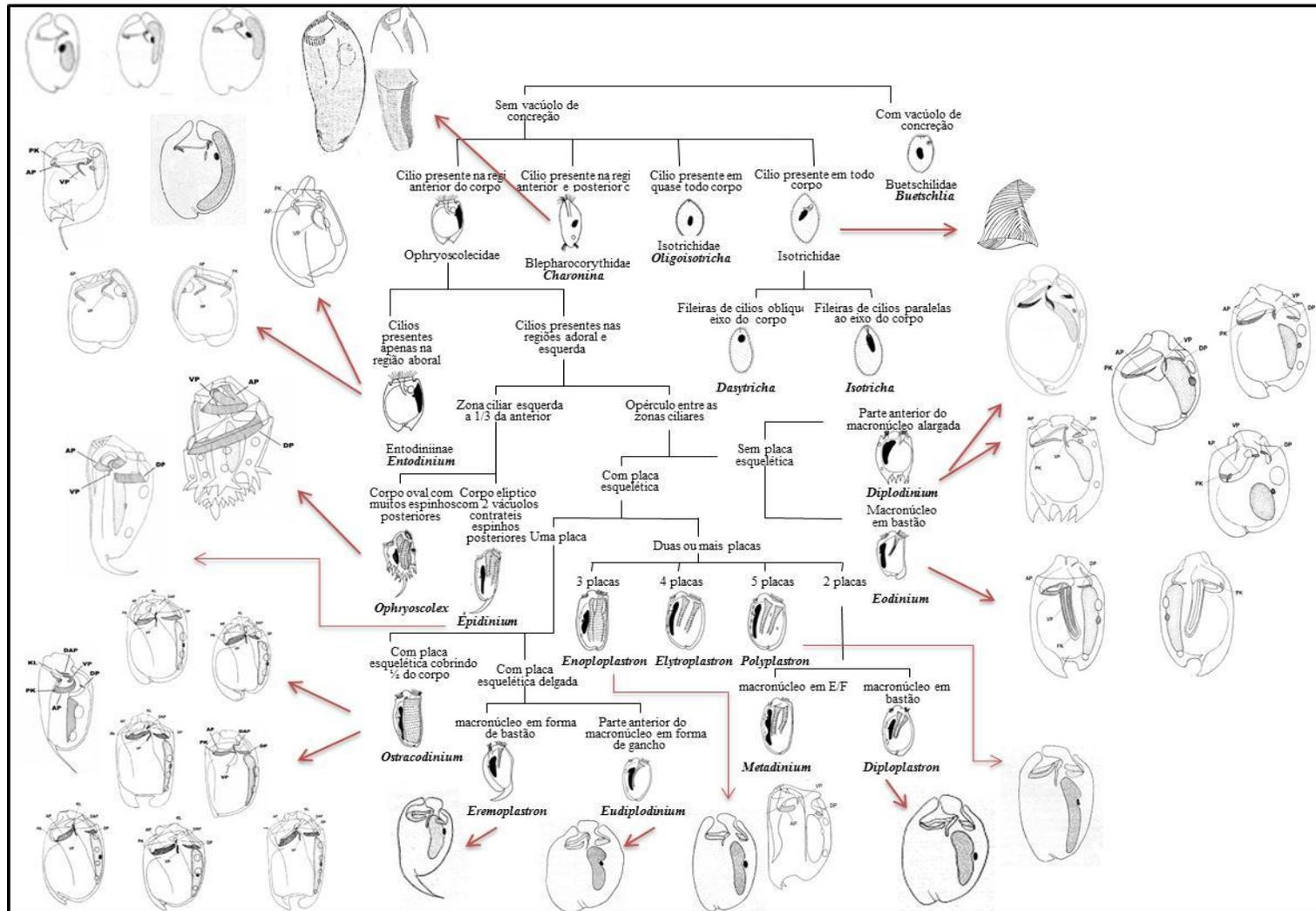
A morfologia da infraciliatura oral em ciliados do rúmen foi inicialmente descrita por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) para a família Ophryoscolecidae Stein, 1859 e por WOLSKA (1965, 1966, 1967, 1971) para as famílias Blepharocorythidae Hsiung, 1929 e Isotrichidae Butschli, 1889 (Desenho 2).

Existem 12 padrões de infraciliatura oral descritos para representantes da família Ophryoscolecidae: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Diplodinium polygonale*, padrão-*Diplodinium leche*, padrão-*Diplodinium nanum*, padrão-*Eodinium posterovesiculatum*, padrão-*Ostracodinium gracile*, padrão-*Ostracodinium mammosum*, padrão-*Ostracodinium damaliscus*, padrão-*Enoploplastron stoky*, padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex* (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FERNÁNDEZ-GALEANO, 1958; ITO et al., 1997, 2001, 2002, ITO & IMAI, 1998, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009) (Desenho 3). Entretanto, existem vários gêneros e espécies de ciliados ruminais cuja a morfologia das bandas de infraciliatura oral permanece desconhecida.

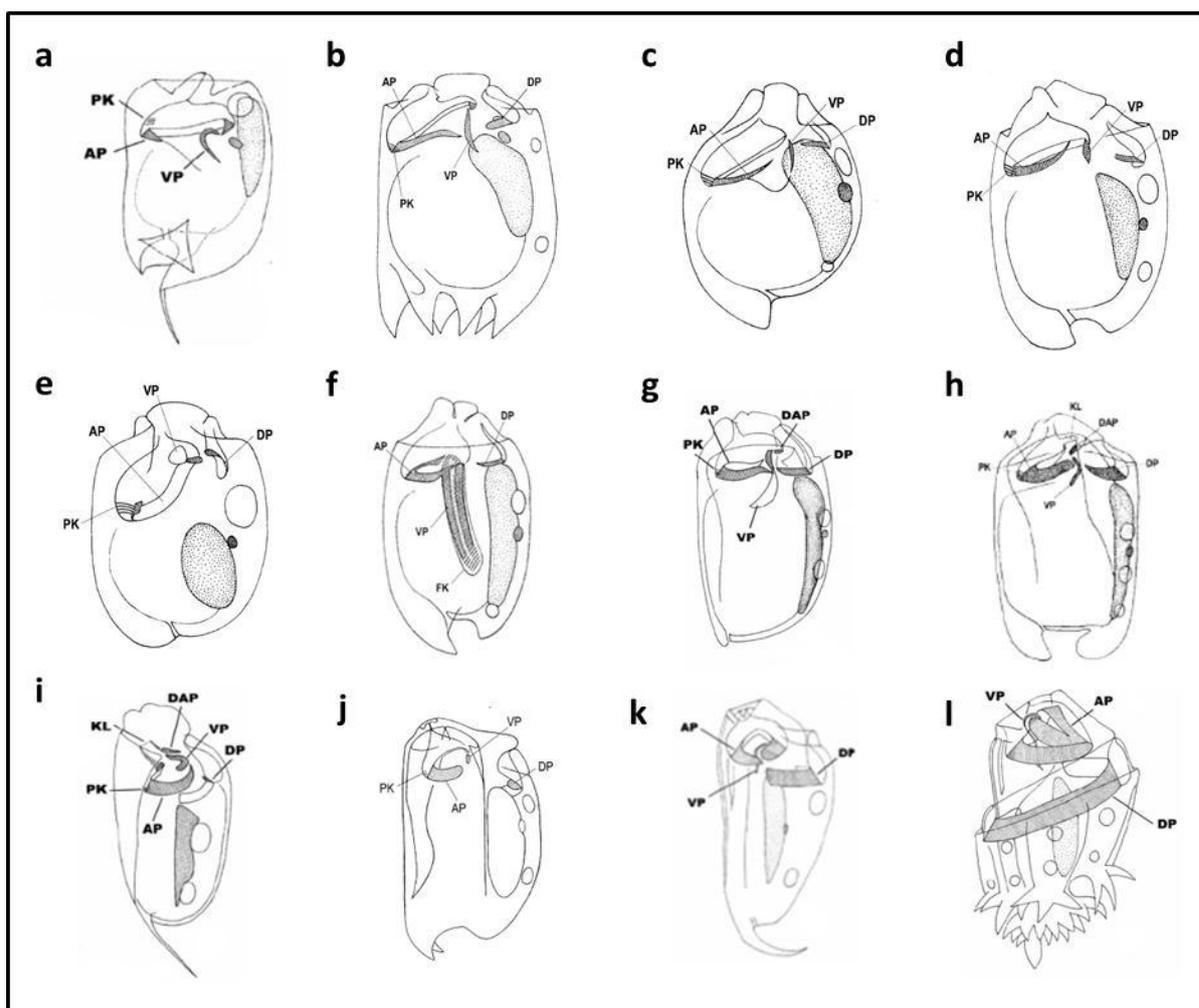
A caracterização morfológica da infraciliatura oral e somática em ciliados ruminais é realizada por meio da técnica de impregnação pela prata, cuja metodologia é essencial ao estudo taxonômico de protistas ciliados (MA et al., 2003). A técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina, descrita por FERNANDEZ-GALEANO

(1966), tem sido utilizada desde então, a fim de evidenciar a infraciliatura e o aparato nuclear em protistas ciliados. Ao longo dos anos, o método do carbonato de prata foi modificado inúmeras vezes, visando aperfeiçoar a técnica para melhor caracterizar a infraciliatura em diferentes espécies nos mais diversos hospedeiros (AUGUSTIN et al.; 1984; FOISSNER, 1991, 1992; ITO & IMAI, 1998, 2000, 2003, 2006; ITO et al., 2001, 2006, 2008, 2011; MA et al., 2003).

O uso de técnicas de impregnação pela prata é essencial para a correta identificação dos ciliados ruminais visto a grande diversidade e complexidade morfológica destes micro-organismos. A organização da ciliatura somática e principalmente da ciliatura oral variam consideravelmente entre as espécies destes ciliados. Portanto, é importante descrever a ciliatura oral para maior número de espécies possível com objetivo de utilizá-la como diagnose, o que se faz necessário a busca por protocolos de impregnação mais simples, rápido e mais abrangente.



Desenho 2. Chave dicotômica de gêneros de protistas ciliados comumente observados em ruminantes domésticos (OGIMOTO & IMAI, 1981 adaptado por D'AGOSTO, 1995) e desenhos esquemáticos das espécies de ciliados ruminais cuja morfologia da infraciliatura oral foi previamente descrita (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FERNÁNDEZ-GALEANO, 1958; ITO et al., 1997, 2001, 2002; ITO & IMAI, 1998, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009). **Legenda:** AP: policinécias adoral; DAP: policinécias dorso-adoral; DP: policinécias orsal; KL: volta cineal; VP: policinécias vestibular; PK: cinécias paralabiais; FK: franjas em torno das policinécias vestibular.



Desenho 3. Desenhos esquemáticos dos padrões de infraciliatura oral descritos para a família Ophryoscolecidae: **a:** padrão-*Entodinium*; **b:** padrão-*Diplodinium*, **c:** padrão-*Diplodinium nanum*, **d:** padrão-*Diplodinium leche*, **e:** padrão-*Diplodinium polygonale*, **f:** padrão-*Eodinium posterovesiculatum*, **g:** padrão-*Ostracodinium gracile*, **h:** padrão-*Ostracodinium mammosum*, **i:** padrão-*Ostracodinium damaliscus*, **j:** padrão-*Enoploplastron stokyi*, **k:** padrão-*Epidinium*, **l:** padrão-*Ophryoscolex*. **Legenda:** **AP:** policinécias adoral; **DAP:** policinécias dorso-adoral; **DP:** policinécias dorsal; **KL:** volta cinecial; **VP:** policinécias vestibular; **PK:** cinécias paralabiais; **FK:** franjas em torno das policinécias vestibular. Fonte: NOIROT-TIMOTHÉE (1960); FERNÁNDEZ-GALEANO (1958); ITO et al. (1997, 2001, 2002); ITO & IMAI (1998, 2003, 2005, 2006); MISHIMA et al. (2009).

2. Filogenia molecular de protistas ciliados ruminais

As relações filogenéticas baseadas em uma abordagem morfológica vêm sendo contestadas e/ou confirmadas por estudos moleculares para diversos grupos de ciliados (WRIGHT et al., 1997; STRUDER-KYPTE et al., 2006, 2007; VD'ACNY et al., 2011a,b). No

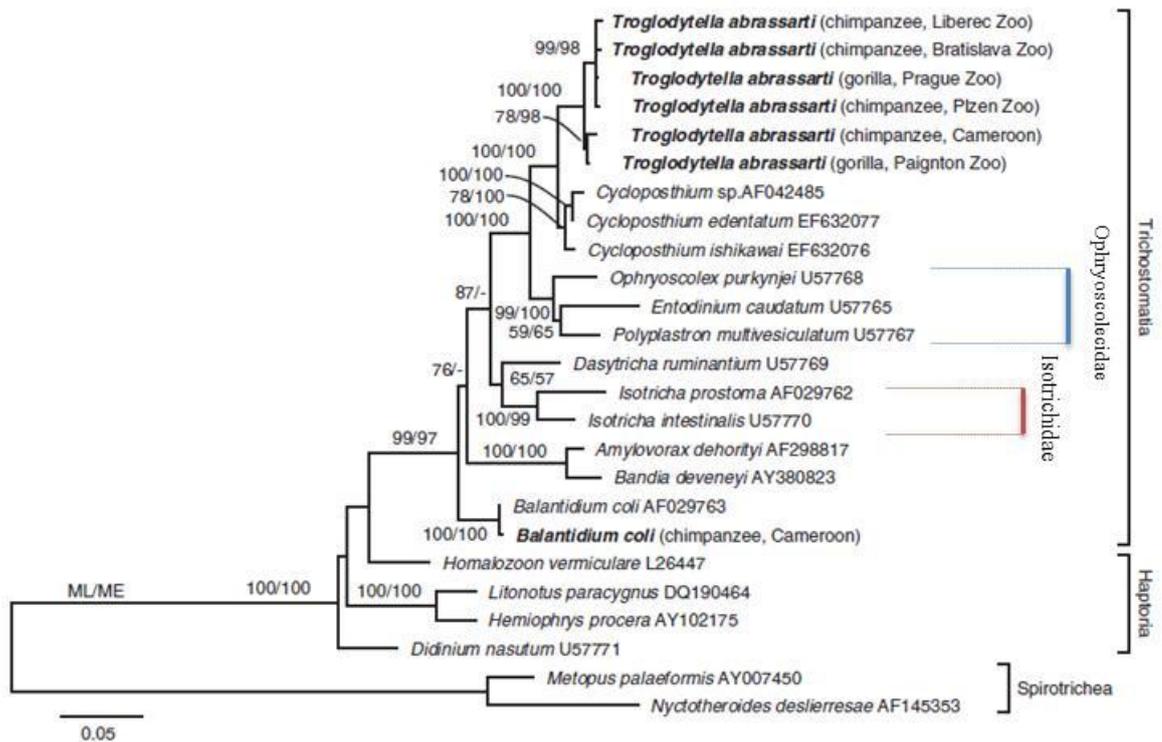
entanto, as abordagens a respeito da diversidade dos protistas ciliados ruminais tem recebido pouca atenção, sendo poucas as sequências de espécies de ciliados ruminais disponíveis no GenBank.

A aplicação de técnicas moleculares permite a avaliação da diversidade e composição microbiana, da dinâmica populacional e fornece informações a respeito das sucessões evolutivas em protistas do rúmen (CAMERON et al., 2003). Estas abordagens fornecem informações importantes para traçar estratégias no intuito de manipular esta microbiota e melhorar a eficiência nos sistemas de produção de ruminantes.

O primeiro estudo filogenético envolvendo ciliados ruminais foi conduzido por EMBLEY et al., (1995) que examinaram o gene 18S-rDNA de *Dasytricha ruminantium* Schuberg, 1888. Estes autores confirmaram o posicionamento dos vestibulíferos como grupo irmão dos entodiniomorphidas dentro da Classe Litostomatea. Posteriormente, WRIGHT & LYNN (1997) examinaram sequências do gene 18s rRNA de mais duas espécies, *Isotricha intestinalis* e *I. prostoma*, confirmando a monofilia dos isotrichideos. Resultados semelhantes foram relatados por CAMERON et al. (2000). No entanto, estudos posteriores contestaram a monofilia do grupo, destacando sua característica polifilética (CAMERON et al., 2001) ou parafilética (CAMERON et al., 2003; STRUDER-KYPKEA et al., 2006; 2007).

Quanto à ordem Entodiniomorphida, o caráter monofilético tem sido bem suportado por estudos moleculares (WRIGHT et al., 1997; CAMERON et al., 2001, 2003; STRUDER-KYPKEA et al., 2006; 2007). No entanto, a complexidade morfológica e a limitação de sequências descritas e depositadas em bancos de genes fazem com que as análises filogenéticas dos ciliados ruminais se modifique constantemente, justificando assim a necessidade de se ampliar os estudos neste aspecto.

O caráter monofilético dos ciliados ruminais ainda se faz controverso na literatura, de modo que a biologia molecular tem sido utilizada para aprimorar os estudos filogenéticos destas populações. Estudos filogenéticos recentes utilizando o gene 18S rDNA comprovam que os ciliados ruminais não constituem um grupo natural, visto que representantes das ordens Entodiniomorphida e Vestibulifera, nas quais estão presentes as espécies de ciliados ruminais não se agrupam em um grupo monofilético (MODRY et al., 2009; ITO et al., 2010; SNELLING et al., 2011) (Desenho 4).



Desenho 4. Árvore filogenética inferida com base em sequências do gene ribossomal 18S-rDNA de espécies de protistas ciliados das classes Litostomatea e Spirotrichea, usando dois métodos de reconstrução filogenética: máxima verossimilhança e agrupamentos de vizinhos. Na topologia apresentada os protistas ciliados do rúmen (barras vermelha e azul) não constituem grupos naturais. Os valores em cada nó da árvore significam respectivamente: bootstrap da análise de máxima verossimilhança/ bootstrap da análise de Neighbor- Joining. Fonte: MODRY et al. (2009).

Dentre as famílias que compõem a ordem Entodiniomorphida, a família Ophryoscolecidae destaca-se em relação a riqueza de espécies de ciliados ruminais e o número de sequências disponíveis no GenBank.

A família Ophryoscolecidae é constituída por protistas ciliados que apresentam alta diversidade morfológica, sendo por isso, agrupados em três subfamílias: Entodiniinae Lubinsky, 1957c, Diplodiniinae Lubinsky, 1957c e Ophryoscolecinae Lubinsky, 1957c.

A subfamília Entodiniinae é composta somente pelo gênero *Entodinium* e é caracterizada por apresentar uma única zona de ciliatura, a zona de ciliatura adoral e, um único vacúolo contrátil (LUBINSKY, 1957c).

A subfamília Diplodiniinae apresenta duas zonas de ciliatura, a zona de ciliatura adoral e uma acessória, denominada zona de ciliatura dorsal, situadas no mesmo plano

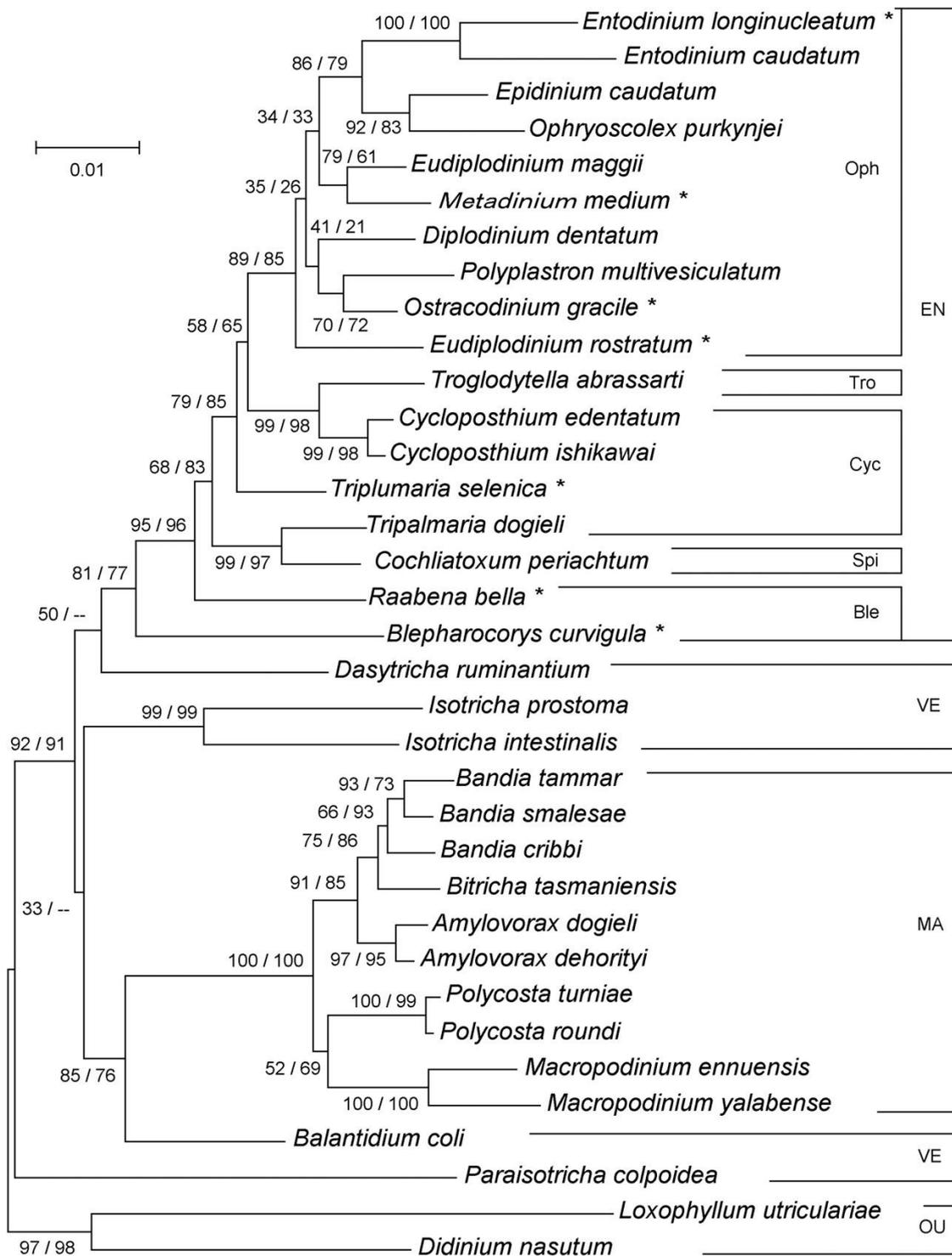
transversal. Dois ou mais vacúolos contráteis estão presentes e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal. As placas esqueléticas podem estar presentes ou não. Esta subfamília inclui grande parte dos gêneros de ciliados que ocorrem comumente no ambiente ruminal. São eles: *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Polyplastron*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron* e *Ostracodinium* (LUBINSKY, 1957c).

A subfamília Ophryoscolecinae é composta pelos gêneros *Epidinium* e *Ophryoscolex* e, também apresenta duas zonas de ciliatura, porém em planos transversais diferentes. Todos os ciliados apresentam placas esqueléticas, dois ou mais vacúolos contráteis e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal (LUBINSKY, 1957c).

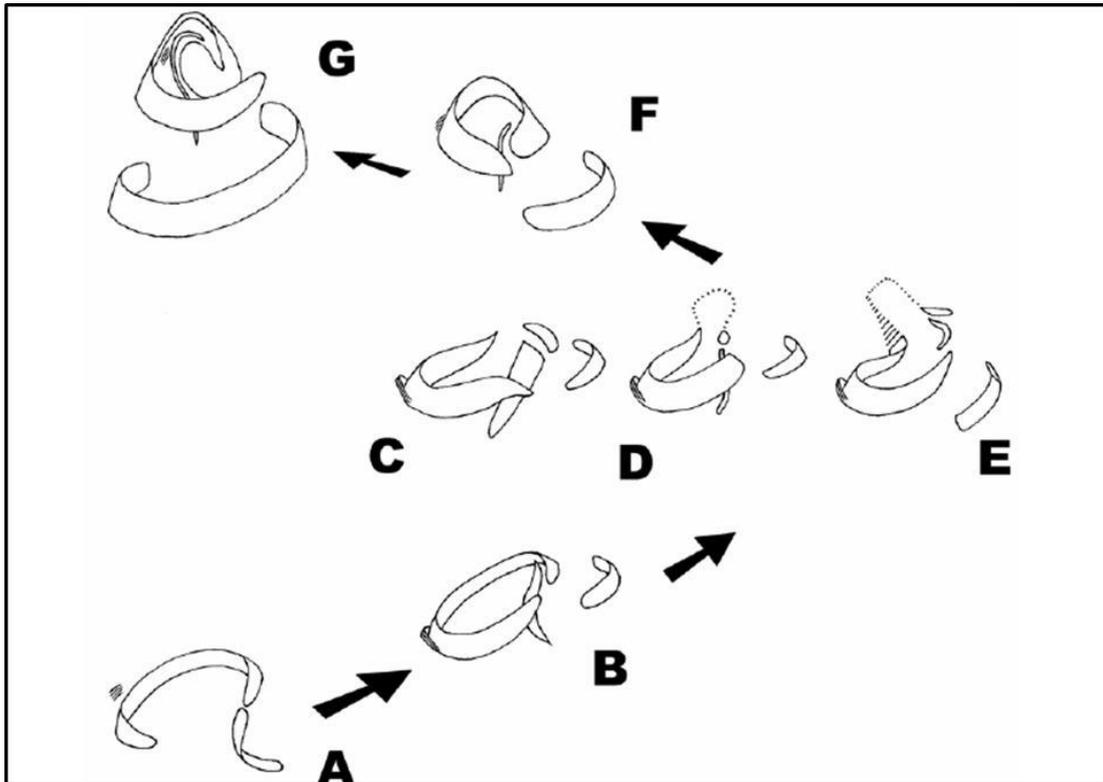
Segundo DOGIEL (1947) e LUBINSKY (1957c), dentro da família Ophryoscolecidae os Entodiniinae poderiam ser considerados plesiomórficos, visto sua zona ciliar única, único vacúolo contrátil, espinhos caudais pouco desenvolvidos e ausência de placas esqueléticas; os Ophryoscolecinae o grupo mais derivado por apresentarem duas zonas ciliares, elevados número de vacúolos e placas esqueléticas, e projeções caudais desenvolvidas; e os Diplodiniinae um grupo intermediário, entretanto, esta hipótese sugerida não foi formulada com base em um estudo filogenético.

Estudos moleculares recentes com base em informações do gene 18S-rDNA têm evidenciado a monofilia da família Ophryoscolecidae (CAMERON et al., 2001, 2003; STRUDER-KYPKEA et al., 2006, 2007), entretanto, a divisão desta família em três subfamílias Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae ainda não foi testada usando análises moleculares.

A morfologia da infraciliatura oral, tendo em vista sua diversidade morfológica em protistas ciliados, tem sido utilizada como mais uma importante característica morfológica para explicar a posição filogenética de algumas famílias da Ordem Entodiniomorphida (ITO et al., 2010) (Desenho 5). Entretanto, nenhum estudo enfatizou essa relação para a família Ophryoscolecidae.



Desenho 5. Árvore filogenética inferida pelo método de reconstrução filogenética “Neighbor-Joining” (NJ), utilizando seqüências do gene 18SSU rRNA. Ble: Família Blepharocorythidae; Cyc: Família Cycloposthiidae Poche, 1913; EN: Ordem Entodiniomorphida; MA: Ordem Macropodiniida Lynn, 2008; Oph: Ophryoscolecidae; OU: Outgroup; Spi: Família Spirodiniidae Strelkow, 1939; Tro: Família Troglodytelliidae Corliss, 1979; VE: Ordem Vestibulifera. Asteriscos evidenciam as novas seqüências incluídas pelo estudo (ITO et al., 2010).



Desenho 6. Hipótese evolutiva da família Ophryoscolecidae baseada na morfologia da infraciliatura oral. **A:** padrão- *Entodinium*; **B:** padrão-*Diplodinium*; **C:** padrão- *Ostracodinium gracile*; **D:** padrão- *Ostracodinium mammosum*; **E:** padrão-*Ostracodinium damaliscus*; **F:** padrão-*Epidinium*; **G:** padrão- *Ophryoscolex*. Fonte: ITO & IMAI (2006).

A infraciliatura oral nos Ophryoscolecidae, assim como outros caracteres morfológicos (vacúolo contrátil, placas esqueléticas, projeções caudais), é mais complexa nos Ophryoscolecinae, mais simples nos Entodiniinae e com complexidade intermediária nos Diplodiniinae (Ito & Imai, 2006) (Desenho 6), corroborando a hipótese evolutiva para as subfamílias sugerida por LUBINSKY (1957c). No entanto esta informação ainda não foi investigada para representantes das três subfamílias que compõem a família Ophryoscolecidae.

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos: ¹inventariar as espécies de protistas ciliados do rúmen de bovino e ovino alimentados com bagaço de cana-de-açúcar, com base na observação dos ciliados *in vivo*, corados com preparações semipermanentes, impregnados pela técnica do carbonato de prata amoniacal e visualizados por microscopia eletrônica de varredura; ²aperfeiçoar do método de impregnação do carbonato de prata amoniacal com piridina para protozoários ciliados do rúmen, fornecendo um protocolo único que impregne o maior número de táxons possível encontrados em bovinos e ovinos; ³verificar se as três subfamílias de Ophryoscolecidae constituem grupos naturais e investigar se os diferentes padrões de infraciliatura oral presentes neste grupo refletem divergência evolutiva.

4. Referências Bibliográficas

- AUGUSTIN, H.; FOISSNER, W.; ADAM, H. An improved pyridinated silver carbonate method which needs few specimens and yields permanent slides of impregnated ciliates (Protozoa, Ciliophora). **Mikroskopie**, v.41, p. 134-137, 1984.
- CAMERON. S.L.; O'DONOGHUE. P. J.; ADLARD. R.D. Novel isotrichid ciliates endosymbiotic in Australian macropodid marsupials. **Systematic Parasitology**, v.46, p.45-57. 2000.
- CAMERON, S.L., ADLARD, R.D., O'DONOGHUE, P.J. Molecular evidence for an independent radiation of holotrich trichostome ciliates in Australian marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, p. 302 – 310. 2001.
- CAMERON, S.L.; WRIGHT, A.D.G.; O'DONOGHUE, P.J. An Expanded Phylogeny of the Entodiniomorphida (Ciliophora: Litostomatea). **Acta Protozoologica**, v. 42. p. 1 – 6. 2003.
- CORLISS, J. The ciliated protozoa; characterization, classification and guide to the literature. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 455 pp. 1979.
- D'AGOSTO. M.; CARNEIRO. M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.725-729. 1999.
- D'AGOSTO, M. Aspectos morfológicos e quantitativos de ciliados do rúmen de vacas leiteiras fistuladas no Brasil. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédia, RJ. 1995.
- DEHORITY. B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, v.48, p.182-185. 1984.
- DEHORITY. B.A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Boca Raton. Fla: CRC press. 1993. 325p.
- DOGIEL, V. The Phylogeny of the Stomach-Infusorians of Ruminants in the Light of palaeontological and parasitological Data. **The Zoological Laboratory of Leningrad University**, v.88, p.337-342, 1947.
- EMBLEY, T.M.; FINLAY, B.J.; DYAL, P.L.; HIRT, R.P.; WILKINSON, M.; WILLIAMS, A.G. Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 262, p.87-93.1995.

- FERNANDEZ-GALEANO. D. La infraciliación en *Polyplastron multivesiculatum* y su génesis durante la división del ciliado. **Bolletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, v.56, p.89-108. 1958.
- FERNANDEZ-GALEANO. D. Une nouvelle methode pour la mise en evidence de l'infraciliature des cilies. **Protistologica**, v.2, p. 35-37. 1966.
- GULERI. G.; GÖÇMEN. B. ; YILDIZ. M.Z. Rumen Ciliates from the Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa*) living in the Şanlıurfa Province of Turkey. **Biharean Biologist**, v.6, p.42-44. 2012.
- GURUNG. Y.B. ; PARAJULI. N. ; MIYAZALI. Y. ; IMAI. S. ; KOBAYASHI. K. Rumen ciliate fauna of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and goat (*Capra hircus*) in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.265-267. 2002.
- GRUBY, D.; DELAFOND, O. Recherches sur des animalcules su developpant en gland nombre dans l'estomac et les intestines, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. **Comptes Rendus de L'académie des Sciences**, v.17, p. 1304-1308. 1843.
- IMAI. S.; MATSUMOTO. M.; WATANABE. A.; SATO. H. Establishment of a Spinated Type of *Diplodinium rangiferi* by Transfaunation of the Rumen Ciliates of Japanese Sika Deer (*Cervus nippon centralis*) to the Rumen of Two Japanese Shorthorn Calves (*Bos taurus taurus*). **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.38-41. 2002.
- IMAI. S.; SHINNO. T.; IKE. K.; MORITA. T.; SELIM. H.M. Fourteen Morphotypes of *Entodinium ovumrajae* (Ophryoscolecidae. Entodiniomorpha) Found in the Dromedary Camel of Egypt. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.51, p. 594-597. 2004.
- ITO. A.; ARAI. N.; TSUTSUMI. Y. & IMAI. S. Ciliate protozoa in the rumen of sassaby antelope. *Damaliscus lunatus lunatus*. including the description of a new species and form. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p.586-591. 1997.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecid ciliate. *Ostracodinium gracile* (Dogiel. 1925). observed by ligh microscopy. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p. 628-636. 1998.
- ITO. A.; MIYAZAKI. Y.; IMAI. S. Ligh microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium* ciliates. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48, p.440-448. 2001.
- ITO. A.; MIYAZAKI. Y.; IMAI. S. Descriptions of new Parentodinium ciliates in the family Parentodiniidae n.fam. from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodinio morphs from horses and cattle. **European Journal of Protistology**, v.37, p.405-426. 2002.

- ITO. A.; IMAI. S. Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.50, p.34-42. 2003.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliature and Morphogenesis in Three Rumen Diplodinium Ciliates. *Diplodinium polygonale*. *Diplodinium leche*. and *Diplodinium nanum*. Observed by Light Microscopy. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.52, p.44–51. 2005.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecoid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v.17, p.103-110. 2006.
- LUBINSKY. G. Studies on the evolution of *Ophryoscolecidae* (Ciliata: Oligotricha).III. Phylogeny of the *Ophryoscolecidae* based on their comparative morphology. **Canadian Journal of Zoology**, v.35, p. 141-159. 1957c.
- LYNN. D.H. The ciliated protozoa. Characterization. classification. and guide to the literature. 3rd ed. Springer. Dordrecht. 2008.
- LYNN, D.H.; CORLISS, J.O. Microscopic Anatomy of Invertebrates. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 333–467.1991.
- MA, H.; CHOI, J.K.; SONG, W. An Improved Silver Carbonate Impregnation for Marine Ciliated Protozoa. **Acta Protozoologica**, v.42, p.161 – 164, 2003.
- MISHIMA. T.; KATAMOTO. H.; HORII. Y.; KAKENGI. V.A.M; ITO. A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle. *Bos Taurus indicus*. and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stoky* (Buisson. 1924). **European Journal of Protistology**, v.45, p.77–86. 2009.
- MODRY, D.; PETRŽELKOVÁ, K.J.; POMAJBÍKOVÁ, K.; TOKIWA, T.; KRÍEK, J.; IMAI, S.; VALLO, P.; PROFOUSOVÁ, I.; ŠLAPETA, J. The Occurrence and Ape-to-Ape Transmission of the Entodiniomorphid Ciliate *Troglodytella abressarti* in Captive Gorillas. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 83–87, 2009.
- NOIROT-TIMOTHÉE. C. Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoseoleeidae. Structures et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale**, v.2, p.527-718. 1960.
- OGIMOTO. K.; IMAI. S. **Atlas of Rumen Microbiology**. Tokyo. Japan Scientific Societies Press. 231p. 1981.
- SNELLING, T.; PINLOCHE, E.; WORGAN, H.J.; NEWBOLD, C.J.; McEWAN, N.R. Molecular Phylogeny of *Spirodinium equi*, *Triadinium caudatum* and *Blepharocorys* sp. from the Equine Hindgut. **Acta Protozoologica**, v.50, p.319–326, 2011.

- STRUDER-KYPKE, M.C., WRIGHT, A.-D.G., FOISSNER, W., CHATZINOTAS, A., LYNN, D.H. Molecular phylogeny of litostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) with emphasis on free-living Haptorian Genera. **Protist**, v. 157, p. 261–278. 2006.
- STRUDER-KYPKE, M.C.; KORNILOVA, O.A.; LYNN, D.H. Phylogeny of trichostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) endosymbiotic in the Yakut horse (*Equus caballus*). **European Journal of Protistology**, v.43, p. 319–328. 2007.
- VD' AČNÝ, P.; ORSI, W.; BOURLAND, W.A.; SHIMANO, S.; EPSTEIN, S.S.; FOISSNER, W. Morphological and molecular phylogeny of dileptid and tracheliid ciliates: Resolution at the base of the class Litostomatea (Ciliophora, Rhynchostomatia). **European Journal of Protistology**, v. 47, p.295–313, 2011a.
- VD' AČNÝ, P.; BOURLAND, W.A.; ORSI, W.; EPSTEIN, S.S.; FOISSNER, W. Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.59, p.510–522, 2011b.
- WILLIAMS. A.G.; COLEMAN. G.S. *The rumen protozoa*. New York: **Springer** -Verlag New York Inc. 423p. 1992.
- WOLSKA. M. Remarks on the adoral ciliature in the order Entodiniomorpha. **Acta Protozoologica**, v.3, p.322-328. 1965.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung I. Preliminary remarks. **Acta Protozoologica**, v.4, p.97-104. 1966.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung II. *Charonina ventriculi* (Jameson). **Acta Protozoologica**, v.4, p.179-283. 1967.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung V. A review of genera and species. **Acta Protozoologica**, v.9, p.24-43. 1971.
- WRIGHT, A.D.G., LYNN, D.H. Monophyly of the trichostome ciliates (phylum Ciliophora: class Litostomatea) tested using new 18S rRNA sequences from the vestibuliferids, *Isotricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium*, and the haptorian, *Didinium nasutum*. **European Journal of Protistology**, v.33, p.305–315, 1997a.
- WRIGHT, A.D.G., LYNN, D.H. Phylogenetic analysis of the rumen ciliate family Ophryoscolecidae based on 18s ribosomal RNA sequences, with new sequences from *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, and *Ophryoscolex*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, p.963-970, 1997b.

WRIGHT, A.D.G.; DEHORITY, B.A.; LYNN, D.H. Phylogeny of the Rumen Ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorpha) Inferred from Small Subunit Ribosomal RNA Sequences. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 44, n.1; p. 61-67. 1997.

SEÇÃO 1

TAXONOMIA E MORFOLOGIA DE PROTISTAS CILIADOS (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) ENCONTRADOS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS

RESUMO: Objetivou-se inventariar as espécies de protistas ciliados do rúmen de bovino e ovino alimentados com bagaço de cana-de-açúcar, com base na observação dos ciliados *in vivo*, corados com preparações semipermanentes, impregnados pela técnica do carbonato de prata amoniacal e visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Foram identificadas 36 espécies de ciliados em ambos hospedeiros. A elevada riqueza e a composição das espécies de ciliados encontradas neste estudo diferem de estudos prévios para bovinos e ovinos alimentados com bagaço de cana-de-açúcar. Com intuito de revelar a infraciliatura oral e somática para amplo espectro de gêneros e espécies de ciliados ruminais foram realizadas modificações nos protocolos existentes para a técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina e estabelecido um protocolo modificado que permitiu a impregnação concomitante para todos os táxons encontrados. Foram caracterizados, pela primeira vez, os padrões de infraciliatura oral em *Entodinium dubardi dubardi*, *Entodinium retangulatum retangulatum*, *Entodinium alces*, *Entodinium rostratum*, *Metadinium minorum*, *Metadinium ypsilon* e *Ostracodinium clipeolum*. Com o estudo biométrico realizado para todas as espécies encontradas, foram estabelecidos novos parâmetros morfométricos importantes para a caracterização de *Charonina ventriculi*, *Ostracodinium* spp., *Diploplastron affine*, *Metadinium* spp., *Eremoplastron rostratum* e *Polyplastron multivesiculatum*. Foi realizado um estudo morfológico detalhado com descrições e redescrições da infraciliatura oral para espécies dos gêneros *Entodinium*, *Ostracodinium* e *Metadinium*. O presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento acerca da taxonomia e morfologia de ciliados simbioses de ruminantes domésticos, trazendo novas informações sobre os caracteres morfométricos importantes para a taxonomia deste grupo, com a descrição da infraciliatura e a importância do uso de técnicas ciliológicas pouco usadas na caracterização de ciliados ruminais.

Palavras-chaves: Cana-de-açúcar, carbonato de prata, infraciliatura, morfometria, protozoários ruminais

INTRODUÇÃO

Os protistas ciliados do rúmen compõem o ambiente ruminal juntamente com as bactérias, fungos e protistas flagelados, os quais participam do processo de digestão fermentativa em mamíferos herbívoros (ARCURI et al., 2011).

Os ciliados ruminais constituem um grupo com ampla diversidade de espécies, diferentes formatos corporais e complexa organização interna (DEHORITY, 1993). Dentre os caracteres utilizados na taxonomia e reconhecimento da ciliatofauna ruminal estão: tamanho e forma do corpo, organização das ciliaturas oral e somática, morfologia do vestíbulo e do aparato nuclear, a presença e número de placas esqueléticas, número e posição de vacúolos contráteis e presença/morfologia de projeções caudais, tais como lobo e espinhos (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLLEMAN, 1992).

A caracterização morfológica destes ciliados tem sido realizada utilizando preparações semipermanentes, incluindo solução à base de iodo (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) e solução de verde brilhante (GURELLI et al., 2012), técnicas de microscopia eletrônica de varredura (GUIRONG et al., 2000; IMAI et al., 2002; 2004) e de impregnação pelo carbonato de prata (ITO & IMAI, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009). Estas técnicas evidenciam estruturas que divergem em nível específico entre os ciliados, tais como: aparato nuclear, placas esqueléticas, lobos, espinhos e infraciliatura oral e somática.

A análise morfológica da infraciliatura oral e somática tem sido uma ferramenta útil nas descrições específicas destes ciliados. Os padrões de infraciliatura oral em ciliados do rúmen foram primeiramente descritos por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) para a família Ophryoscolecidae Stein, 1859 e por WOLSKA (1965, 1966, 1967, 1971) para as famílias Blepharocorythidae Hsiung, 1929 e Isotrichidae Butschli, 1889. Existem 12 padrões de infraciliatura oral descritos para representantes da família Ophryoscolecidae: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Diplodinium polygonale*, padrão-*Diplodinium leche*, padrão-*Diplodinium nanum*, padrão-*Eodinium posterovesiculatum*, padrão-*Ostracodinium gracile*, padrão-*Ostracodinium mammosum*, padrão-*Ostracodinium damaliscus*, padrão-*Enoploplastron stoky*, padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex* (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FERNÁNDEZ-GALEANO, 1958; ITO et al., 1997, 2001, 2002, ITO & IMAI, 1998, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009). Entretanto, existem vários gêneros e espécies de ciliados ruminais com padrão da infraciliatura oral desconhecido.

Levando em consideração a complexidade morfológica dos ciliados, somada a escassez de trabalhos recentes que abordem revisões de gêneros e a quantidade limitada de chaves de identificação taxonômica, torna-se clara a necessidade de se ampliarem os estudos acerca da morfologia e taxonomia dos ciliados ruminais.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo ¹evidenciar aspectos morfológicos dos protistas ciliados ruminais por meio da observação *in vivo*, preparações semipermanentes e microscopia eletrônica de varredura, ²caracterizar a infraciliatura pelo aperfeiçoamento da técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina, ³realizar avaliação morfométrica detalhada das populações de ciliados nestes ruminantes e, ⁴realizar inventário das espécies de protistas ciliados do rúmen de bovino e ovino alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta e análises

As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas na Fazenda Experimental da Embrapa – Gado de Leite), em Coronel Pacheco, MG e as análises desenvolvidas no Laboratório de Protozoologia e no Laboratório Avançado de Zoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

Coleta e Processamento das amostras

Foram coletadas amostras do conteúdo do rúmen de um bovino macho mestiço Holandês-Gir, pesando cerca de 450kg, e de uma ovelha Morada Nova, pesando cerca de 40kg, sendo ambos hospedeiros fistulados no rúmen e mantidos em instalações da Embrapa Gado de Leite. Os animais receberam dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar picada, suplementada com 1% de ureia, fornecida uma vez ao dia pela manhã. Água e mistura mineral foram fornecidas aos animais à vontade. O período experimental foi adequado conforme a disponibilidade dos animais, que para cada coleta, foram adaptados à dieta durante 12 dias. O bovino recebeu a dieta experimental durante os meses de agosto a setembro de 2011 e junho a julho de 2012, e o ovino durante os meses de junho a julho de 2011 e janeiro e fevereiro de 2012. Em cada animal foram realizadas cinco coletas por período (2011 e 2012), totalizando 10 coletas por hospedeiro.

As amostras de conteúdo ruminal de cada animal foram obtidas, via fístula ruminal, do centro da massa do rúmen, cerca de três horas após a alimentação, sendo o pH ruminal aferido imediatamente após a coleta, utilizando-se um medidor de pH digital portátil.

As amostras foram armazenadas em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levadas ao Laboratório de Protozoologia (UFJF). No laboratório, o conteúdo ruminal foi filtrado em duas camadas de gaze e colocado em tubos do tipo Falcon de 15 mL. A seguir, o material foi centrifugado a 1300 rpm durante 5 minutos, utilizando-se uma centrífuga sorológica de bancada, com intuito de separar os protistas do restante do conteúdo ruminal. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada amostra formado no interior do tubo foi destinado à análise dos ciliados *in vivo*, análise morfométrica, técnica de impregnação pela prata e microscopia eletrônica de varredura. Os fixadores usados para cada procedimento estão descritos nos tópicos seguintes. Todas as amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em recipientes plásticos identificados.

Técnicas de microscopia óptica e eletrônica

Observações *in vivo*

As amostras destinadas à observação *in vivo* dos ciliados foi encaminhada ao Laboratório Avançado de Zoologia (UFJF), no qual alíquotas de conteúdo ruminal foram analisadas entre lâmina e lamínula. As observações foram realizadas utilizando microscópio fotônico Olympus BX51 com contraste interferencial diferencial (DIC) contendo sistema de captura e análise de imagens (Image Pro-Plus 5.0). As fotomicrografias foram realizadas em aumento de 1000X, durante um período máximo de 12h após a coleta, devido ao caráter anaeróbio destes ciliados, os quais sofrem lise em contato com o oxigênio (WILLIAMS & COLLEMAN, 1992).

Técnicas semi-permanentes

Após a observação dos ciliados *in vivo*, alíquotas das amostras de conteúdo ruminal foram fixadas em formalina 18,5% (v/v) (DEHORITY, 1984) e lâminas semipermanentes foram preparadas utilizando solução de lugol (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) e verde brilhante (DEHORITY, 1984). Posteriormente, as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Olympus BX 51 com contraste interferencial diferencial. Essas preparações são importantes no estudo morfológico destes organismos visto que coram importantes caracteres, tais como placas esqueléticas e aparato nuclear.

Técnica de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina

A técnica de impregnação pelo carbonato de prata foi descrita por FERNANDEZ-GALEANO (1966) e posteriormente adaptada para o estudo dos ciliados ruminais da família Ophryoscolecidae (ITO & IMAI, 1998; 2006). No presente estudo esta técnica foi aprimorada, visando obter bons resultados de impregnação da infraciliatura oral e somática e do aparato nuclear para outras famílias de ciliados ruminais comumente observadas em bovinos e ovinos.

As amostras de conteúdo ruminal foram centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos e posteriormente fixadas em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984). Aproximadamente 3 gotas de cada amostra foram transferidas para dois tubos de ensaio, um para cada hospedeiro, contendo de 4mL de água destilada. Em seguida, em cada tubo, adicionaram-se 4 gotas de piridina P.A., 6 gotas de proteose peptona bacteriológica 4% e 40 gotas de solução de carbonato de prata amoniacal (FERNANDEZ-GALEANO, 1966). Neste momento, a solução torna-se branco-leite. Após a adição dos reagentes, os tubos foram incubados em banho-maria, em temperatura de 40°C por 30 minutos. Após alguns minutos de incubação, a solução torna-se marrom transparente, seguida de coloração marrom opaco. Posteriormente, alíquotas de cada tubo foram analisadas entre lâmina e lamínula e fotomicrografias feitas em microscópio fotônico Olympus BX51. O termo “policinécias” refere-se a bandas de infraciliatura compostas por cinécias numerosas, pequenas e paralelas (FERNANDEZ-GALEANO, 1979; ITO et al. 1997; ITO & IMAI, 1998, 2003).

Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura revela importantes características da morfologia externa de ciliados ruminais, tais como estriações na membrana, poros excretores, detalhes das ciliaturas oral e somática, lobos e espinhos na região posterior do corpo (FOISSNER,1991).

Alíquotas das amostras centrifugadas foram fixadas em uma mistura de 1mL de glutaraldeído 12%, 1mL de solução tampão cacodilato de sódio 0.2M (pH 7.2) e 2mL de tetróxido de ósmio a 2%, durante 30 minutos (SILVA-NETO,1994). Posteriormente, os ciliados foram triados em microscópio estereoscópio com auxílio de micropipetas de fabricação própria, concentrados em uma saleira e lavados com água destilada na própria saleira, para retirar o excesso de fixador. A seguir, os ciliados foram desidratados em série alcoólica 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%, durante 15 minutos cada, e secados pelo método do ponto crítico em CO₂ em aparelho Balzers CDP-20, usando tubos de vidro vedados

em rede de plâncton com malha de 15µm conforme proposto por SILVA-NETO et al. (2012). Posteriormente, os ciliados foram transferidos para suportes metálicos (stubs de 12mm de diâmetro) contendo fita adesiva dupla face e conduzido à metalização em aparelho Leica EM SCD050. As amostras metalizadas foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 250 no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As etapas do ponto crítico e metalização foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Identificação e morfometria dos ciliados

A identificação das espécies foi baseada em atlas de identificação (OGIMOTO & IMAI (1981) e artigos de revisão e caracterização morfológica de ciliados ruminais (WILLIAMS & COLEMAN (1992), DOGIEL (1927), KOFOID & MACLENNAN (1930, 1932), KOFOID & CHRISTENSON (1933), ITO et al (1992), IMAI et al (1993), GOÇMEN & ÖKTEM (1999), ITO & IMAI (2003, 2005), GOÇMEN & KARAOGLU (2005)).

Adotou-se terminologia sobre a posição anatômica dos ciliados conforme DOGIEL (1927). A região dorsal do ciliado se refere ao local onde se situa o macronúcleo e a região oposta é designada como ventral.

As subespécies apresentadas, previamente designadas como “forma” pela literatura consultada, foram reclassificadas conforme orientação do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ) – 4ª edição (01.01.2000). Segundo o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (2000), um novo nome publicado expressamente como "variedade" ou "forma" será considerado infra-subespecífico, se publicado depois de 1960, não tendo valor nomenclatural, ou subespecífico, se publicado antes de 1961. Desta forma, todas as espécies previamente designadas como “forma” foram consideradas subespécies no presente estudo.

A morfometria foi realizada a partir dos espécimes corados em solução de lugol (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999). Foram mensurados 20 indivíduos de cada espécie, no aumento de 1000X, em microscópio contendo contraste interferencial diferencial (DIC). Os caracteres mensurados foram: comprimento do corpo (CC), largura do corpo (LC), comprimento/largura do corpo (C/L), comprimento do macronúcleo (C_ma), largura do macronúcleo (L_ma), comprimento do macronúcleo/largura do macronúcleo (C_ma/L_ma), comprimento do macronúcleo/comprimento do corpo (C_ma/CC), distância do micronúcleo até a extremidade anterior do macronúcleo (D), distância do micronúcleo até a extremidade

anterior do macronúcleo/comprimento do macronúcleo (D/C_ma), comprimento de lobos e/ou espinhos na extremidade posterior do corpo e comprimento da placa esquelética (CP) e largura da placa esquelética (LP). Com intuito de ampliar a caracterização morfométrica das espécies que apresentam duas placas fundidas na região posterior, foram propostas as medidas dos seguintes parâmetros: comprimento do braço ventral e dorsal da placa, distância entre os braços, largura no ponto de fusão da placa e distância entre o ponto de fusão e a extremidade posterior da placa.

A estrutura denominada como “espinho” por outros autores (KOFOID & MACLENNAN, 1930; WILLIAMS & COLLEMAN, 1992) foi identificada como “espinho ventral 1” e “espinho ventral 2” para a espécie *Entodinium retangulatum retangulatum* Kofoid and MacLennan, 1930, no presente estudo, uma vez que esta espécie apresenta dois espinhos ventrais. O espinho situado no mesmo foco do espinho dorsal foi denominado de “espinho ventral 1” e aquele situado em foco diferente dos outros dois espinhos denominado “espinho ventral 2”.

Análise estatística

Os dados de estatística descritiva referentes ao estudo morfométrico foram calculados no programa Bioestat 5.0 (Anexo 1).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada a fim de verificar as variáveis que mais contribuíram na separação das espécies dos gêneros *Entodinium* Stein, 1859 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927. Das espécies encontradas em ambos os hospedeiros, foram apresentados os dados morfométricos daquelas encontradas em bovino. Foram utilizados somente parâmetros mensuráveis em todas as espécies analisadas. Os dados foram transformados em logaritmo decimal para homogeneizar as médias. Utilizou-se a análise de variância-covariância, uma vez que os dados apresentaram a mesma medida morfométrica (micrômetros). As análises foram realizadas utilizando os eixos que mais explicaram a variação dos dados, considerando que os autovalores encontrados aleatoriamente foram maiores que os valores de Broken-stick para o primeiro eixo. Os caracteres plotados no gráfico foram determinados por meio dos scores encontrados para os dois primeiros eixos, considerando o ponto de corte de 0.6. A PCA foi realizada usando-se o programa Pcord 5.0 e o gráfico plotado por meio do programa Statistica 7.

Também foi realizada análise combinatória de todos os caracteres mensurados para *Metadinium ypsilon* (Dogiel, 1925) e *Metadinium minorum* (Dehority, 1975), a fim de evidenciar quais caracteres eram suficientemente variáveis para a separação das espécies. Os

resultados foram plotados em gráficos de dispersão por meio do programa Microsoft Excel 2010. A seguir, os parâmetros que apresentaram separação das espécies evidenciada nos gráficos de dispersão, foram submetidos à análise de variância (Anova – 1 critério) para verificar se essa separação apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). A análise de variância foi realizada no programa BioStat 5.0.

RESULTADOS

Composição dos protistas ciliados em ruminantes domésticos

As 36 espécies identificadas em ambos os hospedeiros estão distribuídas nas ordens Vestibulifera e Entodiniomorphida (LYNN, 2008) (Tabela 2). Em Vestibulifera, registrou-se a ocorrência de ciliados da família Isotrichidae, com os gêneros *Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1888, ocorrendo em ambos hospedeiros. Para Entodiniomorphida registraram-se as famílias Blepharocorythidae, representada por um único gênero, *Charonina* Strand, 1928, e Ophryoscolecidae, como a família que apresentou maior riqueza (32 espécies). Os gêneros *Charonina* Strand, 1928; *Dasytricha*, *Diplodinium* Schuberg, 1888; *Entodinium*, *Eodinium* Kofoid and MacLennan, 1932; *Isotricha*, *Ostracodinium* e *Polyplastron* Dogiel, 1927 foram encontrados em ambos os hospedeiros. Além deles, o gênero *Eremoplastron* Kofoid and MacLennan, 1932 foi observado somente em bovino, enquanto *Diploplastron* Kofoid and MacLennan, 1932 e *Metadinium* Awerinzew et Mutafova, 1914 foram encontrados somente em ovino (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência dos protistas ciliados do rúmen observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Ordem/Família/Gênero/Espécie/Subespécie	Bovino Holandês-Gir	Ovino Morada Nova
Ordem Vestibulifera de Puytorac et al., 1974		
Isotrichidae Butschli, 1889		
<i>Dasytricha</i> Schuberg, 1888		
<i>Dasytricha ruminantium</i> Schuberg, 1888	+	+
<i>Isotricha</i> Stein, 1859		
<i>Isotricha intestinalis</i> Stein, 1858	-	+
<i>Isotricha prostoma</i> Stein, 1858	+	+
Ordem Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929		
Blepharocorithidae Hsiung, 1929		
<i>Charonina</i> Strand, 1928		
<i>Charonina ventriculi</i> Jameson, 1925	+	+
Ophryoscolecidae Stein, 1859		
<i>Entodinium</i> Stein, 1859		
<i>Entodinium alces</i> Dehority, 1974	+	-
<i>Entodinium biconcavum</i> Kofoid et MacLennan, 1930	+	-
<i>Entodinium bovis</i> Wertheim, 1935	+	+
<i>Entodinium caudatum lobospinosum</i> Dogiel, 1925	-	+
<i>Entodinium dubardi dubardi</i> Buisson, 1923	+	-
<i>Entodinium exiguum</i> Dogiel, 1925	+	-
<i>Entodinium longinucleatum longinucleatum</i> Dogiel, 1925	+	+
<i>Entodinium nanellum</i> Dogiel, 1923	-	+
<i>Entodinium ovinum</i> Dogiel, 1927	+	-
<i>Entodinium parvum parvum</i> Buisson, 1923	+	+
<i>Entodinium retangulatum retangulatum</i> Kofoid et MacLennan, 1930	+	-
<i>Entodinium rostratum</i> Fiorentini, 1889	+	+
<i>Entodinium simplex</i> (Dogiel, 1927)	-	+
<i>Diplodinium</i> Schuberg, 1888		
<i>Diplodinium anisacanthum</i> Da Cunha, 1914	+	+
<i>Diplodinium dentatum</i> (Stein, 1858)	+	+
<i>Diplodinium polygonale</i> Dogiel, 1925	+	-
<i>Diploplastron</i> Kofoid & MacLennan, 1932		
<i>Diploplastron affine</i> (Dogiel et Fedorowa, 1925)	-	+
<i>Eodinium</i> Kofoid & MacLennan, 1932		
<i>Eodinium posterovesiculatum monolobosum</i> Latteur 1970	+	+
<i>Eodinium posterovesiculatum bilobosum</i> Latteur 1970	+	-
<i>Eodinium posterovesiculatum lobatum</i> Latteur 1970	+	+
<i>Eodinium posterovesiculatum posterovesiculatum</i> Latteur 1970	-	+
<i>Eremoplastron</i> Kofoid & MacLennan, 1932		
<i>Eremoplastron rostratum</i> (Fiorentini, 1889)	+	-
<i>Ostracodinium</i> Dogiel, 1927		
<i>Ostracodinium trivesiculatum</i> Kofoid et MacLennan, 1932	+	+
<i>Ostracodinium dogieli</i> Dogiel, 1927	+	-
<i>Ostracodinium monolobum</i> Dogiel, 1927	+	-
<i>Ostracodinium rugoloricatum</i> Kofoid et MacLennan, 1932	+	+
<i>Ostracodinium clipeolum</i> Kofoid et MacLennan, 1932	+	+
<i>Ostracodinium gracile</i> (Dogiel, 1925)	+	+
<i>Ostracodinium mammosum</i> (Railliet, 1890)		+
<i>Polyplastron</i> Dogiel, 1927		
<i>Polyplastron multivesiculatum</i> (Dogiel et Fedorowa, 1925)	+	+
<i>Metadinium</i> Awerinzew & Mutafova, 1914		
<i>Metadinium minorum</i> Dehority, 1975	-	+
<i>Metadinium ypsilon</i> (Dogiel, 1925)	-	+

O símbolo (+) indica espécie presente e (-) indica espécie ausente no hospedeiro em estudo.

Aspectos gerais da morfologia de protistas ciliados em ruminantes domésticos

As espécies registradas para bovino e ovino alimentados com cana-de-açúcar é resultado do uso de várias técnicas ciliatólogicas, essenciais no estudo morfológico de diversos grupos de ciliados, tais como observações *in vivo*, técnicas de coloração, impregnação pela prata e microscopia eletrônica de varredura. Estas técnicas não são utilizadas em conjunto em inventários de ciliados do rúmen, sendo o presente estudo pioneiro neste aspecto.

As fotomicrografias dos ciliados *in vivo* de bovino e ovino estão apresentadas nas Pranchas I(a,b,c,e), II(d,e,g), III(a,d), IV(a,g), V(a,h), VI(a,g), VIII(a) e IX(a,e,i). Com as observações *in vivo* foi possível analisar caracteres poucos explorados em ciliados do rúmen, tais como: número e morfologia das zonas ciliares e número, posição e morfologia dos vacúolos contráteis. Essas características contribuem para a identificação específica dos ciliados, o que destaca a relevância da análise *in vivo* nos trabalhos com ciliados ruminais.

A forma e a posição do aparato nuclear são caracteres relevantes na identificação em nível específico dos protistas ruminais, sendo corados com êxito pela solução de verde brilhante [Pranchas I(c); II(e); III(g); IV(b); V(b); VI(c); IX(f)]. As placas esqueléticas, quando presentes, apresentaram ótima coloração utilizando solução de lugol [V(i); VI(h); VII(b,e); VIII(b); IX(b,j)], contribuindo para a identificação dos ciliados, uma vez que diferem especificamente em forma, número e posição.

A impregnação pela técnica de carbonato de prata foi aperfeiçoada no presente estudo, tendo sido aplicada com sucesso na observação do aparato nuclear, infraciliatura oral e infraciliatura somática de todos os gêneros de ciliados encontrados. Os detalhes da mudança no protocolo desta técnica serão apresentados na Seção 2.

Foram observados seis padrões de bandas de infraciliatura (ITO & IMAI, 2005; 2006) para os Ophryoscolecidae: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Diplodinium polygonale*, padrão-*Eodinium postero-vesiculatum*, padrão-*Ostracodinium gracile* e padrão-*Ostracodinium mammosum*.

O padrão-*Entodinium* é constituído por policinécias orais e cinécias parabolabiais [Prancha II(b,c)]. As policinécias orais são constituídas pela policinécia adoral, que se localiza ao redor do vestíbulo e pela policinécia vestibular que se encontra no interior do vestíbulo [Pranchas I(d,f,h,i); II (b,c,i,m)]. Desta forma, a policinécia vestibular se apresenta conforme a morfologia vestibular, o que varia para cada espécie do gênero *Entodinium*. As cinécias parabolabiais são compostas por quatro ou mais cinécias transversais, as quais se estendem ao

longo do lado ventral da policinécia adoral. Estão incluídas dentro deste padrão as espécies *E. biconcavum* [Prancha II(m)], *E. bovis* [Prancha II(k)], *E. caudatum* [Prancha II(i)], *E. exiguum* [Prancha II(f)] e *E. longinucleatum* [Prancha II(b,c)], cuja infraciliatura oral também foi registrada pela primeira vez por meio de fotomicrografias nestas espécies, visto que já havia sido apresentada por meio de desenhos.

A infraciliatura oral das espécies *E. dubardi dubardi* [Prancha I(h)], *E. retangulatum retangulatum* [Prancha I(i)], *E. alces* [Prancha I(f)] e *E. rostratum* [Prancha I(d)], foi descrita pela primeira vez no presente estudo e encontra-se em detalhe no tópico 1.

O padrão-*Diplodinium* é constituído das policinécias orais (adoral e vestibular), cinécias parabolais e uma banda acessória denominada policinécia dorsal. Além da presença de uma banda acessória, este padrão difere de *Entodinium* por apresentar a policinécia vestibular se estendendo pela parte interna da extremidade dorsal da policinécia adoral. Neste padrão destaca-se o primeiro registro em fotomicrografia para *Diplodinium anisacanthum* [Prancha V (e,g)], *Eremoplastron rostratum* [Prancha V(j)], *Polyplastron multivesiculatum* [Prancha VI(f)] e *Diploplastron affine* [Prancha VI(i)].

As espécies *Metadinium ypsilon* [Prancha VII (d,e,f,h)] e *Metadinium minorum* [Prancha VII (a,b,c,g)] foram incluídas no padrão-*Diplodinium*, cujo padrão de bandas de infraciliatura oral ainda não havia sido observado. A caracterização da infraciliatura oral destas espécies encontra-se em detalhe no tópico 3.

O padrão-*Diplodinium polygonale* apresenta morfologia única das bandas de infraciliatura, diferindo dos demais gêneros incluídos no padrão *Diplodinium*. A parte esquerda ventral da infraciliatura adoral é pequena e não se estende na abertura vestibular, formando um “C”. A infraciliatura vestibular é pequena e se estende para a esquerda ao longo da parede dorsal do vestíbulo a partir da extremidade dorsal da infraciliatura adoral. A infraciliatura dorsal se apresenta oblíqua ao longo do lado dorsal do corpo, sendo a parte direita se estendendo ventralmente além da parte esquerda.

No padrão-*Eodinium posterovesiculatum* foram observados a infraciliatura de *E. posterovesiculatum posterovesiculatum*, *E. posterovesiculatum monolobosum*, *E. posterovesiculatum bilobosum* e *E. posterovesiculatum lobatum* que são constituídas pelas policinécias adoral, vestibular, dorsal e cinécias parabolais.

O padrão-*Ostracodinium gracile* constitui-se de três infraciliaturas bucais, a policinécia adoral, vestibular e uma banda intermediária, a dorso-adoral (ITO & IMAI, 1998; ITO & IMAI, 2006). Além de *O. gracile*, estão inseridas neste padrão *O. dogieli* [Prancha IX(h)], *O. trivesiculatum* [Prancha IX(f)] e *O. monolobum* [Prancha IX(d)]. Essas espécies apresentam

outros caracteres morfológicos semelhantes, tais como forma do corpo, forma das placas esqueléticas, vestíbulo e citoprocto. Registra-se pela primeira vez a infraciliatura oral dessas espécies em fotomicrografia.

Destaca-se a inclusão no padrão-*Ostracodinium gracile*, da espécie *Ostracodinium clipeolum* (Prancha VIII) cujo padrão de bandas de infraciliatura oral ainda não havia sido descrito. A caracterização da infraciliatura oral desta espécie encontra-se em detalhe no tópico 2.

O padrão-*Ostracodinium mammosum* se diferencia do anterior pela presença de uma volta cinencial ligando a policinécia adoral a dorso-adoral. Além disso, a policinécia dorso-adoral tem a forma de uma gota e a vestibular é mais estreita que em *O. gracile* (ITO et al, 2001; ITO & IMAI, 2006). *O. mammosum* e *O. rugoloricatum*, ambas observadas no presente estudo, também estão inseridos neste padrão.

Quanto aos representantes das demais famílias evidenciadas, podemos destacar a infraciliatura somática e oral das espécies *Charonina ventriculi* [Prancha III(c)], *Isotricha prostoma* [Prancha IV(c-f)], *Isotricha intestinalis* [Prancha IV(i)] e *Dasytricha ruminantium* [Prancha III(j-l)] fazendo-se, no presente estudo, o primeiro registro em fotomicrografia para *Charonina ventriculi* e o primeiro registro da impregnação do aparato nuclear pela técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina na família Isotrichidae.

O emprego da microscopia eletrônica de varredura contribuiu para a caracterização específica dos ciliados ruminais, uma vez que evidenciou estruturas superficiais, não observáveis em microscopia ótica. Evidenciaram-se as projeções caudais [Pranchas I(j,e); V(d,f); VIII(h-j); IV(c,g)], citoprocto [Pranchas I(l); VI(e); IX (k)], ciliatura somática [Prancha III(h)] e ciliatura restrita a zona adoral [Pranchas I(j,k); II(h)] e dorsal [Prancha VI (d,e)].

Com a utilização das diversas técnicas ciliatológicas que possibilitaram a observação de uma gama de caracteres morfológicos, a caracterização morfométrica foi ampliada no presente estudo (Anexo 1, 2 e 3). Caracteres de importância taxonômica já destacados na literatura para cada espécie foram mensurados e novos caracteres ainda não utilizados foram acrescentados, visando melhorar a caracterização específica dos ciliados (Anexo 1, 2 e 3). Para os gêneros *Charonina*, *Entodinium*, *Ostracodinium*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Eremoplastron* e *Polyplastron*, caracteres envolvendo o aparato nuclear, as placas esqueléticas e as projeções caudais foram acrescentados à morfometria das espécies (Anexo 1, 2 e 3).

O estudo da morfologia, morfometria e as novas descrições da infraciliatura oral dos gêneros *Entodinium*, *Ostracodinium* e *Metadinium* serão abordados em detalhe nos tópicos 1, 2 e 3.

4- *Entodinium*: morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral

Morfologia geral de *Entodinium dubardi dubardi* (Prancha I(g-h)): O corpo tem formato elipsoide (C/L: 1.07-1.81 μ) e o macronúcleo é alongado, sendo as extremidades mais dilatadas que a região mediana (C_ma: 14.22-30.3 μ ; L_ma: 2.45-9.45 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se acima do macronúcleo. A região posterior apresenta-se arredondada, sem processos caudais e o citoprocto está voltado para a região dorsal.

Morfologia geral de *Entodinium retangulatum retangulatum* (Prancha I(i-l)): O corpo tem formato retangular (C/L: 1.24-2.14 μ) e o macronúcleo é alongado (C_ma: 18.93-36.25 μ ; L_ma: 3.84-7.99 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se no centro superior da extremidade anterior do corpo. A região posterior do corpo apresenta três espinhos, sendo dois ventrais e um dorsal.

Morfologia geral de *Entodinium longinucleatum longinucleatum* (Prancha II(a-c-)): O corpo tem formato ovoide e a parte anterior é dilatada (C/L: 1.10-1.52 μ). O macronúcleo é longo, se estendendo ao longo do lado dorsal do corpo, iniciando-se na região oral e terminando no citoprocto (C_ma: 40.53-59.99 μ ; C_la: 3.62-9.37 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se anteriormente ao micronúcleo e ventralmente ao macronúcleo. O citoprocto está voltado para a região ventral do corpo.

Morfologia geral de *Entodinium alces* (Prancha I(e-f)): O formato do corpo é ovoide (C/L: 1.23-1.93 μ). O macronúcleo é alongado, sendo a extremidade anterior dobrada para a região dorsal (C_ma: 16.81-30.28 μ ; L_ma: 3.71-9.07 μ). A região posterior do corpo apresenta dois lobos triangulares e o citoprocto está na região central posterior do corpo. Único vacúolo contrátil localiza-se ventralmente ao macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium parvum parvum*: O formato do corpo é retangular (C/L: 1.46-2.06 μ) e o macronúcleo é alongado (C_ma: 12.73-28.92 μ ; L_ma: 3.21-5.86 μ). A região posterior do corpo é arredondada, sendo o citoprocto voltado para a região ventral do corpo. Único vacúolo localiza-se acima do macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium ovinum*: O corpo é ovoide (C/L: 1.27-2.08 μ). O macronúcleo é alongado, se estendendo por mais de dois terços do comprimento do corpo (C_ma: 17.15-40.64 μ ; L_ma: 4.00-7.69 μ). A região posterior do corpo é arredondada, sendo o citoprocto voltado para o lado ventral do corpo. Único vacúolo contrátil localiza-se na região anterior, ventralmente ao macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium rostratum* (Prancha I(a-d)): O corpo é alongado e assimétrico (C/L: 1.51-2.16 μ), sendo a superfície ventral côncava e a superfície dorsal convexa. O macronúcleo é alongado (C_ma: 15.35-34.42 μ ; L_ma: 3.41-6.5 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se anterior ao macronúcleo. A região posterior do corpo apresenta um longo espinho ventral.

Morfologia geral de *Entodinium bovis* (Prancha II(g-k)): O corpo tem formato esférico (C/L: 0.90-1.45 μ) e não apresenta processos caudais. O macronúcleo tem forma de clava (C_ma: 8.83-21.04 μ ; L_ma: 2.52-8.28 μ) e o citoprocto está localizado na região central posterior do corpo. Único vacúolo contrátil localiza-se anteriormente ao macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium exiguum* (Prancha II(d-f)): O corpo tem formato elipsoide (C/L: 1.24-1.78 μ) e a região posterior é arredondada, sem processos caudais. O citoprocto localiza-se na região ventral. O macronúcleo é pequeno e fino (C_ma: 10.43-21.49 μ ; L_ma: 2.13-8.11 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se na metade anterior ventral do macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium biconcavum* (Prancha II(l-m)): O corpo é ovoide (C/L: 1.20-1.67 μ) e o macronúcleo é alongado se estendendo até a metade do comprimento do corpo (C_ma: 15.25-33.87 μ ; L_ma: 3.19-9.33 μ). A região posterior do corpo apresenta um lobo ventral e o citoprocto encontra-se voltado para a região ventral do corpo. Único vacúolo contrátil localiza-se no terço anterior do macronúcleo, logo acima do micronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium caudatum lobospinosum* (Prancha II(g-i)): O corpo é elipsoide (C/L: 1.09-2.08 μ) e o macronúcleo alongado, sendo a extremidade anterior mais dilatada que a extremidade posterior (C_ma: 11.57-28.98 μ ; L_ma: 2.88-7.15 μ). A extremidade posterior do corpo apresenta um espinho dorsal e um lobo ventral. Único vacúolo contrátil localiza-se próximo a extremidade anterior do macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium simplex*: O corpo é elipsoide (C/L: 1.37-2.75 μ) e a extremidade posterior é arredondada, sem processos caudais. O citoprocto está voltado para a região ventral do corpo. O macronúcleo é um estreito triângulo com a extremidade anterior ampla e se estende até um terço do comprimento do corpo (C_ma: 14.08-31.46 μ ; L_ma: 2.66-26.44 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se na metade anterior ventral do macronúcleo.

Morfologia geral de *Entodinium nanellum*: O corpo é alongado e pequeno (C/L: 0.99-1.86 μ), sendo a extremidade posterior arredondada sem processos caudais. O citoprocto está voltado para a região ventral do corpo. O macronúcleo é fino e se estende até um terço do comprimento do corpo (C_ma: 9.81-21.23 μ ; L_ma: 2.39-5.87 μ). Único vacúolo contrátil localiza-se na extremidade anterior ventral do macronúcleo.

Morfometria das espécies de *Entodinium* encontradas em ruminantes domésticos

De acordo com os resultados da PCA para as 13 espécies de *Entodinium*, os dois primeiros eixos explicaram 92.9% da variação total entre os caracteres. O primeiro componente explicou 85,9% da variação total, o segundo 6,9% (Tabela 3).

Tabela 3. Autovetores da análise de componentes principais para os nove caracteres morfométricos medidos e seus respectivos autovalores e porcentagem de explicação.

	CP1	CP2
CC	-0.0405	0.00879
LC	-0.04088	0.07415
C_ma	-0.06588	-0.01305
L_ma	-0.01317	0.03335
D	-0.04762	0.00523
D/C_ma	0.02062	0.01785
C/L	0.0009	-0.06399
C_ma/CC	-0.02542	-0.02075
C_ma/L_ma	-0.05173	-0.04595
Autovalor	0.81	0.065
Porcentagem	85.991	6.931

As medidas morfométricas dos lobos e espinhos não foram incluídas na análise, pois não são caracteres presentes na totalidade das espécies e assim mascararam a análise dos demais parâmetros. Nenhum parâmetro foi descartado da análise, de acordo com os valores de “loading” das variáveis para cada eixo, considerando o ponto de corte de 0.6. Desta forma, todos os parâmetros analisados foram plotados no gráfico de análise de componentes principais (Gráfico 1).

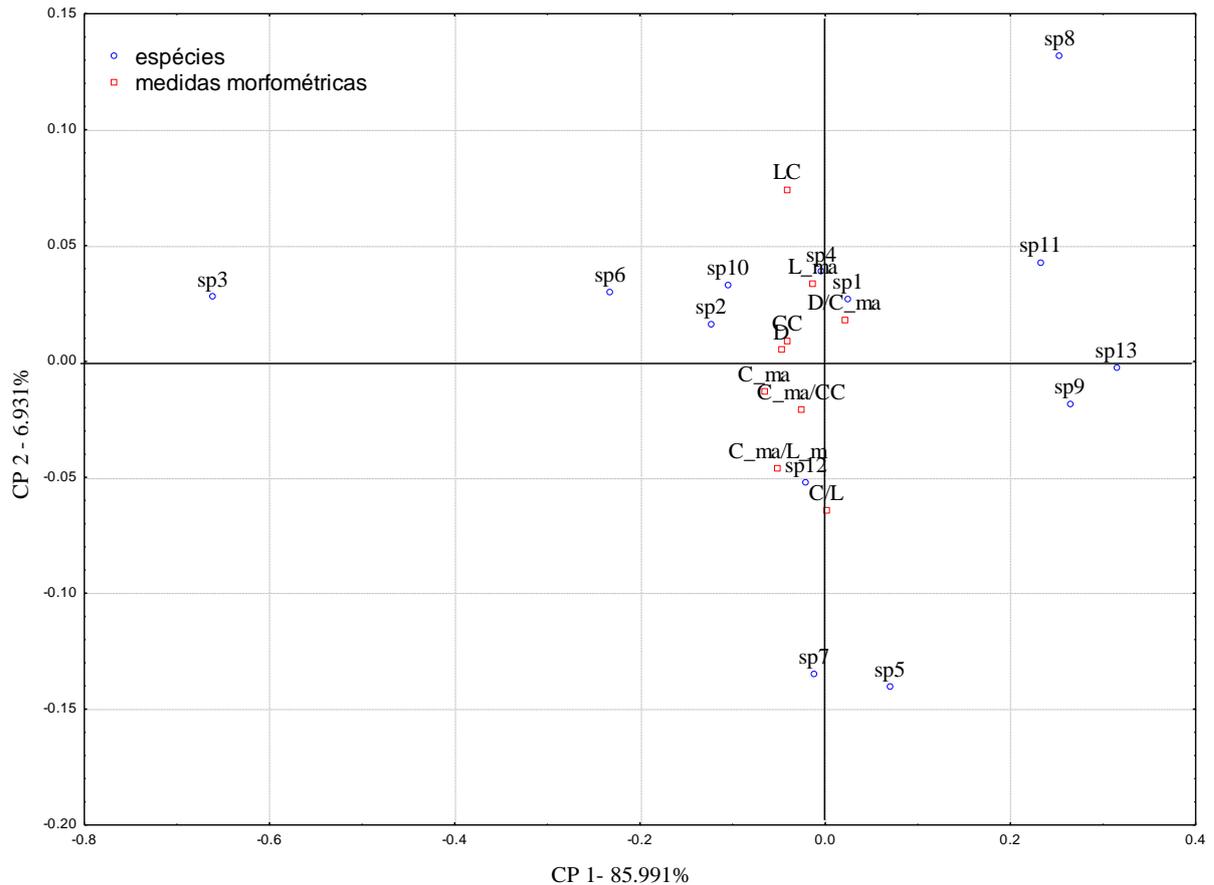


Gráfico 1. Projeção dos escores das 13 espécies do gênero *Entodinium* no espaço dos dois primeiros componentes principais (**sp1**: *E. dubardi dubardi*; **sp2**: *E. reticulatum reticulatum*; **sp3**: *E. longinucleatum*; **sp4**: *E. alces*; **sp5**: *E. parvum*; **sp6**: *E. ovinum*; **sp7**: *E. rostratum*; **sp8**: *E. bovis*; **sp9**: *E. exiguum*; **sp10**: *E. biconcavum*; **sp11**: *E. caudatum*; **sp12**: *E. simplex*; **sp13**: *E. nanellum*; **CC**: comprimento do corpo; **LC**: largura do corpo; **C_ma**: comprimento do macronúcleo; **L_ma**: largura do macronúcleo; **D**: distância entre o micronúcleo e a extremidade anterior do macronúcleo; **D/C_ma**: distância/comprimento do macronúcleo; **C/L**: comprimento do corpo/largura do corpo; **C_ma/CC**: comprimento do macronúcleo/comprimento do corpo; **C_ma/L_ma**: comprimento do macronúcleo/largura do macronúcleo).

A relação dos escores de cada espécie e parâmetro com os dois primeiros componentes evidenciou que a variável que mais contribuiu para a diferenciação das espécies (Tabela 3 e 4) no primeiro componente foi o comprimento do macronúcleo. Ainda, somente *E. retangulatum* e *E. biconcavum* foram mais correlacionados com tal parâmetro (Gráfico 1). Desta forma, fica evidenciada a importância de se mensurar tal parâmetro para estas espécies. Quanto às espécies relacionadas ao segundo componente, somente *E. dubardi*, *E. alces* e *E. simplex* apresentaram proximidade com os parâmetros, sendo eles: largura do corpo, comprimento/largura e largura do macronúcleo (Gráfico 1). As demais espécies não apresentaram correlação com nenhum parâmetro morfométrico analisado.

Tabela 4. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies do gênero *Entodinium* observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo	Largura Macronúcleo	Comprimento corpo/Largura do corpo
<i>E. alces</i>	39,79 \pm 5,22 (30,93-55,11)	27,18 \pm 3,77 (19,61-33,05)	21,78 \pm 3,20 (16,81-30,28)	5,91 \pm 1,49 (3,71-9,07)	1,48 \pm 0,19 (1,23-1,93)
<i>E. biconcavum</i>	43,46 \pm 4,72 (32,62-52,37)	30,11 \pm 3,39 (23,21-38,34)	24,14 \pm 6,35 (15,25-33,87)	5,64 \pm 1,47 (3,19-9,33)	1,45 \pm 0,11 (1,20-1,67)
<i>E. bovis</i>	32,70 \pm 4,77 (23,15-40,56)	26,48 \pm 4,53 (7,46-33,65)	14,78 \pm 3,62 (8,83-21,04)	5,37 \pm 1,54 (2,52-8,28)	1,25 \pm 0,14 (0,90-1,45)
<i>E. caudatum lobosospinosum</i>	30,23 \pm 7,14 (22,76-55,71)	22,17 \pm 4,03 (16,16-36,61)	15,88 \pm 4,35 (11,57-28,98)	5,22 \pm 1,09 (2,88-7,15)	1,37 \pm 0,22 (1,09-2,08)
<i>E. dubardi dubardi</i>	36,83 \pm 6,45 (24,79-48,67)	26,99 \pm 4,84 (17,18-36,09)	20,60 \pm 3,95 (14,22-30,3)	5,36 \pm 1,73 (2,45-9,45)	1,38 \pm 0,17 (1,07-1,81)
<i>E. exiguum</i>	30,25 \pm 4,72 (24,31-39,59)	20,68 \pm 3,72 (14,24-27,71)	15,39 \pm 3,24 (10,43-21,49)	5,11 \pm 1,50 (2,13-8,11)	1,47 \pm 0,13 (1,24-1,78)
<i>E. longinucleatum longinucleatum</i>	57,67 \pm 9,46 (47,52-89,35)	46,23 \pm 8,27 (38,85-77,07)	49,19 \pm 5,55 (40,53-59,99)	6,02 \pm 1,44 (3,62-9,37)	1,25 \pm 0,11 (1,10-1,52)
<i>E. nanellum</i>	26,03 \pm 3,46 (20,04-32,80)	20,18 \pm 4,33 (13,35-32,53)	13,72 \pm 3,15 (9,81-21,23)	4,28 \pm 1,06 (2,39-5,87)	1,32 \pm 0,23 (0,99-1,86)
<i>E. ovinum</i>	49,43 \pm 6,20 (39,12-60,47)	32,85 \pm 4,74 (19,39-41,29)	28,16 \pm 7,26 (17,15-40,64)	5,68 \pm 1,03 (4,00-7,69)	1,52 \pm 0,19 (1,27-2,08)
<i>E. parvum parvum</i>	39,30 \pm 6,27 (29,21-43,78)	20,88 \pm 3,07 (17,53-27,50)	20,28 \pm 4,79 (12,73-28,92)	4,52 \pm 0,86 (3,21-5,86)	1,71 \pm 0,13 (1,46-2,06)
<i>E. retangulatum retangulatum</i>	43,22 \pm 4,14 (37,19-51,46)	29,45 \pm 3,44 (22,76-35,20)	25,63 \pm 4,87 (18,93-36,25)	5,83 \pm 1,11 (3,84-7,99)	1,48 \pm 0,20 (1,24-2,14)
<i>E. rostratum</i>	39,30 \pm 6,27 (29,65-51,68)	21,64 \pm 2,50 (15,70-26,61)	22,52 \pm 5,16 (15,35-34,42)	4,87 \pm 0,87 (3,41-6,5)	1,82 \pm 0,18 (1,51-2,16)
<i>E. simplex</i>	35,65 \pm 5,63 (28,08-51,29)	23,14 \pm 2,95 (17,77-31,46)	21,91 \pm 5,55 (14,08-31,46)	6,09 \pm 5,04 (2,66-26,44)	1,54 \pm 0,67 (1,37-2,75)

Descrição da infraciliatura oral de *E. dubardi dubardi*; *E. retangulatum retangulatum*; *E. alces* e *E. rostratum*

Foram caracterizadas pela primeira vez no presente estudo, as infraciliaturas orais de *Entodinium dubardi dubardi* (Prancha I(h)) , *E. retangulatum retangulatum* (Prancha I(i)), *E. alces* (Prancha I(f)) e *E. rostratum* (Prancha I(d)) , as quais seguem o padrão-*Entodinium*. Essas espécies apresentam policinécias bucais, compostas por policinécias adoral e vestibular e cinécias paralabiais, localizadas na zona adoral de ciliatura. A policinécia adoral em forma de “C” circunda a abertura vestibular. A policinécia vestibular se estende para dentro do vestíbulo pelo lado dorsal da policinécia adoral e se encerra, em *E. dubardi dubardi* e *E. rostratum* no terço anterior do macronúcleo e, em *E. alces* e *E. retangulatum retangulatum*, até a metade do macronúcleo. As cinécias paralabiais são compostas por quatro cinécias transversais em todas as espécies, as quais se estendem ao longo do lado ventral da policinécia adoral.

5- *Ostracodinium*: morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral

Morfologia geral de *Ostracodinium trivesiculatum* (Prancha XIX(i-l)): O corpo é elipsoide a triangular (C/L: 1.48-2.03 μ). A extremidade posterior é arredondada sem processos caudais. O macronúcleo é alongado com uma pequena depressão na região mediana (C_ma: 51.83-65.45 μ ; L_ma: 7.64-16.28 μ). Três vacúolos contráteis se situam no lado dorsal do macronúcleo, sendo um anterior ao micronúcleo, um posterior a ele e o último posterior ao macronúcleo. Uma placa esquelética única se estende lateralmente do macronúcleo até a região ventral do corpo (CP: 49.64-115.08 μ ; LP: 38.87-61.67 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium dogieli* (Prancha XIX(e-h)): O corpo é elipsoide (C/L: 1.33-1.69 μ) e apresenta um lobo ventral em formato de escudo na região posterior do corpo. O macronúcleo apresenta dois lobos dorsais, um anterior e um mediano (C_ma: 51.06-93.51 μ ; L_ma: 6.68-16.42 μ). Dois vacúolos contráteis localizam-se na região dorsal do macronúcleo. Uma única placa esquelética se estende lateralmente do macronúcleo até a região ventral do corpo (CP: 55.18-98.24 μ ; LP: 37.60-67.25 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium mammosum*: O corpo é elipsoide a retangular e relativamente pequeno (C/L: 1.26-2.23 μ). A extremidade posterior do corpo apresenta dois

lobos, um na região dorsal e um na região ventral. O macronúcleo é alongado com uma grande depressão na região mediana (C_{ma}: 35.79-78.12 μ ; L_{ma}: 5.25-14.45 μ). Três vacúolos contráteis se apresentam na região dorsal do macronúcleo, o vacúolo anterior se localiza próximo à extremidade anterior do macronúcleo, o vacúolo mediano encontra-se anterior ao micronúcleo e o último vacúolo se situa próximo à extremidade posterior do macronúcleo. Uma única placa esquelética se estende lateralmente da extremidade anterior do macronúcleo até o lado ventral do corpo e posteriormente até a base dos lobos caudais (CP: 26.59-59.11 μ ; LP: 27.45-40.90 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium clipeolum* (Prancha VIII): O corpo é elipsoide (C/L: 0.18-1.81 μ) e apresenta um lobo ventral arredondado e achatado na extremidade posterior. O macronúcleo possui dois lobos dorsais (C_{ma}: 44.22-89.54; L_{ma}: 6.15-14.56). Três vacúolos contráteis estão presentes na região dorsal do macronúcleo, sendo os dois primeiros vacúolos situados na primeira depressão do macronúcleo e o terceiro vacúolo, na segunda depressão. Uma única placa esquelética se estende lateralmente do macronúcleo até o lado ventral do corpo (CP: 46.63-97.00 μ ; LP: 39.75-64.52 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium rugoloricatum*: O corpo é retangular (C/L: 1.31-1.72 μ) e apresenta um lobo ventral dilatado na região posterior. O macronúcleo é alongado (C_{ma}: 49.84-93.45 μ ; L_{ma}: 5.05-17.59 μ). Três vacúolos contráteis se localizam na região dorsal do macronúcleo, o primeiro no nível da extremidade anterior do macronúcleo, o segundo logo atrás do micronúcleo e o terceiro próximo da extremidade posterior do macronúcleo. Uma única placa esquelética se estende lateralmente do macronúcleo até o lado ventral do corpo e posteriormente até a região mediana do corpo (CP: 61.35-86.92 μ ; LP: 37.62-63.43 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium monolobum* (Prancha XIX(a-d)): O corpo é retangular (CL: 1.34-2.03 μ) e a região posterior apresenta um grande lobo ventral. O macronúcleo é alongado e cinco vacúolos contráteis situam-se em sua região dorsal (C_{ma}: 55.81-88.01 μ ; L_{ma}: 7.55-15.60 μ). Uma única placa esquelética se estende até dois terços do lado dorsal do corpo (CP: 43.79-92.67 μ ; LP: 38.50-64.12 μ).

Morfologia geral de *Ostracodinium gracile*: O corpo é triangular e a extremidade posterior arredondada sem processos caudais (CP: 1.48-2.03 μ). O macronúcleo é alongado

com duas depressões ao longo do lado dorsal (C_ma: 51.83-65.45 μ ; L_ma: 7.64-16.28 μ). Dois vacúolos contráteis ocorrem nas depressões do macronúcleo. Uma única placa esquelética se estende lateralmente do macronúcleo até o lado ventral do corpo e posteriormente até a extremidade posterior do macronúcleo (CP: 53.07-74.11 μ ; LP: 29.55-41.01 μ).

Morfometria das espécies de *Ostracodinium* encontradas em ruminantes domésticos

Para as 07 espécies de *Ostracodinium*, os dois primeiros eixos da PCA explicaram 94.1% da variação total entre os caracteres. O primeiro componente explicou 84.4% da variação total e o segundo 9.7% (Tabela 5).

Tabela 5. Autovetores da análise de componentes principais para os 11 caracteres morfométricos medidos e seus respectivos autovalores e porcentagem de explicação.

	CP1	CP2
CC	-0.04328	-0.02372
LC	-0.04218	-0.00972
C_ma	-0.03696	-0.00596
L_ma	-0.02758	0.01588
D	-0.05344	0.00494
D/C_ma	-0.0164	0.01132
C/L	-0.00045	-0.01474
C_ma/CC	0.00037	0.10818
C_ma/L_ma	-0.00842	-0.0257
CP	-0.0575	0.00907
LP	-0.04047	0.01261
Autovalor	0.223	0.026
Porcentagem	84.473	9.714

As medidas morfométricas dos lobos também não foram incluídas na análise, pois não são caracteres presentes na totalidade das espécies, podendo mascarar a análise dos demais parâmetros.

O parâmetro comprimento do macronúcleo/largura do macronúcleo foi descartado da análise, de acordo com os valores de “loading” deste parâmetro para cada eixo, considerando-se o ponto de corte de 0.6. Desta forma, tal parâmetro não foi plotado no gráfico de análise de componentes principais (Gráfico 2), o que comprova que não é significativa sua mensuração na caracterização específica das espécies em questão.

A relação dos escores de cada espécie e parâmetro com os dois primeiros eixos evidenciou-se que *O. clipeolum* apresentou correlação próxima somente com os índices comprimento do corpo/largura do corpo e comprimento do macronúcleo/comprimento do corpo. Já *O. trivesiculatum* e *O. rugoloricatum* foram correlacionados proximamente com o comprimento do corpo e com a distância entre o micronúcleo e a extremidade anterior do macronúcleo. *O. gracile* foi a espécie que mais se relacionou com os parâmetros morfométricos, apresentando proximidade com o comprimento e largura do corpo, o comprimento do macronúcleo e a largura da placa. Os demais parâmetros analisados não foram correlacionados a nenhuma espécie, o que sugere o descarte dos mesmos da avaliação morfométrica.

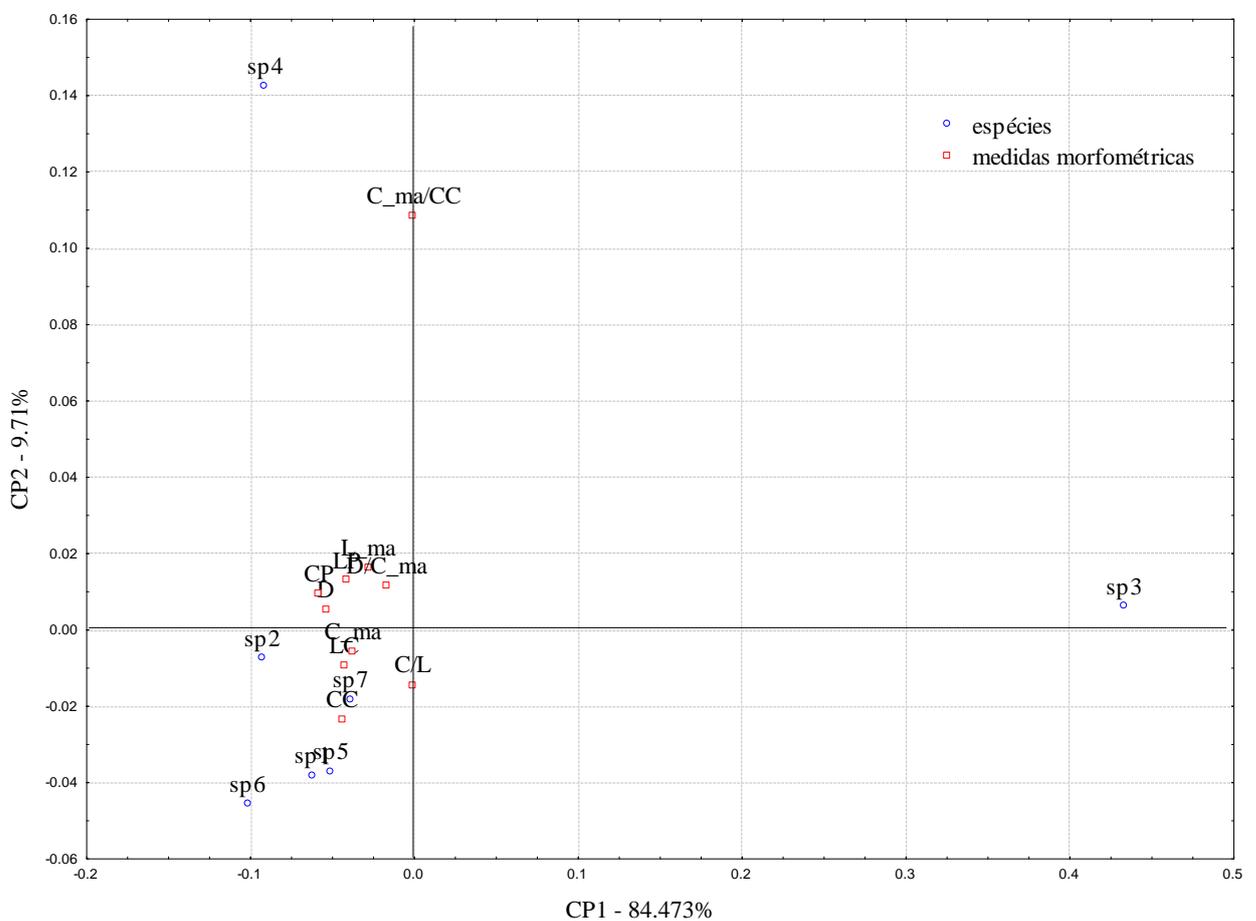


Gráfico 2. Projeção dos escores das sete espécies do gênero *Ostracodinium* no espaço dos dois primeiros componentes principais (**sp1**: *O. trivesiculatum*; **sp2**: *O. dogieli*; **sp3**: *O. mammosum*; **sp4**: *O. clipeolum*; **sp5**: *O. rugoloricatum*; **sp6**: *O. monolobum*; **sp7**: *O. gracile*; **CC**: comprimento do corpo; **LC**: largura do corpo; **C_ma**: comprimento do macronúcleo; **L_ma**: largura do macronúcleo; **D**: distância entre o micronúcleo e a extremidade anterior do macronúcleo; **D/C_ma**: distância/comprimento do macronúcleo; **C/L**: comprimento do corpo/largura do corpo; **C_ma/CC**: comprimento do macronúcleo/comprimento do corpo; **CP**: comprimento da placa esquelética; **LP**: largura da placa esquelética).

Descrição da infraciliatura oral de *O. clipeolum*

Foram caracterizadas pela primeira vez no presente estudo, as infraciliaturas orais de *Ostracodinium clipeolum*, as quais seguem o padrão-*Ostracodinium gracile*. Este padrão é constituído por policinécias bucais, compostas por policinécias adoral, dorso-adoral e vestibular, policinécia dorsal e cinécias paralabiais.

A policinécia adoral estende-se além da circunferência da abertura vestibular, sendo que a extremidade esquerda curva-se na região posterior, enquanto a extremidade direita curva-se para a região anterior. A policinécia dorso-adoral se estende lateralmente ao longo do lado dorsal da abertura vestibular. A policinécia vestibular se estende para o interior do vestíbulo até o nível do terço anterior do macronúcleo. Se observada da esquerda para direita, a policinécia vestibular apresenta a forma de um “S”. A policinécia dorsal estende-se lateralmente ao longo do lado dorsal do corpo, sendo que a extremidade esquerda se estende mais ventralmente que a extremidade direita. A parte direita da policinécia dorsal não se estende entre as placas esqueléticas e a membrana. As cinécias paralabiais são constituídas por quatro cinécias transversais ao longo do lado ventral da policinécia adoral (Prancha VIIIc,g).

Tabela 6. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies do gênero *Ostracodinium* observadas em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo	Distância entre Micronúcleo e a extremidade anterior do Macronúcleo	Comprimento corpo/ Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo/ Comprimento Corpo	Comprimento total da placa	Largura da Placa
<i>O. trivesiculatum</i>	101,07 \pm 11,08 (80,26-127,22)	63,89 \pm 10,12 (47,26-83,67)	67,89 \pm 10,07 (49,37-90,06)	30,93 \pm 7,19 (17,44-43,64)	1,60 \pm 0,19 (1,30-2,01)	0,67 \pm 0,06 (0,53-0,78)	71,57 \pm 14,46 (49,64-115,08)	48,17 \pm 6,51 (38,87-61,67)
<i>O. dogieli</i>	100,50 \pm 11,74 (81,34-119,63)	65,40 \pm 5,76 (55,87-76,92)	70,36 \pm 11,45 (51,06-93,51)	30,87 \pm 6,89 (19,67-48,20)	1,53 \pm 0,09 (1,33-1,69)	0,70 \pm 0,07 (0,56-0,84)	76,01 \pm 13,10 (55,18-98,24)	50,76 \pm 7,06 (37,60-67,25)
<i>O. mammosum</i>	65,15 \pm 8,31 (52,93-84,70)	43,37 \pm 5,88 (29,60-57,72)	47,91 \pm 9,38 (35,79-78,12)	17,59 \pm 4,39 (10,41-23,28)	1,52 \pm 0,21 (1,26-2,23)	0,74 \pm 0,12 (0,58-1,13)	41,75 \pm 8,47 (26,59-59,11)	34,24 \pm 3,90 (27,45-40,90)
<i>O. clipeolum</i>	95,54 \pm 12,12 (76,74-119,97)	65,31 \pm 8,10 (48,06-82,66)	68,87 \pm 11,05 (44,22-89,54)	30,73 \pm 6,43 (18,75-40,43)	1,47 \pm 0,33 (0,18-1,81)	0,99 \pm 1,37 (0,54-0,80)	76,89 \pm 11,95 (46,63-97,00)	53,73 \pm 7,22 (39,75-64,52)
<i>O. rugoloricatum</i>	100,12 \pm 11,93 (73,58-116,80)	65,91 \pm 7,78 (48,74-80,46)	70,42 \pm 11,63 (49,84-93,45)	28,16 \pm 6,01 (19,20-45,14)	1,52 \pm 0,11 (1,31-1,72)	0,70 \pm 0,05 (0,61-0,82)	72,35 \pm 7,60 (61,35-86,92)	50,72 \pm 6,90 (37,62-63,43)
<i>O. monolobum</i>	106,79 \pm 11,33 (86,26-128,66)	71,18 \pm 11,13 (48,56-95,52)	71,44 \pm 10,63 (55,81-88,01)	29,07 \pm 5,57 (18,04-39,16)	1,52 \pm 0,19 (1,34-2,03)	0,67 \pm 0,07 (0,55-0,77)	75,65 \pm 13,79 (43,79-92,67)	52,59 \pm 5,48 (38,50-64,12)
<i>O. gracile</i>	96,68 \pm 8,34 (74,29-122,56)	56,99 \pm 8,92 (45,09-68,18)	57,69 \pm 4,99 (51,83-65,45)	26,95 \pm 3,15 (24,24-32,01)	1,66 \pm 0,21 (1,48-2,03)	0,62 \pm 0,08 (0,53-0,72)	61,68 \pm 9,87 (53,07-74,11)	35,07 \pm 4,49 (29,55-41,01)

3 - *Metadinium*: morfologia, morfometria e descrição da infraciliatura oral

Morfologia geral de *Metadinium minorum* (Prancha VII (a-c; g)): O corpo é elipsoide a retangular (C/L: 1,29-1,79 μ). O macronúcleo é longo e fino, apresentando um único lobo posterior (C_ma: 38,96-76,58 μ ; L_ma: 7,46-19,70 μ). Dois vacúolos contráteis situam-se na região dorsal da depressão anterior do macronúcleo. O micronúcleo é elipsoide localizado logo após o vacúolo anterior. Duas placas esqueléticas são fundidas posteriormente em forma de “Y”, na altura do micronúcleo, sendo a largura no ponto de fusão medindo 12,73-26,65 μ . A extremidade posterior é arredondada sem processos caudais.

Morfologia geral de *Metadinium ypsilon* (Prancha VII(d-f; h)): O corpo é ovoide (C/L: 1,06-1,73 μ). O macronúcleo é longo e estreito, apresentando dois lobos, lembrando um “F”, quando visualizado no lado ventral (C_ma: 37,87-92,30 μ ; L_ma: 7,46-19,70 μ). Dois vacúolos se situam na região dorsal do macronúcleo, situados em cada depressão. O micronúcleo é elipsoide, localizado após o vacúolo anterior. Duas placas esqueléticas são fundidas posteriormente em forma de “Y”, na altura do micronúcleo, sendo a largura no ponto de fusão medindo 14,89-28,77 μ . A extremidade posterior é arredondada sem processos caudais.

Morfometria das espécies de *Metadinium* encontradas em ruminantes domésticos

De acordo com a análise de dispersão realizada para os dados morfométricos das espécies *Metadinium ypsilon* e *Metadinium minorum*, foi possível observar que alguns caracteres apresentaram variabilidade suficiente para separar as duas espécies. Estes caracteres estão relacionados às medidas do corpo, macronúcleo e placas esqueléticas (Anexo 3). No entanto, a análise de variância detectou dentre estes caracteres que somente o comprimento do braço ventral da placa ($p=0,0010$), o comprimento do braço dorsal da placa ($p=0,0012$), a largura no ponto de fusão ($p=0,0014$) e a razão comprimento/largura ($p=0,0096$) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) para as duas espécies analisadas (Tabela 7). Esta análise comprova a importância de se utilizar a medida destes parâmetros na identificação específica destas duas espécies.

Tabela 7. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, n=20*) de espécies do gênero *Metadinium* observadas em ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do corpo	Comprimento corpo/ Largura do corpo	Comprimento do braço ventral da placa	Comprimento do braço dorsal da placa	Largura no ponto de fusão das placas
<i>M. ypsilon</i>	86,81 \pm 13,77 (60,08-122,13)	64,86 \pm 9,45 (55,06-88,24)	1,34 \pm 0,16 (1,06-1,73)	23,23 \pm 5,81 (14,29-32,97)	23,31 \pm 5,69 (13,03-31,73)	22,89 \pm 3,73 (14,89-28,77)
<i>M. minorum</i>	89,33 \pm 8,14 (73,06-101,58)	61,21 \pm 5,39 (53,04-71,84)	1,46 \pm 0,12 (1,29-1,79)	29,44 \pm 4,78 (20,64-36,69)	29,49 \pm 5,07 (17,72-37,14)	18,81 \pm 3,53 (12,73-26,65)

Descrição da infraciliatura oral de *M. minorum* e *M. ypsilon*

Foram caracterizadas pela primeira vez no presente estudo, as infraciliaturas orais de *Metadinium minorum* e *Metadinium ypsilon*, as quais seguem o padrão-*Diplodinium*. Essas espécies apresentam policinécias bucais, compostas por policinécias adoral e vestibular, policinécia dorsal e cinécias parabolabiais. A policinécia adoral se estende além da circunferência da abertura vestibular e a policinécia vestibular se estende para o interior do vestíbulo, originando-se internamente pelo lado dorsal da policinécia adoral. A policinécia dorsal estende-se lateralmente ao longo do lado dorsal do corpo, sendo que a extremidade esquerda se estende mais ventralmente que a extremidade direita. As cinécias parabolabiais apresentam-se em número de cinco em *M. ypsilon* (Prancha VIIIh) e quatro em *M. minorum* (Prancha VIIg).

DISCUSSÃO

Os estudos que utilizaram cana-de-açúcar na alimentação de bovinos e ovinos no Brasil (D'AGOSTO et al., 1996; LUDOVICO & MATTOS, 1997; NOGUEIRA FILHO et al., 1999; FRANZOLIN et al., 2000; FRANZOLIN & FRANZOLIN, 2000; LOPES et al., 2002; VALINOTE et al., 2005) e em outros países (LENG et al., 1981; DAYANI et al., 2007), abordam o efeito desta dieta no metabolismo do ruminante e sobre as populações de protistas ciliados, sem conhecer especificamente a composição de espécies da ciliatofauna ruminal. A análise da distribuição e composição de ciliados em ruminantes alimentados com cana-de-açúcar foi realizada somente em búfalos no Taiwan (IMAI et al., 1981). A riqueza encontrada por estes autores foi maior do que a encontrada para bovino e ovino no presente estudo. Esta diferença pode estar relacionada a diversos fatores como a dieta fornecida, o manejo, espécie e localização geográfica do hospedeiro (WILLIAMS & COLEMAN, 1992), e as técnicas ciliatológicas utilizadas na identificação dos protozoários. Desta forma, o presente estudo é inédito ao abordar o levantamento das espécies de ciliados do rúmen em bovino e ovino alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

A riqueza e composição de espécies de ciliados encontrada para bovino e ovino é considerada relevante em relação a demais estudos realizados com estes ruminantes domésticos em diferentes dietas e condições de manejo, sendo superior a valores encontrados no Brasil (DEHORITY, 1986), Malásia (IMAI et al., 1995), Irã (TALARI

et al., 2004), Egito (SELIM et al., 1996), Portugal (MARINHO, 1983), Canadá (IMAI et al., 1989), Escócia (EADIE, 1957), Rússia (DOGIEL, 1927), Alasca (DEHORITY, 1974), Índia (BANERJJE, 1955), Paquistão (LUBINSKY, 1957) e Europa (BANERJJE, 1955).

O elevado número de espécies encontradas no presente estudo, 36 espécies no total, pode estar relacionado à utilização concomitante de várias técnicas ciliatólogicas, o que não é utilizado nos estudos com ciliados ruminais. Esta riqueza foi semelhante à encontrada para ciliados intestinais na Turquia (GURELLI & GOÇMEN, 2011), cuja caracterização morfológica dos ciliados foi realizada com mais de uma técnica ciliatólogica, a impregnação pelo carbonato de prata e a solução de verde brilhante com formalina. O emprego de diversas técnicas ciliatólogicas é sugerido no presente estudo, uma vez que evidencia maior número de caracteres e possibilita caracterização morfológica e morfométrica mais completas.

No que diz respeito à análise dos ciliados *in vivo*, os únicos estudos que utilizaram este procedimento para a caracterização morfológica de ciliados ruminais foram SHARP (1914), KOFOID & MACLENNAN (1930) e NOIROT-TIMOTHÉE (1960). A escassez de estudos neste aspecto está relacionada ao caráter anaeróbio destes organismos e a dificuldade de manutenção dos ciliados em cultivos laboratoriais, o que faz com que a maior parte das análises morfológicas sejam realizadas com ciliados fixados. A observação *in vivo* se faz importante, uma vez que permite visualizar ricamente vários detalhes do ciliado que são dificilmente visualizados quando o mesmo é fixado, tais como coloração, ciliatura e vacúolos contráteis.

Com colorações semi-permanentes, solução de lugol e verde brilhante, a morfologia do aparato nuclear e das placas esqueléticas são visualizadas com sucesso contribuindo não só para a caracterização específica dos ciliados ruminais, como também na avaliação quantitativa destes protistas, visto que tais caracteres se diferem em nível genérico e específico (DEHORITY, 1984; D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999).

Por fim, a utilização da microscopia eletrônica de varredura se mostrou eficaz na caracterização específica destes ciliados ao evidenciar caracteres que diferem em presença e forma entre as espécies, tais como lobos e espinhos. A análise dos processos caudais se fez relevante no presente estudo para a diferenciação das espécies de

Entodinium, *Ostracodinium* e *Eodinium*. Desta forma, fica clara a necessidade de se utilizar tal técnica na caracterização específica dos ciliados ruminais.

Com o emprego das técnicas de coloração e microscopia utilizadas neste trabalho, a caracterização morfométrica das espécies de ciliados ruminais encontradas em bovino e ovino foram realizadas de forma mais completa, por evidenciarem e possibilitarem a mensuração de maior número de caracteres.

Os principais caracteres mensurados que se utilizava para definir gênero e espécie eram comprimento e largura do corpo (CLARKE, 1964; WOLSKA, 1967; DEHORITY & MATOS, 1978; ITO & IMAI, 1981; IMAI & OGIMOTO, 1983; IMAI, 1984; IMAI, 1985, ITO et al., 1994; DEHORITY, 1997; GURUNG et al., 2001; GOÇMEN et al., 2001a) e comprimento e largura do macronúcleo (KOFOID & MACLENNAN, 1930; 1932; LUBINSKY, 1958; DEHORITY, 1974; ITO & IMAI, 1990 WILLIAMS & COLLEMAN, 1992; DEHORITY, 1995; GOÇMEN & OKTEM, 1996, GOÇMEN et al., 2001b). Com a evolução das técnicas ciliatólogicas, outros caracteres importantes para a taxonomia dos ciliados foram evidenciados e com isso, as análises morfométricas se ampliaram. Os caracteres referentes a projeções caudais, como lobos e espinhos, e o comprimento das placas esqueléticas (ITO et al., 2001) começaram a ser mensurados, além da relação do macronúcleo com o comprimento do corpo (ITO et al., 1999, GOÇMEN et al., 1996; GOÇMEN & OKTEM, 1996, 1999; GOÇMEN et al., 1999; GOÇMEN et al., 2002; RASTGELDI & GOÇMEN, 2002, 2003; GOÇMEN & RASTGELDI, 2004; GOÇMEN & GURELLI, 2009), e a relação do macronúcleo com o micronúcleo (ITO & IMAI, 2003; 2005; MISHIMA et al., 2009).

No presente estudo, caracteres ainda não mensurados para determinadas espécies foram acrescentados à morfometria, procurando-se diminuir as dúvidas no processo de identificação específica geradas pela grande diversidade morfológica dos ciliados do rúmen. Foi possível estabelecer para os gêneros *Entodinium*, *Ostracodinium* e *Metadinium*, evidenciados por meio de análises estatísticas, os caracteres mais variáveis quantitativamente e que contribuem para a diferenciação específica destas espécies. Segundo CAVALCANTI & LOPES (1993), a morfometria multivariada é útil na detecção de diferenças e no estudo das variações de caracteres quantitativos, sendo este tipo de análise inédita no estudo morfológico de ciliados ruminais. Foram selecionados para as espécies de cada gênero os caracteres quantitativos que mais contribuíssem para a separação das espécies. Caracteres morfológicos como lobos e espinhos são mais

variáveis em forma e pelo fato de estarem presentes ou não no ciliado, do que sua medida morfométrica, podendo assim descartar sua mensuração da análise morfométrica destes ciliados. Por meio deste estudo, pode-se otimizar tal avaliação ao se utilizar os parâmetros que realmente contribuem para a identificação específica dos ciliados.

A caracterização da região oral por meio da impregnação da infraciliatura se faz importante na caracterização morfológica dos ciliados, uma vez que este caráter apresenta padrões diferenciados, podendo ser utilizado como diagnóstico espécie-específico (ITO & IMAI, 2003, 2005). No presente estudo, a infraciliatura oral de quatro espécies de *Entodinium*, uma espécie de *Ostracodinium* e duas de *Metadinium* foi caracterizada pela primeira vez.

O gênero *Entodinium*, descrito por STEIN (1914) e é caracterizado especificamente conforme o formato e tamanho corporal, morfologia do aparato nuclear, da citofaringe e do citoprocto, posição do vacúolo contrátil, além da presença e morfologia de processos caudais (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLLEMAN, 1992). A morfologia da infraciliatura oral tem acrescentado informações relevantes nos estudos de caráter morfológico e taxonômico do gênero (ITO & IMAI, 2003, 2006; MISHIMA et al., 2009). No presente estudo, as bandas de infraciliatura oral de *E. dubardi dubardi*, *E. retangulatum retangulatum*, *E. alces* e *E. rostratum* foram pela primeira vez caracterizadas e inseridas no padrão-*Entodinium*.

O gênero *Ostracodinium*, descrito por DOGIEL (1927) é caracterizado especificamente conforme o formato e tamanho do corpo, número de vacúolos contráteis, formato e tamanho da placa esquelética e presença e ausência de lobos ou espinhos na região posterior do corpo (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLEMAN, 1992). Além destes caracteres, os padrões de infraciliatura oral também têm sido utilizados nos estudos morfológicos do gênero (ITO & IMAI, 1998; 2006; ITO et al., 2001). No presente estudo, a infraciliatura oral de *Ostracodinium clipeolum* foi caracterizada e inserida no padrão-*Ostracodinium gracile*, cuja morfologia das bandas de infraciliatura também é compartilhada pelas espécies *O. trivesiculatum*, *O. dogieli* e *O. monolobum*, também evidenciadas neste trabalho.

O gênero *Metadinium*, descrito por AWERINZEW & MUTAFOWA (1914) é caracterizado especificamente conforme os caracteres: formato e tamanho do corpo, morfologia do aparato nuclear, formato da placa esquelética e presença e ausência de lobos ou espinhos na região posterior do organismo (KOFOID & MACLENNAN,

1932; OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLEMAN, 1992). Quanto à infraciliatura oral, as espécies de *Metadinium* apresentaram o mesmo padrão de bandas das espécies que compõem o padrão-*Diplodinium*, Este padrão é constituído por outros gêneros também evidenciados no presente estudo, tais como *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diploplastron* e *Eudiplodinium* (ITO & IMAI, 2006).

O presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento acerca da taxonomia e morfologia de ciliados simbioses de ruminantes domésticos, trazendo novas informações sobre os caracteres morfométricos importantes para a diferenciação de espécies, descrição da infraciliatura oral para sete espécies de ciliados e ressaltando a importância do uso de várias técnicas ciliológicas pouco usadas na caracterização específica de ciliados ruminais.

CONCLUSÕES

O estudo da composição das espécies de protistas ciliados no rúmen encontrada no presente estudo é inédito para bovino e ovino alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

A identificação específica dos protistas ciliados ruminais é facilitada por meio da observação *in vivo* dos ciliados, técnicas de microscopia eletrônica de varredura e impregnação pela prata.

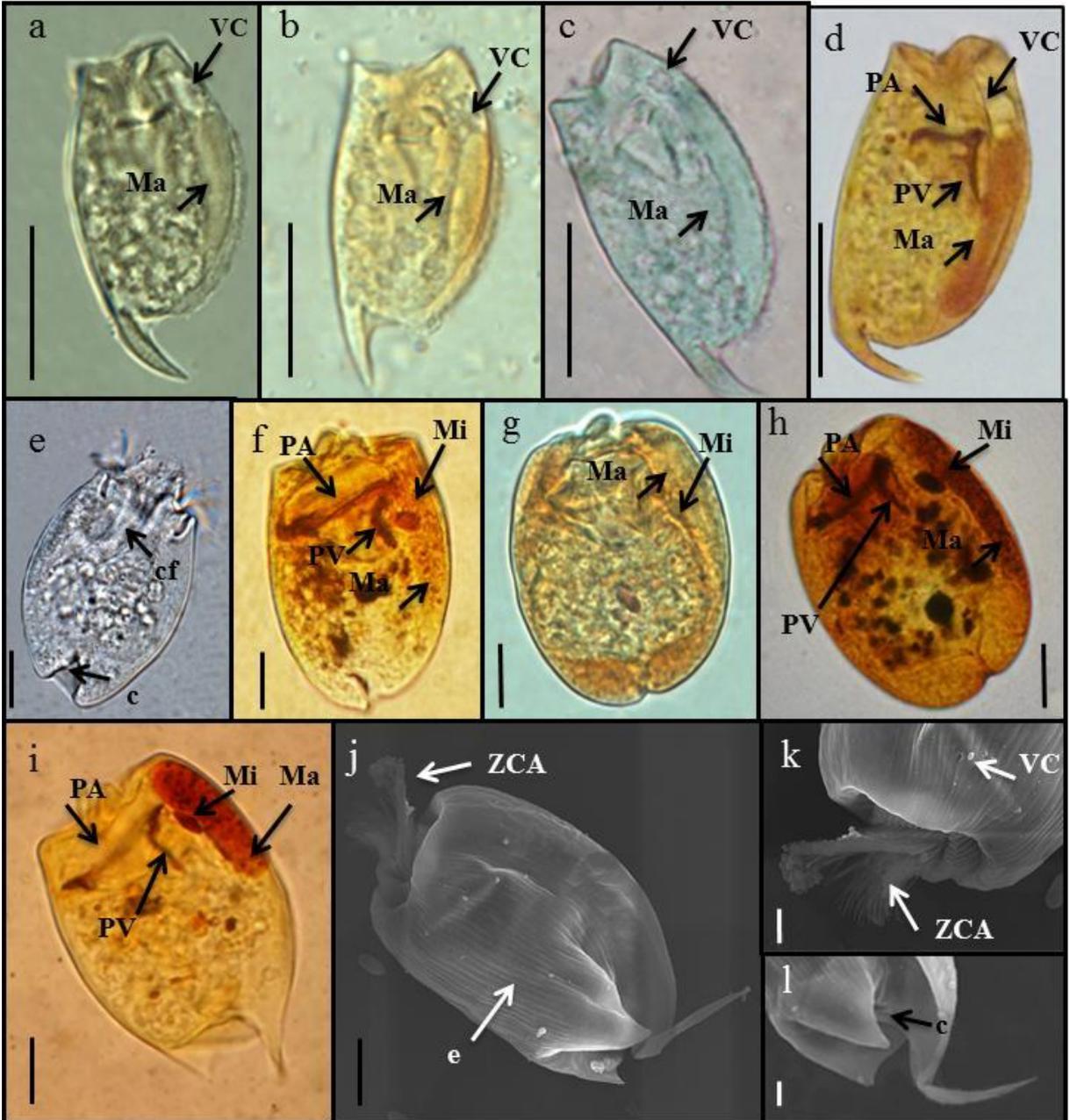
O aperfeiçoamento proposto para a técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina apresenta ótimos resultados na impregnação das bandas de infraciliatura e no aparato nuclear em todos os gêneros de ciliados encontrados, com novos registros do padrão de infraciliatura para os gêneros *Entodinium*, *Metadinium* e *Ostracodinium* e o primeiro registro da impregnação do aparato nuclear para as espécies da família Isotrichidae.

Os caracteres relacionados ao corpo, macronúcleo e placas esqueléticas são os mais variáveis quantitativamente nas espécies de *Entodinium*, *Ostracodinium* e *Metadinium* e devem ser acrescentados à morfometria destes ciliados.

PRANCHA I

Fotografias a-l: Fotomicrografias e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero *Entodinium*, a-d: *Entodinium rostratum*; a: observação *in vivo* (DIC); **b:** ciliado corado com solução de lugol; **c:** coloração com verde brilhante, evidenciando o vacúolo contrátil e o macronúcleo; **d:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral e vestibular, macronúcleo e vacúolo contrátil; **e-f: *Entodinium alces*; e:** observação *in vivo* (DIC), mostrando citofaringe e citoprocto; **f:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando aparato nuclear e policinécias adoral e vestibular, **g-h: *Entodinium dubardi dubardi*; g:** ciliado corado com solução de lugol; **h:** ciliado impregnado com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral e vestibular, macronúcleo e micronúcleo; **i-l: *Entodinium retangulatum retangulatum*; i:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral e vestibular, macronúcleo e micronúcleo; **j:** eletromicrografia evidenciando a zona de ciliatura adoral e as estrias presentes na membrana do ciliado; **k:** eletromicrografia da região oral do ciliado evidenciando a zona de ciliatura oral e a abertura do vacúolo contrátil; **l:** eletromicrografia da região posterior do ciliado evidenciando as projeções caudais e o citoprocto.

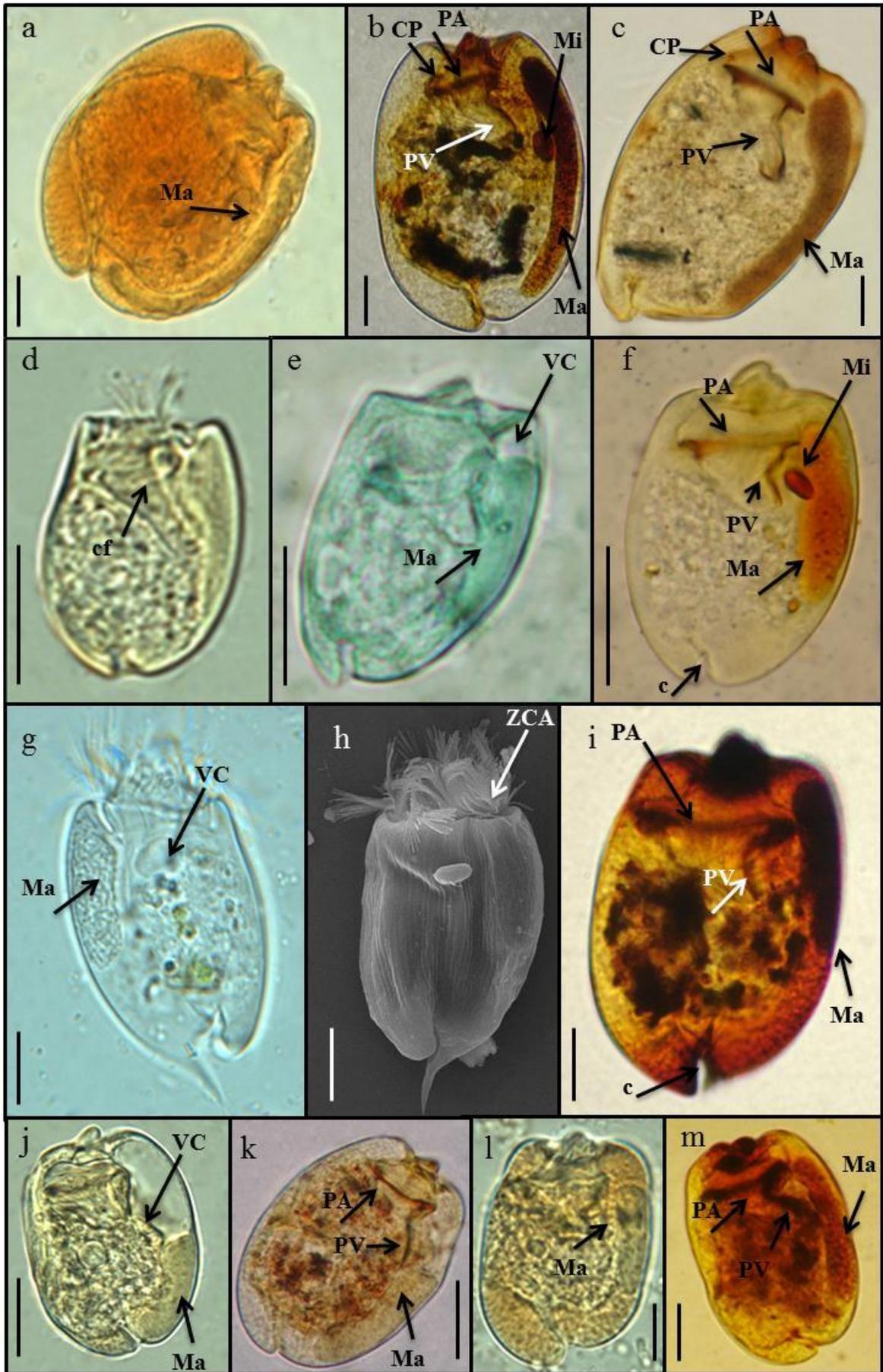
Legendas: c: citoprocto; cf: citofaringe; e: estrias; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil; ZCA: zona de ciliatura adoral. Barra: 10µm.



PRANCHA II

Fotografias a-m: Fotomicrografias e eletromicrografia de protistas ciliados do gênero *Entodinium*; a-c: *Entodinium longinucleatum longinucleatum*; a: coloração com solução de lugol, evidenciando o longo macronúcleo; **b e c:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral e vestibular, cinécias parabolabiais, macronúcleo e micronúcleo; **d-f: *Entodinium exiguum*; d:** coloração com solução de lugol, evidenciando a citofaringe; **e:** coloração com verde brilhante, evidenciando o macronúcleo e o vacúolo contrátil; **f:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando macronúcleo, micronúcleo, citoprocto e policinécias adoral e vestibular; **g-i: *Entodinium caudatum lobosospinosum*; g:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando macronúcleo e vacúolo contrátil; **h:** eletromicrografia evidenciando a zona de ciliatura adoral; **i:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral e vestibular, macronúcleo e citoprocto; **j-k: *Entodinium bovis*; j:** coloração com solução de lugol, evidenciando o macronúcleo e o vacúolo contrátil; **k:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando macronúcleo e policinécias adoral e vestibular; **l-m: *Entodinium biconcavum*; l:** coloração com solução de lugol, evidenciando macronúcleo; **m:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando macronúcleo e policinécias adoral e vestibular.

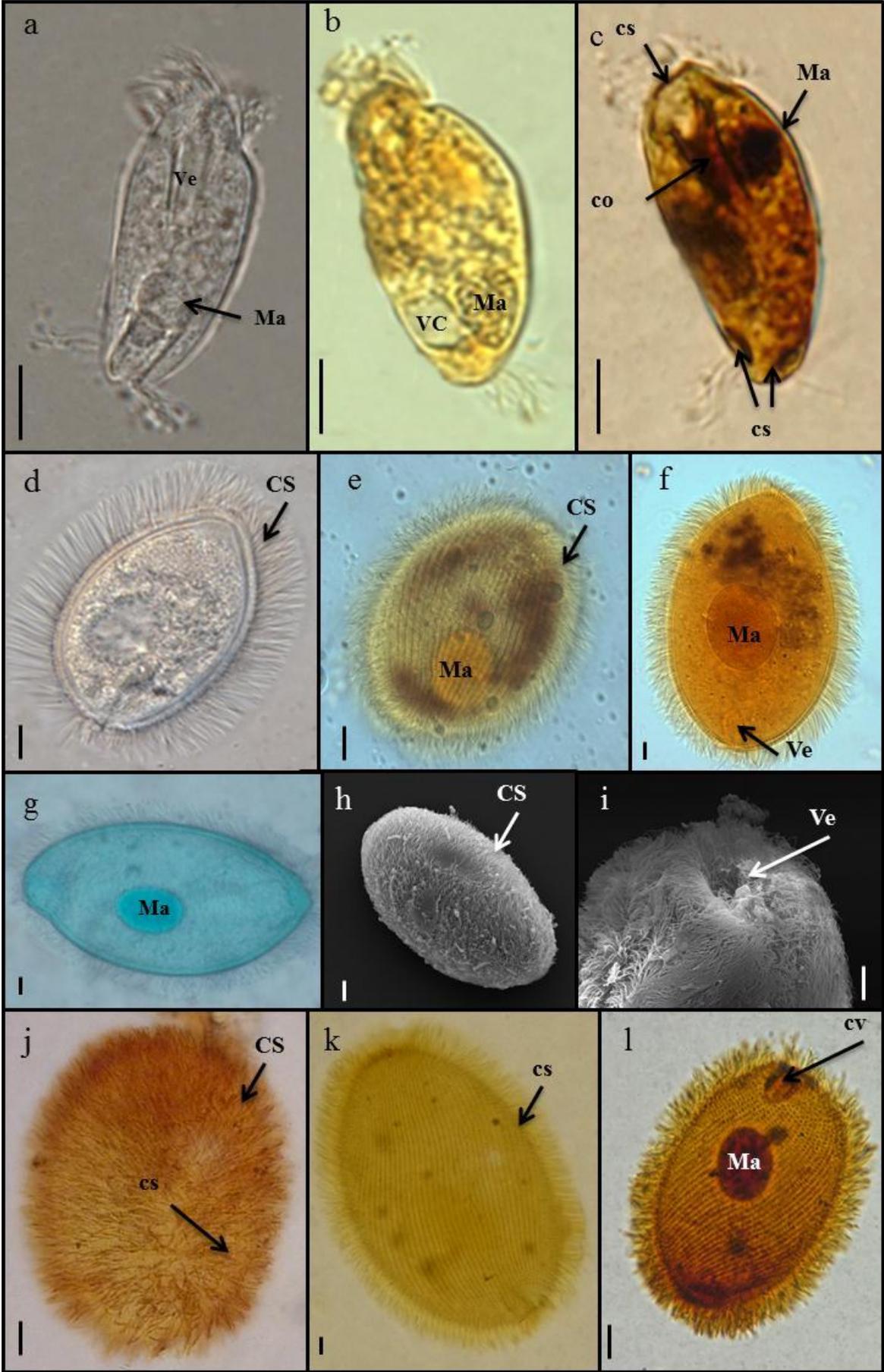
Legendas: c: citoprocto; cf: citofaringe; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PV: policinécia vestibular; CP: cinécias parabolabiais; VC: vacúolo contrátil; ZCA: zona de ciliatura adoral. Barra: 10µm.



PRANCHA III

Fotografias a-l: Fotomicrografias de protistas ciliados do gênero *Charonina* e fotomicrografias e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero *Dasytricha*; a-c: *Charonina ventriculi*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando o macronúcleo, o vacúolo contrátil e o vestíbulo; **b:** coloração com solução de lugol, evidenciando o vacúolo contrátil e o macronúcleo; **c:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as cinécias somáticas (ao redor do vestíbulo e na região posterior), cinécia oral, localizada no interior do vestíbulo e macronúcleo; **d-l: *Dasytricha ruminantium*; d:** observação *in vivo* (DIC), mostrando o macronúcleo e a ciliatura somática; **e-f:** coloração com solução de lugol, evidenciando ciliatura somática, macronúcleo e vestíbulo; **g:** coloração com verde brilhante, evidenciando o macronúcleo; **h-i:** eletromicrografia evidenciando a ciliatura somática completa e a abertura do vestíbulo; **j-l:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as fileiras de cinécias somáticas, além da ciliatura somática em evidência (**j e k**), macronúcleo e cinécia oral (**l**).

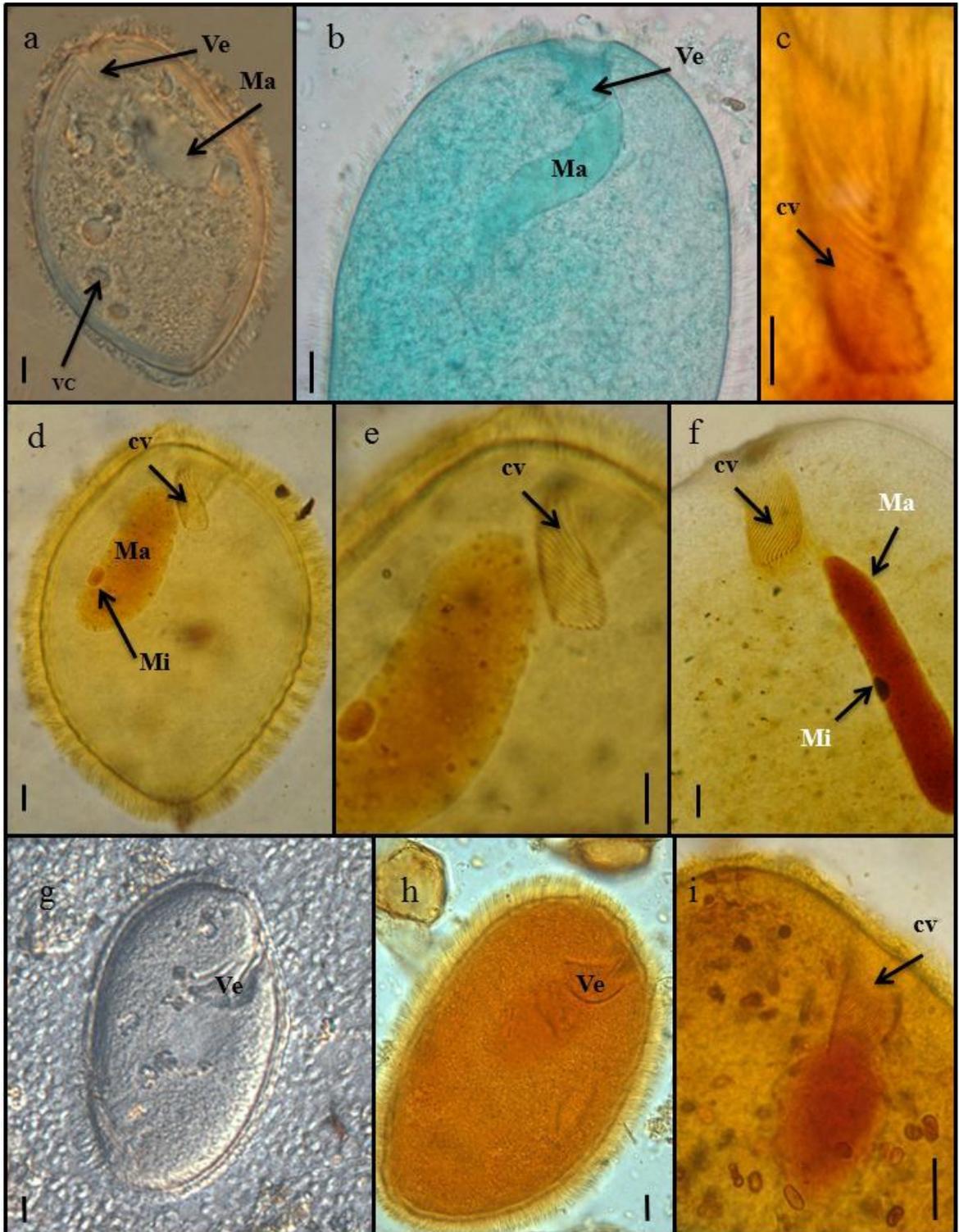
Legendas: cs: cinécias somáticas; co: cinécia oral; CS: ciliatura somática; Ma: macronúcleo; Ve: vestíbulo; VC: vacúolo contrátil. Barra: 10µm.



PRANCHA IV

Fotografias a-i: Fotomicrografias de protistas ciliados do gênero *Isotricha* e *Dasytricha*; a-f: *Isotricha prostoma*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando o macronúcleo, os vacúolos contráteis e o vestíbulo; **b:** ciliado corado com verde brilhante, evidenciando o vestíbulo e o longo e sinuoso macronúcleo; **c-f:** ciliado impregnado com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe as cinécias vestiluares, macronúcleo e micronúcleo; **d-f: *Dasytricha ruminantium*; d:** observação *in vivo* (DIC), mostrando o macronúcleo e a ciliatura somática; **e-f:** ciliado corado com solução de lugol, evidenciando ciliatura somática, macronúcleo e vestíbulo; **g-l: *Isotricha intestinalis*; g:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vestíbulo; **h:** ciliado corado com solução de lugol, evidenciando o vestíbulo; **i:** ciliado impregnado com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as cinécias vestibulares e o macronúcleo.

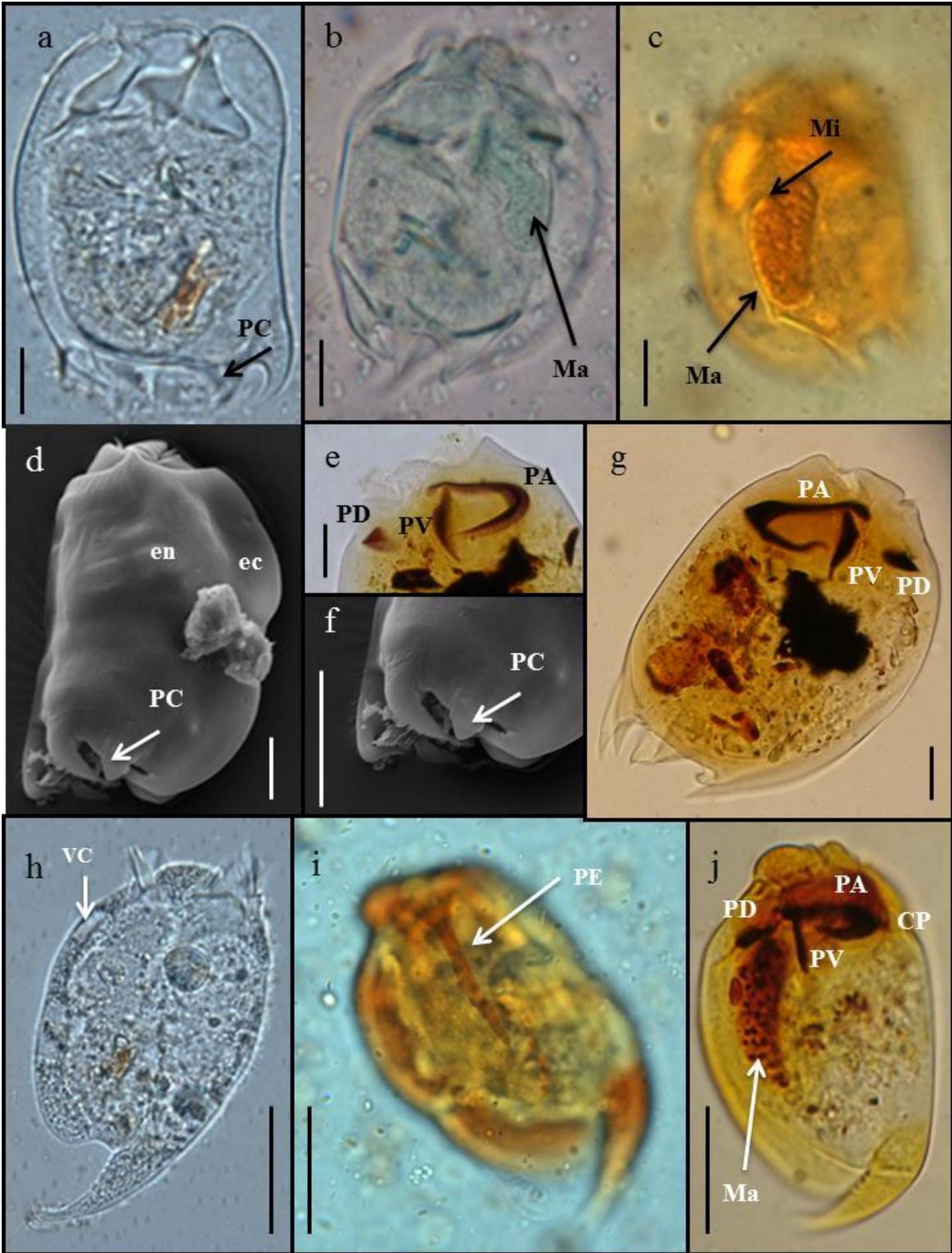
Legendas: cv: cinécia vestibular; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; Ve: vestíbulo; VC: vacúolo contrátil. Barra: 10µm.



PRANCHA V

Fotografias a-j: Fotomicrografias de protistas ciliados do gênero *Diplodinium* e *Eremoplastron* e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero *Diplodinium*; a-g: *Diplodinium anisacanthum*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando as projeções caudais em número de seis espinhos; **b:** ciliado corado com verde brilhante, evidenciando o macronúcleo; **c:** coloração com solução de lugol, destacando o macronúcleo; **d e f:** eletromicrografia evidenciando o formato do corpo com destaque para a separação do endoplasma e ectoplasma e as projeções caudais em número de seis espinhos; **e e g:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe as policinécias vestibular, adoral e dorsal; **h-j: *Eremoplastron rostratum*; h:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vacúolo contrátil; **i:** coloração com solução de lugol, evidenciando a placa esquelética única; **j:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral, vestibular, dorsal, cinécias parabolais, macronúcleo e micronúcleo.

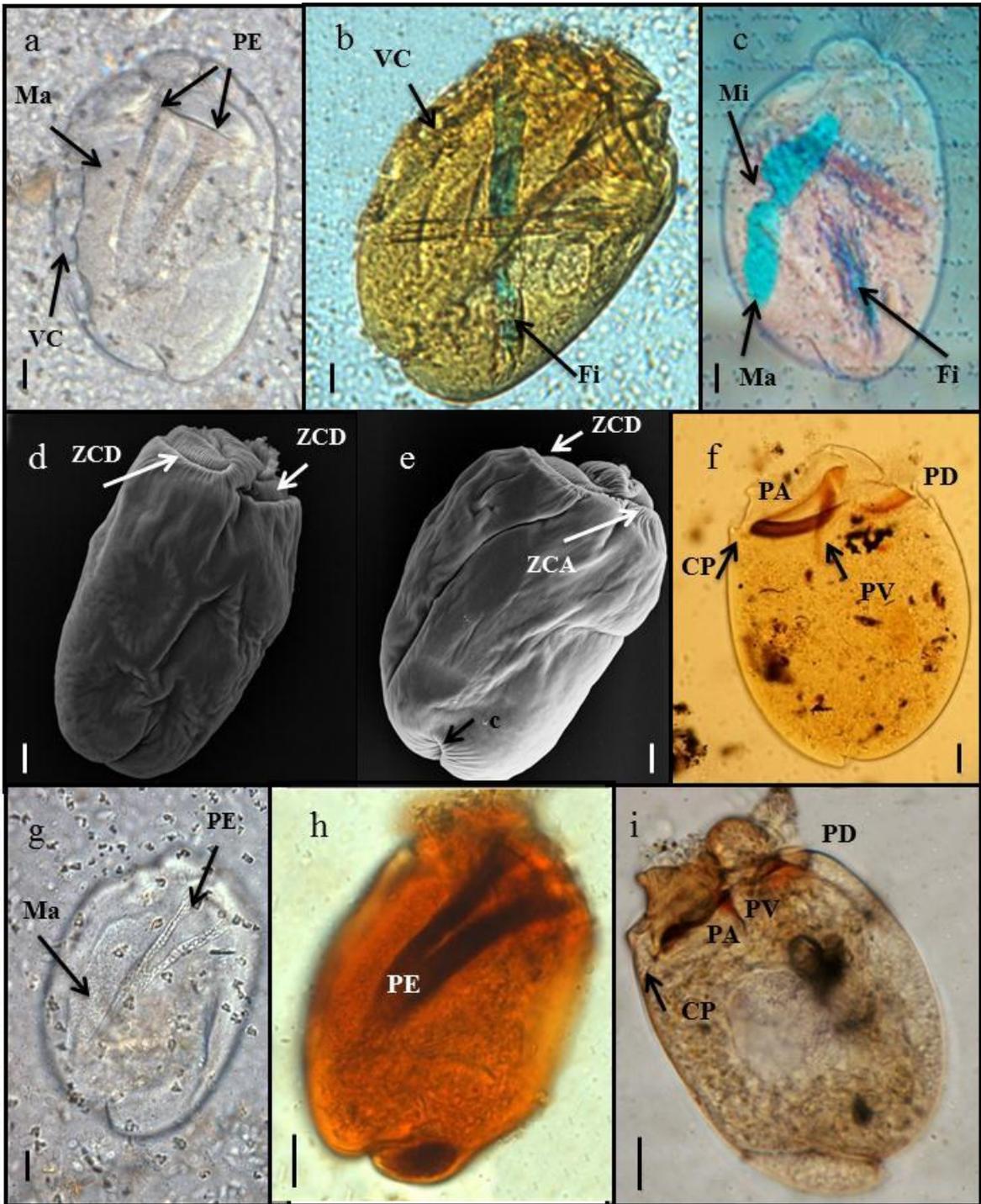
Legendas: CP: cinécias parabolais; en: endoplasma; ec: ectoplasma; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PC: projeções caudais; PD: policinécia dorsal; PE: placa esquelética; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil. Barra: 20µm.



PRANCHA VI

Fotografias a-i: Fotomicrografias de protistas ciliados do gênero *Polyplastron* e *Diploplastron* e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero *Polyplastron*; a-f: *Polyplastron multivesiculatum*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando as placas esqueléticas, o macronúcleo e os vacúolos contráteis; b: coloração com solução de lugol, evidenciando as placas esqueléticas, o vacúolo contrátil e uma fibra vegetal ingerida pelo ciliado; c: coloração com verde brilhante, destacando o macronúcleo, micronúcleo e a fibra vegetal ingerida pelo ciliado; d-e: eletromicrografias evidenciando o formato do corpo com destaque para a zona de ciliatura dorsal e adoral e o citoprocto; f: impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe as policinécias vestibular, adoral e dorsal e as cinécias parabolabiais; g-i: *Diploplastron affine*; g: observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vacúolo contrátil e as placas esqueléticas; h: coloração com solução de lugol, evidenciando as placas esqueléticas; i: impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral, vestibular, dorsal e as cinécias parabolabiais.

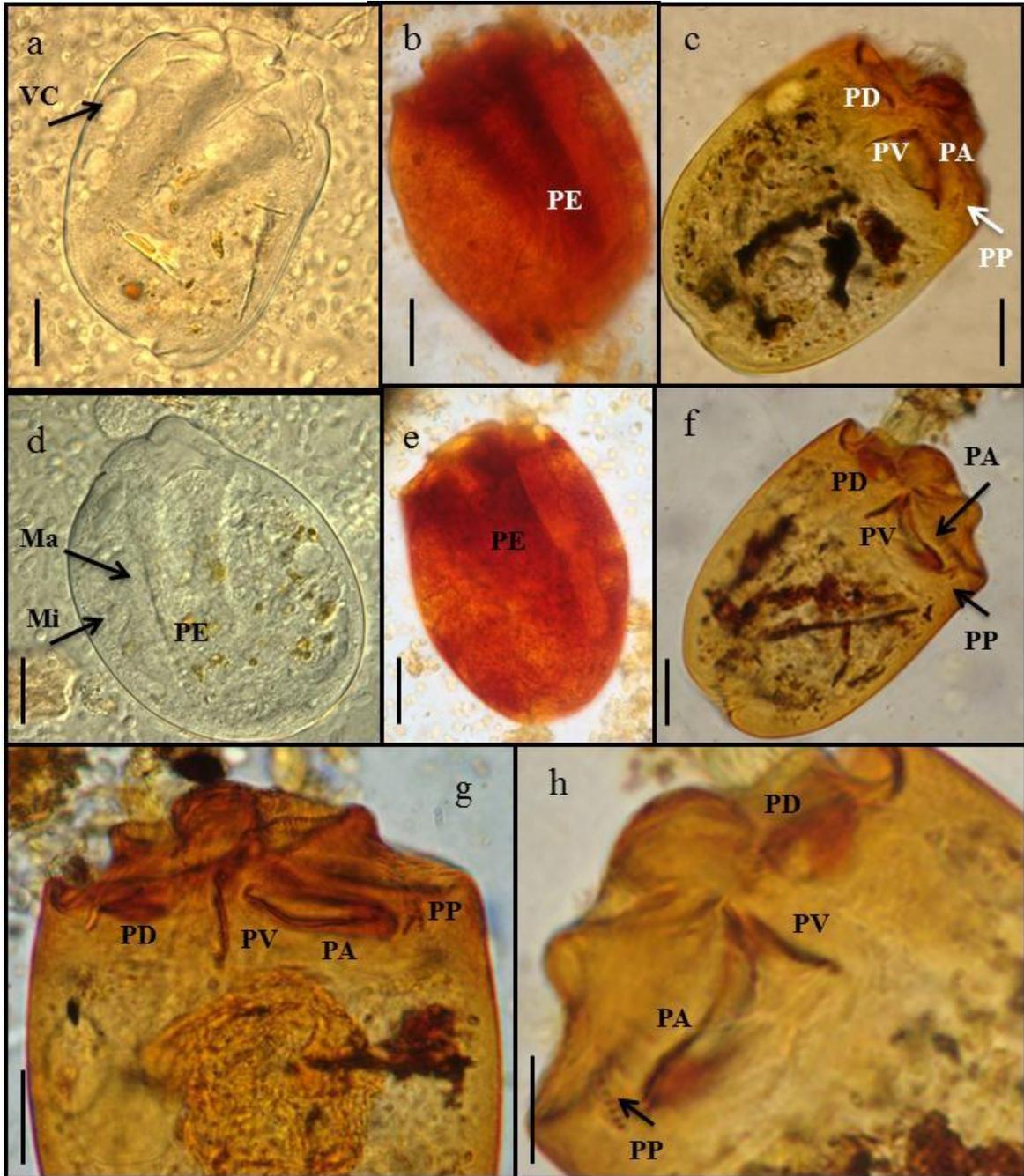
Legendas: CP: cinécias parabolabiais; Fi: fibra vegetal; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PD: policinécia dorsal; PE: placa esquelética; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil; ZCA: zona de ciliatura adoral; ZCD: zona de ciliatura dorsal. Barra: 20µm.



PRANCHA VII

Fotografias a-h: Fotomicrografias de protistas ciliados do gênero *Metadinium*; a-c e g: *Metadinium minorum*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vacúolo contrátil; **b:** coloração com solução de lugol, evidenciando as placas esqueléticas fundidas na região posterior, macronúcleo com apenas um lobo e vacúolo contrátil o vacúolo contrátil; **c e g:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe (**g**) as policinécias vestibular, adoral e dorsal e as cinécias parabolabiais e número de quatro cinécias; **d-f e h:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando as duas placas esqueléticas fundidas na região posterior em formato de “Y”; vacúolo contrátil, micronúcleo e macronúcleo com dois lobos; **e:** coloração com solução de lugol, evidenciando as placas esqueléticas e o macronúcleo; **f e h:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe (**h**) as policinécias vestibular, adoral e dorsal e as cinécias parabolabiais em número de cinco cinécias.

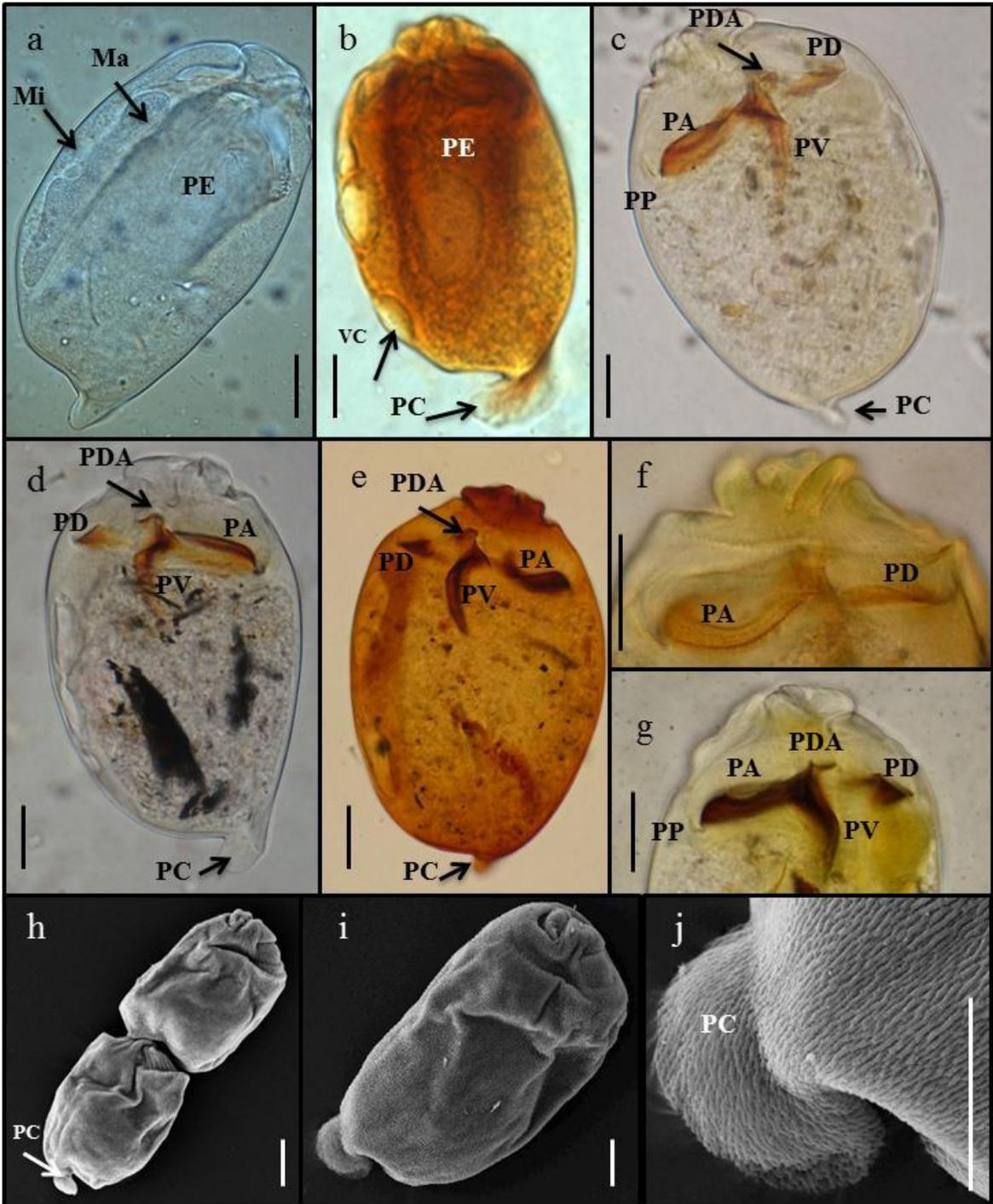
Legendas: CP: cinécias parabolabiais; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PD: policinécia dorsal; PE: placa esquelética; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil. Barra: 20µm.



PRANCHA VIII

Fotografias a-j: Fotomicrografias e eletromicrografias de protistas ciliados da espécie *Ostracodinium clipeolum*; **a:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando a única e larga placa esquelética, o macronúcleo e micronúcleo e a projeção caudal em forma de um único lobo robusto; **b:** coloração com solução de lugol, evidenciando a placa esquelética, o vacúolo contrátil e o lobo robusto; **c-g:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral, vestibular, dorsal, dorso-adoral e as cinécias parabolabiais, além do lobo e do vacúolo contrátil; **h-j:** eletromicrografias evidenciando o processo final de divisão por fissão binária do ciliado (**h**) e em detalhe a forma da projeção caudal desta espécie (**i-j**).

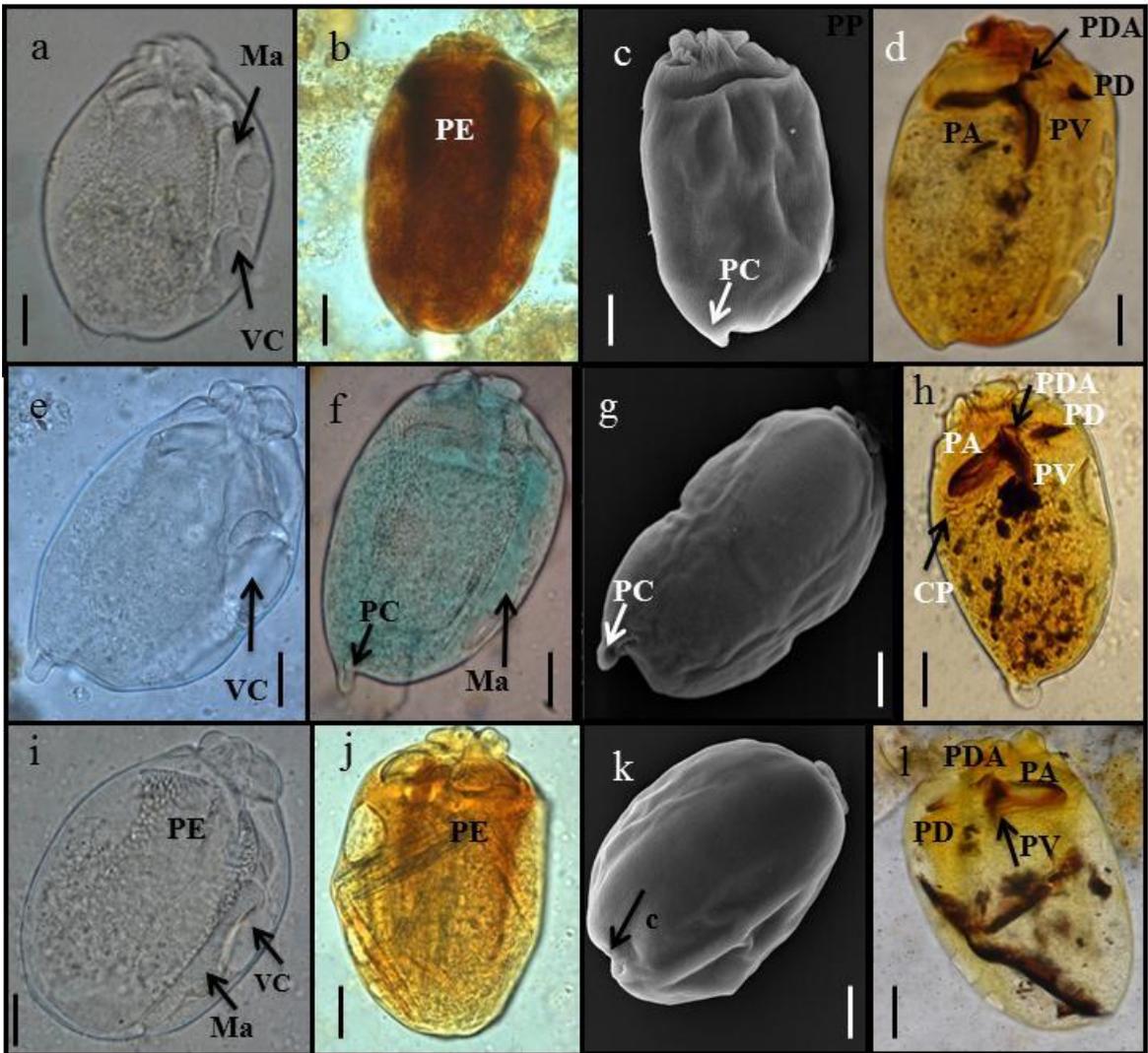
Legendas: CP: cinécias parabolabiais; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PC: projeção caudal; PD: policinécia dorsal; PDA: policinécia dorso-adoral; PE: placa esquelética; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil. Barra: 20µm.



PRANCHA IX

Fotografias a-l: Fotomicrografias e eletromicrografias de protistas ciliados do gênero *Ostracodinium*; a-d: *Ostracodinium monolobum*; a: observação *in vivo* (DIC), evidenciando a placa esquelética, o macronúcleo, vacúolos contráteis e a projeção caudal em forma de um lobo pontudo; **b:** coloração com solução de lugol, evidenciando a placa esquelética e o vacúolo contrátil; **c:** eletromicrografia evidenciando o formato do corpo e a projeção caudal; **d:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando em detalhe as policinécias vestibular, adoral e dorsal e dorso-adoral, além do vacúolo contrátil e o lobo na região posterior do corpo; **e-h: *Ostracodinium dogieli*; e:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vacúolo contrátil e a projeção caudal; **f:** coloração com verde brilhante, evidenciando o macronúcleo e a projeção caudal; **g:** eletromicrografia evidenciando o princípio de divisão por fissão binária no ciliado e a projeção caudal; **h:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral, vestibular, dorsal, dorso-adoral e as cinécias parabolabiais, além do vacúolo contrátil e a projeção caudal; **i-l: *Ostracodinium trivesiculatum*; i:** observação *in vivo* (DIC), evidenciando o vacúolo contrátil, macronúcleo e a placa esquelética; **j:** ciliado corado com lugol, evidenciando o placa esquelética e os vacúolos contráteis; **k:** eletromicrografia evidenciando o citoprocto; **l:** impregnação com carbonato de prata amoniacal com piridina, mostrando as policinécias adoral, vestibular, dorsal, dorso-adoral e o vacúolo contrátil.

Legendas: c: citoprocto; CP: cinécias parabolabiais; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; PA: policinécia adoral; PC: projeção caudal; PD: policinécia dorsal; PDA: policinécia dorso-adoral; PE: placa esquelética; PV: policinécia vestibular; VC: vacúolo contrátil. Barra: 20µm.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCURI. P.B.; LOPES. F.C.F.; CARNEIRO. J.C. Microbiologia do Rúmen. In: BERCHIELLI. T.T.; PIRES. A.V.; OLIVEIRA. S.G. Nutrição de Ruminantes. 2º edição. Jaboticabal: Funep. 2011.
- BAILEY. R.W.; CLARKE. R.T.J.; WRIGHT. D.E. Carbohydrases of the rúmen ciliate *Epidinium ecaudatum* (Crawley). **Biochemical Journal**, v, 83. p. 517-523. 1965.
- BARNEJJE. K. Studies on parasitic ciliates from Indian ruminants. **Proceedings of the Zoological Society**, v.8, p. 87-101. 1955.
- BOOYSE. D.; DEHORITY. B. Rumen protozoa in South Africa sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.78. p.1-7. 2011.
- CAMERON. S.L.; O'DONOGHUE. P. J.; ADLARD. R.D. Novel isotrichid ciliates endosymbiotic in Australian macropodid marsupials. **Systematic Parasitology**, v.46, p.45-57. 2000.
- CARNEIRO. M.E.; NETTO. C.M.M.. D'AGOSTO. M.; ARCURI. P.B. Ciliados do rúmen de bovinos mantidos com diferentes dietas. **XII Congresso Latino-Americano de Zoologia**. Belém. PA. Resumo 599:144. 1992.
- CAVALCANTI. M.J.; LOPES. P.R.D. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de Serranidae (Teleostei. Perciformes). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.15, p. 53-64. 1993.
- CLARKE. R.T.J.; M.J. ULYATT & A. JOHN. Variation in numbers and mass of ciliate protozoa in the rumens of sheep fed chaffed alfafa (*Medicago sativa*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1201-1204. 1982.
- COALHO. M.R.; NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; CUNHA. J.A.; LIMA. C.G. Estudo dos protozoários ciliados em bovinos consumindo dietas com diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 25, p.193-199. 2003.
- COLEMAN. G.S.; HALL. F.J. Fine structural studies on the digestion of bacterial species in the rumen ciliate *Entodinium caudatum*. **Tissue and Cell**, v. 4, p. 37-38. 1972.
- CUNHA. A. M. Sobre os ciliados intestinais dos mamíferos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.7, p.139-145. 1914.

- D'AGOSTO. M.; ARCURI. P.B.; CARNEIRO. M.E. Ciliates in the rumen of steers fed sugar cane based diets. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, p.132. 1990.
- D'AGOSTO. M. & SANTA-ROSA. M.R. Aspectos Morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorpha. Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. **Revista Brasileira de Zoologia**, v11, p. 215-225.1994.
- D'AGOSTO. M.; CARNEIRO. M.E.; NETTO. C.M.M.; ARCURI. P.B. Avaliação dos ciliados do rúmen de bovinos mantidos com duas dietas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.353-361. 1996.
- D'AGOSTO. M.; SANTA ROSA. M.R. Influência do hospedeiro no perfil populacional e nas populações de ciliados no rúmen de bovinos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15. p. 389-396. 1998.
- D'AGOSTO. M.; SANTA-ROSA. M.R.; AROEIRA. L.J.M.; LOPES. F.C.F. Influência da dieta no comportamento das populações de ciliados do rúmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, p.153-159. 1998.
- D'AGOSTO. M.; CARNEIRO. M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.725-729. 1999.
- DAYANI. O.; GHORBANI. G.R.; ALIKHANI. M.; RAHMANI. H.R.; MIR. P.S. Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. **Small Ruminant Research**, v.69, p.36-45. 2007.
- DEHORITY. B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan Moose (*Alces americana*). Musk-Ox (*Ovibos moschatus*) and Dall Mountain Sheep (*Ovis dalli*). **Journal of Protozoology**, v.21, p. 26-32. 1974.
- DEHORITY. B.A; MATOS. W.R.S. Diurnal changes and effect of ration on concentrations of the rumen ciliate *Charon ventriculi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.953-958. 1978.
- DEHORITY. B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, v.48, p.182-185. 1984.
- DEHORITY. B. A. Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: occurrence of several ciliates new to the rumen. including the cycloposthid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, v.33, p.416-421. 1986.
- DEHORITY. B.A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Boca Raton. Fla: CRC press. 1993. 325p.

- DEHORITY. B.A. Rumen Ciliates of the Pronghorn Antelope (*Antilocapra americana*), Mule Deer (*Odocoileus hemionus*), White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) and Elk (*Gervus canadensis*) in the Northwestern United States. **Arch Protistenkd**, v.146, p. 29-36. 1995.
- DEHORITY. B.A. Rumen Ciliate Protozoa in Australian Red Deer (*Gervus elaphus* L.). **Arch. Protistenkd**, v.48, p.157-165. 1997.
- DEHORITY. B. A.; ORPIN. C. G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: Hobson. P. N. & Stewart. C. S. (ed.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd ed. Chapman & Hall. London. p. 196–245. 1997.
- DEHORITY. B.A. . Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.52, p. 339–342. 2005.
- DOGIEL. V. A. Monographie der familie Ophryoscolecidae. **Archiv fuer Protistenkunde**, v.59, p.1-288. 1927.
- EADIE. J.M. the mid-winter rumen microfauna of the seaweed-eating sheep of North Ronaldshay. **Proceedings of the royal society of Edinburgh Series B**, v.66, p. 276-297. 1957.
- FERNANDEZ-GALEANO. D. La infraciliacion en *Polyplastron multivesiculatum* y su génesis durante la kdivision del ciliado. **Bolletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, v.56, p.89-108. 1958.
- FERNANDEZ-GALEANO. D. Une nouvelle methode pour la mise en evidence de l'infraciliature des cilies. **Protistologica**, v.2, p. 35-37. 1966.
- FERNANDEZ-GALEANO. D. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 95, p. 557-560. 1976.
- FOISSNER. W. Basic Light and Scanning Electron Microscopic Methods for Taxonomic Studies of Ciliated Protozoa. **European Journal of Protistology**, v.27, p.313-330. 1991.
- FRANZOLIN NETO. R.; FRANZOLIN. M.H.T.; VELLOSO. L.; LIMA. C.G. Efeitos da *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit sobre a concentração de protozoários ciliados do rúmen de ovinos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.25, p.267-273. 1988.
- FRANZOLIN. M.H.T.; LUCCI. C.S.; FRANZOLIN. R. Efeitos de rações com níveis crescentes de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho sobre a população

- de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1452-1457. 2000.
- FRANZOLIN. R.; FRANZOLIN. M.H.T. População Protozoários Ciliados e Degradabilidade Ruminal em Búfalos e Bovinos Zebuínos sob Dieta à Base de Cana-de-Açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1853-1861. 2000.
- GÖÇMEN. B.; ÖKTEM. N. Iskembe Siliyati *Entodinium longinucleatum* Dogiel. 1925 (Ciliophora: Entodiniomorphida: Entodiniidae)'un Evcil Sigirlaedaki Taksonomik Durumu. **Turkish Journal of Zoology**, v.23, p. 465-471. 1999.
- GÖÇMEN. B.; TOSUNOĞLU. M.; FALAKALI. B. New Rumen Ciliates from Turkish Domestic Cattle (*Bos taurus* L.): 3. *Entodinium oektemae* n. sp. and *Entodinium imaii* n. sp.(Entodiniidae. Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, v.25, p. 269-274. 2001a.
- GÖÇMEN. B.; DEHORITY. B.A.; TALUA. G.H.; RASTGELDY. S. The Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep (*Ovis ammon aires*) from the Turkish Republic of Northern Cyprus. **The Journal of Eukariotic Microbiology**, v.48, p. 455-459. 2001.
- GÖÇMEN. B.; DEHORITY. B.A.; RASTGELDI. S. The Occurrence of the Rumen Ciliate *Metadinium banksi* Dehority. 1985 (Ophryoscolecidae. Entodiniomorphida) from Domestic Goats (*Capra hircus* L.) in Southeastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, v.26, p.367-370. 2002.
- GÖÇMEN. B.; RASTGELDI. S. A New Rumen Ciliate from the Turkish Domestic Goat (*Capra hircus* L.): *Entodinium salmani* n.sp. (Entodiniidae. Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, v.28, p. 295-299. 2004.
- GÖÇMEN. B.; KARAOĞLU. A. Türkiye'nin Güneydogusunda Dagilis Gösteren Evcil Keçilerin (*Capra hircus* L.) Iskembesinde Yasayan Entodiniid (Entodiniidae. Entodiniomorphida) Siliyatlar. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v.29, p. 211-218. 2005.
- GRAIN. J.; SENAUD. J. New data on the degradation of fresh lucerne fragments by the rumen ciliate *Epidinium caudatum*; attachment, ingestion and digestion. **Canadian Journal of Animal** , v.64, (Suppl.): 26. 1984.
- GRAIN. J. Etude cytologique de quelques cillies holotriches endocommensaux des ruminants et des equides. **Protistologica**, v. 2, p. 59-141. 1966.
- GRUBY. D.; DELAFOND. O. Recherches sur des animalcules su developpant en gland nombre dans l'estomac et les intestines. pendant la digestion des animaux

- herbivores et carnivores. **Comptes Rendus de L'académie des Sciences**, v.17, p. 1304-1308. 1843.
- GURELLI. G.; GÖÇMEN. B. Intestinal ciliate composition found in the feces of the Turk rahvan horse *Equus caballus*. Linnaeus 1758. **European Journal of Protistology**, v.47, p.245–255. 2011.
- GULERI. G.; GÖÇMEN. B. ; YILDIZ. M.Z. Rumen Ciliates from the Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa*) living in the Şanlıurfa Province of Turkey. **Biharean Biologist**, v.6, p.42-44. 2012.
- GURUNG. Y.B. ; PARAJULI. N. ; MIYAZALI. Y. ; IMAI. S. ; KOBAYASHI. K. Rumen ciliate fauna of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and goat (*Capra hircus*) in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.265-267. 2002.
- IMAI. S.; CHANG. C.H.; WANG. J.S.; OGIMOTO. K.; FUJITA. J. Rumen ciliate protozoal fauna of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Taiwan. **The Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v.30, p.77-81. 1981.
- IMAI. S.; HAN. S.S.; CHENG. K.L.; KUDO. H. Composition of the rumen ciliate population in experimental herds of cattle and sheep in Leithbridge. Alberta. Wertern Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 686-690. 1989.
- IMAI. S.; MATSUMOTO. M.; WATANABE. A.; SATO. H. Rumen Ciliate Protozoa in Japanese Sika Deer (*Cervus Nippon centralis*). **Animal Science and Technology**, v.64, p.578-583. 1993.
- IMAI. S.; ABDULLAH.N.; HOB. Y.W.; JALALUDIN. S.; HUSSAIN. H.Y.; ONODERA. R.; KUDO. H. Comparative study on the rumen ciliate populations in small experimental herds of water buffalo and Kedah Kelantan cattle in Malaysia. **Animal Feed Science and Technology**, v.52, p. 345-351. 1995.
- IMAI. S.; MATSUMOTO. M.; WATANABE. A.; SATO. H. Establishment of a Spinated Type of *Diplodinium rangiferi* by Transfaunation of the Rumen Ciliates of Japanese Sika Deer (*Cervus nippon centralis*) to the Rumen of Two Japanese Shorthorn Calves (*Bos taurus taurus*). **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.38-41. 2002.
- IMAI. S.; SHINNO. T.; IKE. K.; MORITA. T.; SELIM. H.M. Fourteen Morphotypes of *Entodinium ovumrajae* (Ophryoscolecidae. Entodiniomorphida) Found in the Dromedary Camel of Egypt. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.51, p. 594-597. 2004.

- ITO. A.; IMAI. S.; OGIMOTO. K. Rumen ciliates of Ezo Deer (*Cervus nippon yesoensis*) with the morphological comparison with those of cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, p.93-98. 1993.
- ITO. A.; IMAI. S.; OGIMOTO. K. Rumen Ciliate Composition and Diversity of Japanese Beef Black Cattle in Comparison with Those of Holstein-Friesian Cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, p.707-714. 1994.
- ITO. A.; ARAI. N.; TSUTSUMI. Y. & IMAI. S. Ciliate protozoa in the rumen of sassaby antelope. *Damaliscus lunatus lunatus*. including the description of a new species and form. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p.586-591. 1997.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecoid ciliate. *Ostracodinium gracile* (Dogiel. 1925). observed by light microscopy. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p. 628-636. 1998.
- ITO. A.; MIYAZAKI. Y.; IMAI. S. Light microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium* ciliates. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48, p.440-448. 2001.
- ITO. A.; MIYAZAKI. Y.; IMAI. S. Descriptions of new Parentodinium ciliates in the family Parentodiniidae n.fam. from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodinio morphs from horses and cattle. **European Journal of Protistology**, v.37, p.405-426. 2002.
- ITO. A.; IMAI. S. Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.50, p.34-42. 2003.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliature and Morphogenesis in Three Rumen Diplodinium Ciliates. *Diplodinium polygonale*. *Diplodinium leche*. and *Diplodinium nanum*. Observed by Light Microscopy. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.52, p.44-51. 2005.
- ITO. A.; IMAI. S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecoid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v.17, p.103-110. 2006.
- KOFOID. C.A. & CHRISTENSON. J.F. Ciliates from *Bos-gaurus* H. smith. **University of California Publications in Zoology**, v. 33, p.471-544. 1933.
- KOFOID. C.A.; MACLENNAN. R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn. I. The genus *Entodinium* Stein. **University of California Publications in Zoology**, v.33, p.471-544. 1930.

- KOFOID. C.A.; MACLENNAN. R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, v.37, p.53-152. 1932.
- LATTEUR. B. Contribution a la systematique de la famille des Ophryoscolecidae. Stein. **Annales de la Societé Royale Zoologique de Belgique**. Tome 96. 1966.
- LENG. R.A.; GILL. M.; KEMPTON. T.J.; ROWE. J.B.; NOLAN. J.V.; STACHIW. S.J; PRESTON. T.R. Kinetics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle given sugar cane diets. **British Journal of Nutrition**, v.46, p. 371-384. 1981.
- LOPES. F.C.F.; AROEIRA. L.J.M.; ARCURI. P.B.; DAYRELL. M.S.; VITTORI. A. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-acúcar (*Saccharum officinarum* L.) adicionada de uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p. 180-188. 2002.
- LUDOVICO. A.; MATTOS. W.R.S. Avaliação de dietas à base de cana-de-acúcar (*Saccharum officinarum* L.) e diferentes níveis de semente de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p.403-410. 1997.
- LUBINSKY. G. Studies on the evolution of *Ophryoscolecidae* (Ciliata: Oligotricha).I. A new species of *Entodinium* with 'caudatum', 'loboso-spinosum' and 'dubardi' forms and some evolutionary trends in the genus *Entodinium*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 111-133. 1957a.
- LUBINSKY. G. Studies on the evolution of *Ophryoscolecidae* (Ciliata: Oligotricha).II. On the origin of the higher *Ophryoscolecidae*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 135-140. 1957b.
- LUBINSKY. G. Studies on the evolution of *Ophryoscolecidae* (Ciliata: Oligotricha).III. Phylogeny of the *Ophryoscolecidae* based on their comparative morphology. **Canadian Journal of Zoology**, v.35, p. 141-159. 1957c.
- LUBINSKY. G. Ophryoscolecidae (Ciliata: Entodiniomorpha) of the reindeer (*Rangifer Tarandus* L.) from the Canadian Arctic. II. Diplodiniinae. **Canadian Journal of Zoology**, v. 36, p.937-959. 1958.
- LYNN. D.H. The ciliated protozoa. Characterization. classification. and guide to the literature. 3rd ed. Springer. Dordrecht. 2008.
- MARINHO. A.A. Protozoários ciliados no rúmen de ovinos em pastoreio. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, v.78, p. 157-165. 1983.

- MARTINELE. I.; DETONI. M.L.; RUST. N.M.; D'AGOSTO. M. Protozoários ciliados (Protista. Ciliophora) no conteúdo do rúmen e do retículo de bovinos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.9, p.63-66. 2007.
- MARTINELE. I.; EIFERT. E.C.; LANA. R.P.; ARCURI. P.B.; D'AGOSTO. M. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1129-1136. 2008a.
- MARTINELE. I.; SIQUEIRA-CASTRO. I.C.V.; D'AGOSTO. M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p. 74-81. 2008b.
- MARTINELE. I.; SANTOS. G.R.A.; MATOS. D.S.; BATISTA. A.M.V.; D'AGOSTO. M. Protozoários ciliados do rúmen de ovinos mestiços mantidos em pastagem natural de Caatinga. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p. 280-292. 2008c.
- MARTINELE. I.; SANTOS. G.R.A.; MATOS. D.S.; BATISTA. A.M.V.; D'AGOSTO. M. Diet botanical composition and rumen protozoa of sheep in brazilian semi-arid area. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.169-175. 2010.
- MISHIMA. T.; KATAMOTO. H.; HORII. Y.; KAKENGI. V.A.M; ITO. A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle. *Bos Taurus indicus*. and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stoky* (Buisson. 1924). **European Journal of Protistology**, v.45, p.77-86. 2009.
- NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; OLIVEIRA. M.E.M.; VEIGA. J.S.H.; LUCCI. C.S. Observações pertinentes à instalação da fauna de protozoários ciliados no rúmen de bezerros de raça Holandesa (*Bos taurus* L.). criados em Pindamonhangaba. SP. Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.20, p.177-182. 1983.
- NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; OLIVEIRA. M.E.M.; VEIGA. J.S.M.; LUCCI. C.S. Cronologia do aparecimento de protozoários ciliados no rúmen de bezerros do tipo "Mantiqueira" (*Bos taurus* L.). na região do Vale do Rio Paraíba. SP. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.21, p.119-123. 1984.

- NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; OLIVEIRA. M.E.M.; LUCCI. C.S. Contribuição para o estudo dos efeitos do tratamento químico de suplementos protéicos sobre a fauna do rúmen de ovinos. **ARS Veterinária**, v.4, p. 143-148. 1988.
- NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; ZANETTI. M.A.; OLIVEIRA. M.E.M.; CUNHA. J.A. Efeitos de níveis crescentes de uréia na dieta de ovinos da raça Ideal sobre a população de protozoários ciliados no rúmen. **ARS. Veterinária**, v.15, p.130-134. 1999.
- NOIROT-TIMOTHÉE. C. Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoseoleeidae. Structures et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale**, v.2, p.527-718. 1960.
- OGIMOTO. K.; IMAI. S. **Atlas of Rumen Microbiology**. Tokyo. Japan Scientific Societies Press. 231p. 1981.
- OLIVEIRA. M.E.M.; NOGUEIRA-FILHO. J.C.M.; LUCCI. C.S.; LIMA. C.G. Desenvolvimento de populações de protozoários ciliados no rúmen de ovinos (*ovis aries* L.) criados em Itapetininga. São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.24, p.225-232. 1987.
- ORPIN. C.G. Association of rumen ciliate populations with plant particles in vitro. **Microbial Ecology**, v.11, p.59-69. 1985.
- PAPAVERO. N. **Fundamentos Práticos de Taxonomia Zoológica** (Coleções. Bibliografia e Nomenclatura). 2ed. São Paulo. Editora da Universidade Federal Paulista. 1994.
- RASTGELDİ. S.; GÖÇMEN. B. Türkiye Evcil Keçilerinde (*Capra hircus* L.) İşkembe Siliyatları. *Diplodinium crista-galli* ve *Diplodinium flabellum*'un (Entodiniomorpha) Bulunuşu. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v.27, p.287 -293. 2003.
- SELIM. H.M.; IMAI. S.; YAMATO. O.; EL KABBANY. A.; KIROLOSS. F.; MAEDE. Y. Comparative study of rumen ciliates in buffalo, cattle and sheep in Egypt. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v.58, p. 799-801. 1996.
- SELIM. H.M.; IMAI. S.; SHEIK. A.K.; ATTIA. H.; OKAMOTO. E.; MIYAGAWA. E. et al. Rumen ciliate protozoal fauna of native sheep, Friesian cattle and dromedary camel in Libya. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 61, p.303-305. 1999.

- SHARP. R.G. *Diplodinium ecaudatum* with an account of its neuromotor apparatus. **University of California Publications in Zoology**, v.13, p.43-122. 1914.
- SHIMIZU. M.; KINOSHITA. M.; FUJITA. J; IMAI. S. Rumen ciliate protozoal fauna and composition of the Zebu cattle, *Bos indicus*, and Water buffalo, *Bubalus bubalis*, in Philippines. **The Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v.30, p. 83-87. 1983.
- SILVA-NETO. I.D. Observations sur l'ultrastructure du Cilié Hétérotriche, *Licnophora auerbachii* Cohn, 1866, épibionte de l'étoile de mer. **Annales des Sciences Naturelles. Zoologie et biologie animale**, v.15, p.49-62. 1994.
- SILVA-NETO. I.D.; PAIVA. T.S.; DIAS. R.J.P.; CAMPOS. C.J.A.; MIGOTTO. A.E. Redescription of *Licnophora chattoni* Villeneuve-Brachon. 1939 (Ciliophora. Spirotrichea). associated with *Zyzyzus warreni* Calder. 1988 (Cnidaria. Hydrozoa). **European Journal of Protistology**, v. 48, p. 48–62. 2012.
- TAKENAKA. A.; D'SILVA. C.G; KUDO. H.; ITABASHI. H.; CHENG. K.J. Molecular cloning, expression, and characterization of an endo- β -1, 4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*. **Journal of General Applied Microbiology**, v.45, p. 57-61. 1999.
- TALARI. S.A. ARBABI. M.; TALARI. M.R. Ciliates of the Rumen of Domestic Ruminants in Kashan. **Archives of Razi Institute**, v. 57, p.121-126. 2004.
- VALINOTE. A.C.; NOGUEIRA FILHO. J.C.M.; LEME. P.R.; SILVA. S.L.; CUNHA. J.A. Fontes de Lipídeos e Monensina na Alimentação de Novilhos Nelore e sua Relação com a População de Protozoários Ciliados do Rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1418-1423. 2005.
- VALVASSORI. E.; C.S. LUCCI; J.C.M. NOGUEIRA FILHO; M.E.M. OLIVEIRA; J.R.P. ARCARO; F.L. PIRES & I. ARCARO JUNIOR. Ensaio de digestibilidade aparente da silagem de milho e cana-de-açúcar com ovinos: efeitos na população de protozoários ciliados no rúmen. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.33, p.97-101. 1996.
- WERTHEIM. P. A new ciliate. *Entodinium bovis* n.sp.. from the stomach of *Bos Taurus* L.. with the revision of *Entodinium exiguum*, *E. nanellum*, *E. simplex*, *E. dibardi dubardi* and *E. parvum*. **Parasitology**, v.27, p.226-230. 1935.
- WILLIAMS. A.G.; COLEMAN. G.S. *The rumen protozoa*. New York: **Springer** - Verlag New York Inc. 423p. 1992.

- WOLSKA. M. Remarks on the adoral ciliature in the order Entodiniomorpha. **Acta Protozoologica**, v.3, p.322-328. 1965.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung I. Preliminary remarks. **Acta Protozoologica**, v.4, p.97-104. 1966.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung II. *Charonina ventriculi* (Jameson). **Acta Protozoologica**, v.4, p.179-283. 1967.
- WOLSKA. M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung V. A review of genera and species. **Acta Protozoologica**, v.9, p.24-43. 1971.

SEÇÃO 2

APERFEIÇOAMENTO DA TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELO CARBONATO DE PRATA AMONICAL PARA PROTISTAS CILIADOS DO RÚMEN

RESUMO: O presente estudo propõe um aperfeiçoamento do método de impregnação do carbonato de prata amoniacal com piridina para protistas ciliados do rúmen, com o intuito de fornecer um protocolo único que impregne o maior número de táxons possível encontrados em bovinos e ovinos. Com a utilização do novo protocolo foi possível obter impregnação da infraciliatura oral e do aparato nuclear de todas as 36 espécies de protistas ciliados ruminais obtidas de amostras do rúmen de um bovino e um ovino alimentados com cana-de-açúcar. Comparando o protocolo estabelecido neste estudo com aqueles utilizados no estudo morfológico de ciliados do rúmen, observou-se maior rapidez e impregnação de maior espectro de gêneros e espécies de ciliados. O tempo de impregnação variou conforme tamanho e/ou táxon do ciliado, sendo menor para os pequenos entodiniomorphidas (<50 µm) e gênero *Dasytricha* (5 minutos) e maior para os grandes entodiniomorphidas (>50 µm) e gênero *Isotricha* (15-30 minutos). Entretanto, neste protocolo após 30 minutos de exposição aos reagentes a infraciliatura oral e somática de todos os táxons de ciliados contidos nas amostras apresentaram-se impregnados. O protocolo proposto é simples, rápido e fácil de ser reproduzido, sendo vantajoso para taxonomistas interessados em realizar estudos de levantamento de biota ruminal e para zootecnistas e ecólogos interessados em entender a estrutura da taxocenose de protistas ciliados ruminais.

Palavras-chaves: Ciliophora, impregnação pela prata, morfologia, técnica ciliatológica.

INTRODUÇÃO

A utilização de técnicas de impregnação pela prata é essencial para o estudo taxonômico em diversos grupos de protistas ciliados (FOISSNER, 1991; D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994; MA et al., 2003). No que diz respeito aos protistas ciliados do rúmen, a técnica de impregnação pelo carbonato de prata tem sido recomendada por diversos autores quando se objetiva a visualização das infraciliaturas oral e somática destes micro-organismos que constituem importantes caracteres espécie-específicos para muitos grupos (ITO & IMAI, 2006; MISHIMA et al., 2009).

A técnica de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina foi utilizada pela primeira vez por NOIROT-TIMOTHÉE (1956 a;b) em ciliados ruminais com intuito de descrever a infraciliatura oral dos gêneros *Epidinium* Crawley, 1923 e *Ophryoscolex* Stein, 1858. Entretanto, este protocolo foi descrito em detalhe anos depois, em estudo detalhado sobre a infraciliatura de outros gêneros da família Ophryoscolecidae (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960). O protocolo aprimorado desta técnica foi utilizado por FERNADEZ-GALEANO (1958, 1966, 1967) ao descrever a infraciliatura de *Cycloposthium edentatum* Strelkow, 1928 e *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel et Fedorowa, 1925). A infraciliatura oral e somática das famílias Isotrichidae e Blephacocorythidae também foram analisadas pelo método da prata amoniacal e descritas por WOLSKA (1966 a,b, 1967, 1971). Ao longo dos anos, o método do carbonato de prata amoniacal com piridina foi modificado inúmeras vezes, visando evidenciar aspectos da infraciliatura oral e somática em diferentes espécies nos mais diversos hospedeiros (AUGUSTIN et al.; 1984; FOISSNER, 1991, 1992; ITO & IMAI, 1998, 2000, 2003, 2006; ITO et al., 2001, 2006, 2008, 2011; MA et al., 2003).

O uso de técnicas de impregnação pela prata é essencial para a correta identificação dos ciliados ruminais visto a grande diversidade e complexidade morfológica destes micro-organismos. A organização da ciliatura somática e principalmente da ciliatura oral variam consideravelmente entre as espécies destes ciliados, sendo importante, portanto, descrever a ciliatura oral para maior número de espécies possível com objetivo de utilizá-la como diagnose, o que justifica a busca por protocolos de impregnação mais simples, rápido e mais abrangente.

O presente estudo objetivou aperfeiçoar os diferentes protocolos da técnica do carbonato de prata amoniacal com piridina para ciliados ruminais de modo a torná-lo mais simples, rápido e eficiente para o maior número de táxons possível.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas na Fazenda Experimental da Embrapa – Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG. Foram coletadas amostras de um bovino Holandês-Gir e de um ovino Morada Nova, ambos hospedeiros fistulados no rúmen. As amostras de conteúdo ruminal de cada animal foram obtidas, via fístula ruminal, do centro da massa do rúmen, armazenadas em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levadas ao Laboratório de Protozoologia (UFJF). No laboratório, o conteúdo ruminal foi filtrado em duas camadas de gaze e colocado em tubos do tipo Falcon de 15 mL. A seguir, o material foi centrifugado a 1300rpm durante 5 minutos, utilizando-se uma centrífuga sorológica de bancada, com intuito de separar os protistas do restante do conteúdo ruminal. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada amostra formado no interior do tubo foi destinado à técnica de impregnação pela prata.

Foram testados inicialmente três protocolos da técnica de impregnação pelo carbonato de prata previamente adaptados para o estudo dos ciliados ruminais (FERNANDEZ-GALEANO, 1976; ITO & IMAI, 1998; 2006). Foram realizadas modificações unindo informações destes protocolos visando elaborar um protocolo com menor número de passos e que fosse eficiente para o maior número de táxons possível, dentre as 36 espécies de ciliados do rúmen encontradas nas amostras.

Aprimoramento do método de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina:

- 1) Centrifugar as amostras frescas de conteúdo ruminal a 1300 rpm por 5 minutos;
- 2) Fixar o *pellet* das amostras com formalina 18,5% (v/v) (DEHORITY, 1984);
- 3) Em um tubo de ensaio, adicionar 3 gotas da amostra fixada (concentrada) e 4mL de água destilada;
- 4) Adicionar ao tudo de ensaio, ainda em temperatura ambiente, os seguintes reagentes em sequência: 4 gotas de piridina PA; 6 gotas de proteose-peptona bacteriológica 4%; 40 gotas de solução Rio-Hortega (FERNANDEZ-GALEANO, 1976). Neste momento, a solução torna-se branco leite;

- 5) Incubar o tubo de ensaio em banho-maria em temperatura variando entre 40°C a 70°C por aproximadamente 30 minutos. Após alguns minutos de incubação, a solução torna-se marrom transparente, e posteriormente marrom opaco, o que evidencia a impregnação pela prata;
- 6) Após 30 minutos de incubação, observar os ciliados entre lâmina e lamínula em microscopia óptica.

RESULTADOS

As principais características visualizáveis em ciliados ruminais, impregnados pelo carbonato de prata amoniacal, são a ciliatura oral e somática e o aparato nuclear. Estas características foram reveladas para amplo espectro de gêneros e espécies de ciliados ruminais usando o novo protocolo estabelecido no presente estudo. Todos os táxons registrados no bovino e ovino amostrados na Seção 1 foram impregnados usando o novo protocolo, ressaltando a abrangência desta proposta (Tabela 2 - Seção 1, pag. 45).

No Desenho 1 podemos observar alguns representantes das famílias Ophryoscolecidae e Isotrichidae, cuja infraciliatura oral e somática e o aparato nuclear apresentaram ótima impregnação. As diferenças entre o novo protocolo estabelecido e aqueles previamente adaptados para o estudo morfológico de ciliados do rúmen estão apresentadas na Tabela 8.

A primeira modificação no protocolo foi realizada na fixação das amostras. A fixação usando formalina 18,5% (DEHORITY, 1984) preservou a morfologia dos ciliados. Neste protocolo também foi testado o melhor momento para realizar a centrifugação dos ciliados, antes ou após a fixação. Visualmente não foram observadas alterações entre a realização da centrifugação antes ou após a fixação das amostras, o que ressalta a possibilidade do uso deste protocolo com amostras de conteúdo ruminal previamente fixadas e acondicionadas em formalina 18,5%, que é o modo mais comum de fixação e acondicionamento utilizados por zootecnistas e ecólogos interessados em avaliar o papel das interferências ambientais sobre a composição e dinâmica das populações de protistas ciliados ruminais.

Dentre os reagentes utilizados no novo protocolo foi aumentado apenas o número de gotas da solução Rio-Hortega. No presente estudo foram necessárias no mínimo 40 gotas desta solução para que a impregnação da infraciliautra oral e somática fosse evidenciada nos ciliados.

A etapa de incubação das amostras em banho-maria ocorreu em temperaturas que variaram de 40 a 70°C ao longo de 30 minutos. Visualmente, observou-se variação do tempo de incubação conforme o tamanho e/ou o gênero do ciliado. Para pequenos entodiniomorphidas (Desenho 1e-i) e para o gênero *Dasytricha* Schuberg, 1888 (Desenho 1a), a infraciliatura oral e somática foi impregnada em torno de cinco minutos, enquanto que para os grandes entodiniomorphidas (Desenho 1j-l) e para o gênero *Isotricha* Stein, 1859 (Desenho 1b-d), observou-se impregnação da infraciliatura oral e somática entre 15 e 30 minutos. As etapas de pós-incubação e interrupção da impregnação não foram necessárias neste novo protocolo, com a impregnação sendo interrompida somente com a retirada do tubo de ensaio do banho-maria e manutenção em temperatura ambiente (Tabela 8). Após o período de incubação (30 minutos) todos os grupos de ciliados já podem ser visualizados e fotografados em microscopia óptica.

DISCUSSÃO

Os protistas ciliados do rúmen constituem um grupo que apresenta ampla complexidade morfológica (WILLIAMS & COLLEMAN, 1992). Os caracteres mais relevantes utilizados na taxonomia do grupo são: tamanho e forma do corpo, organização das ciliaturas oral e somática, morfologia do vestíbulo e do aparato nuclear, a presença e número de placas esqueléticas, número e posição de vacúolos contráteis e presença/morfologia de projeções caudais (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLLEMAN, 1992). O estudo morfológico da infraciliatura oral e somática tem sido utilizado na caracterização deste grupo, ampliando as descrições específicas destes ciliados (ITO & IMAI, 1998, 2003, 2005; ITO et al., 2001; MISHIMA et al., 2009).

A impregnação da infraciliatura oral e somática em diversos grupos de ciliados tem sido realizada por meio da técnica do carbonato de prata amoniacal, cuja metodologia tem sido modificada ao longo dos anos e por diversos autores (FERNANDEZ-GALEANO 1976; AUGUSTIN et al.; 1984; FOISSNER, 1991; FOISSNER, 1992; ITO & IMAI, 1998, 2003, 2006; ITO et al., 2000, 2001, 2006, 2008, 2011; MA et al., 2003). No entanto, as principais metodologias referentes à impregnação pelo carbonato de prata, utilizadas em ciliados do rúmen, são aquelas propostas por FERNANDEZ-GALEANO (1976) e ITO & IMAI (1998, 2006).

O protocolo estabelecido por ITO & IMAI (1998) para ciliados do rúmen teve como objeto principal de estudo a caracterização das policinécias orais em

Ostracodinium gracile (Dogiel, 1925). Neste estudo foi descrito um novo padrão de infraciliatura oral denominado de padrão-*Ostracodinium gracile*, que é composto pelas policinécias adoral, dorsal, dorso-adoral, vestibular e cinécias paralabiais. Os mesmos autores, oito anos mais tarde, fizeram pequenas modificações no protocolo previamente estabelecido com intuito de ampliar a abrangência da técnica, impregnando grande número de táxons de ciliados ruminais da família Ophryoscolecidae (ITO & IMAI, 2006). Neste estudo foi apresentada uma revisão contendo os principais padrões de infraciliatura oral existentes em ciliados da família Ophryoscolecidae, são eles: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Ostracodinium gracile*, padrão-*Ostracodinium mammosum*, padrão-*Ostracodinium damaliscus*, padrão-*Epidinium*, padrão-*Ophryoscolex* (ITO & IMAI, 2006).

O novo protocolo proposto é mais simples, mais fácil de ser reproduzido e mais abrangente que aqueles estabelecidos por FERNANDEZ-GALEANO (1976) e ITO & IMAI (1998, 2006), tendo sido eficiente para todos os táxons de ciliados ruminais encontrados em bovino e ovino amostrados neste estudo (Tabela 2 - Seção 1, pag. 45). A praticidade do protocolo permite que seja utilizado por profissionais de diferentes áreas do conhecimento, diferente das outras laboriosas técnicas de impregnação pela prata necessárias ao estudo morfológico de outros grupos de ciliados. Assim sendo, a nova proposta de protocolo é vantajosa para taxonomistas interessados em realizar estudos de levantamento de biota ruminal e de taxonomia e para zootecnistas e ecólogos interessados em entender a estrutura da taxocenose de protistas ciliados ruminais.

CONCLUSÃO

O novo protocolo estabelecido é mais rápido e possui abrangência para maior número de táxons de ciliados ruminais do que aqueles protocolos previamente estabelecidos, sendo aplicável em estudos morfológicos e ecológicos destes micro-organismos.

Tabela 8. Comparação entre as etapas dos protocolos de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal previamente estabelecidos para o estudo com ciliados do rúmen e o novo protocolo estabelecido neste estudo.

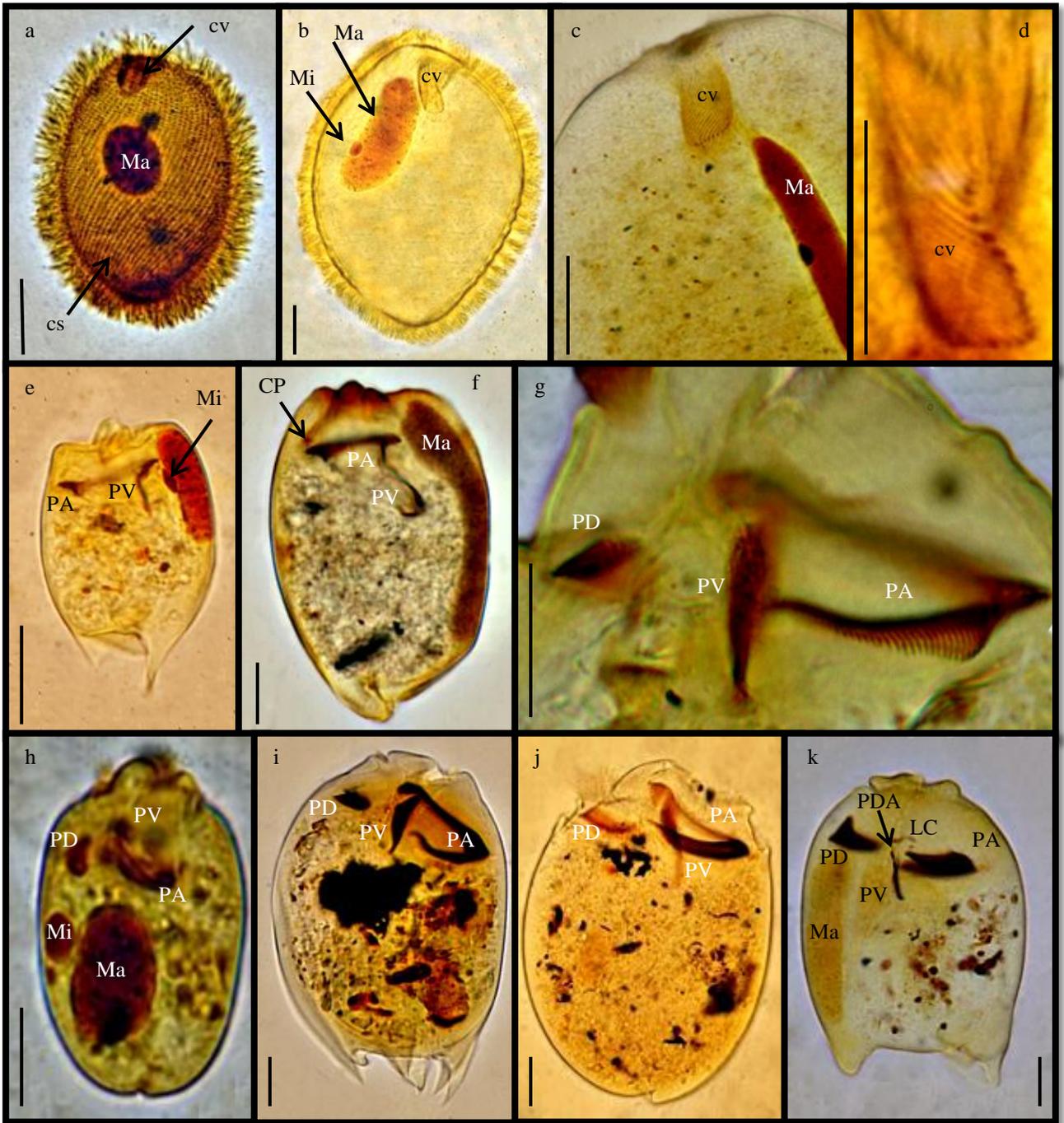
Etapas	Fernandez-Galiano, 1976	Ito & Imai, 1998	Ito & Imai, 2006	Presente Estudo
Fixação	Formalina PA (40%)	Solução MFS* (Ogimoto & Imai, 1981)	Solução MFS* (Ogimoto & Imai, 1981) ou Formalina 10%	Formalina 18,5% (Dehority, 1984)
Centrifugação	~	Após a fixação	Após a fixação	Antes ou após a fixação
Preparação para a técnica	~	2 gotas da amostra - tubo c/ 3mL água destilada	3 gotas da amostra - tubo c/ 4 a 6 mL água destilada	3 gotas da amostra - tubo c/ 4 mL água destilada
Adição dos Reagentes	10 gotas Piridina	3-5 gotas Piridina	4 gotas Piridina pura	4 gotas Piridina
	2mL Rio-Hortega	5-7 gotas Proteose Peptona	6 gotas Proteose Peptona 4%	6 gotas Proteose Peptona 4% (Foissner, 1991)
	10-15 gotas Proteose Petona 4%	Caixa fechada por 20 minutos	10 gotas Rio Hortega (Fernandez-Galiano, 1976)	40 gotas Rio-Hortega (Fernandez-Galiano, 1976)
	20 mL de água destilada	6-12 gotas de Rio-Hortega (Fernandez-Galiano, 1976)		
		Caixa fechada por 1-60 minutos		
Incubação	até 60°C	60-70°C por 5 a 20 minutos	60-70°C por 2 minutos	40°-70°C por 30minutos
Pós-incubação	~	7 ml água destilada	4-6mL água destilada	~
	~	Centrifugação em baixa rotação por 3 minutos	Centrifugação	~
Interrupção da reação	15mL Tiosulfato de sódio 5%	~	~	Diminuir a temperatura do banho-maria
	Lavar os ciliados com água destilada	~	~	~

* Solução MFS: = ^a100 mL de formaldeído 35%, ^b900 mL de água destilada, ^c0,6g de verde de metila e ^d8g de Cloreto de sódio.

Prancha X

Fotografia 1(a-k): Espécies de protistas ciliados do rúmen de bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova submetidos à técnica de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina aperfeiçoado no presente estudo: **a:** *Dasytricha ruminantium*; **b, c e d:** *Isotricha prostoma*; **e:** *Entodinium retangulatum retangulatum* **f:** *Entodinium longinucleatum longinucleatum*; **g:** *Diplodinium anisacanthum*; **h:** *Diplodinium polygonale*; **i:** *Diplodinium anisacanthum*; **j:** *Polyplastron multivesiculatum*; **k:** *Ostracodinium mammosum*.

Legendas: **cv:** cinécias vestibulares; **cs:** cinécias somáticas; **CP:** cinécias paralabiais; **Ma:** macronúcleo; **Mi:** micronúcleo; **PA:** policinécia adoral; **PD:** policinécia dorsal; **PDA:** policinécia dorso-adoral; **PV:** policinécia vestibular; **LC:** volta cinecial. Barras: 20µm.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTIN, H.; FOISSNER, W.; ADAM, H. An improved pyridinated silver carbonate method which needs few specimens and yields permanent slides of impregnated ciliates (Protozoa, Ciliophora). **Mikroskopie**, v.41, p. 134-137, 1984.
- D'AGOSTO, M.; SANTA-ROSA, M.R. Aspectos morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.11, p.215-225, 1994.
- DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, v.48, p.182-185, 1984.
- FERNANDEZ-GALEANO, D. La infraciliation en *Polyplastron multivesiculatum* y su generis durante la division del ciliado. **Ibid**, v. 56, p. 89-102, 1958.
- FERNANDEZ-GALEANO, D. Eu nouvelle méthode pour la mise em évidence de l'infraciliature des ciliés. **Protistologica**, v.2, p. 35-38, 1966.
- FERNANDEZ-GALEANO, D. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 95, p. 557-560, 1976.
- FOISSNER W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. **European Journal of Protistology**, v.27, p. 313-330, 1991.
- FOISSNER W. The silver carbonate methods. In: Protocols in protozoology (Eds. J. J. Lee and A. T. Soldo). **Society of Protozoologists**, Allen Press Inc. C7.1-7.3, 1992.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in the rumen ophryoscolecid ciliate *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.45, p.628-636, 1998.
- ITO, A.; IMAI, S. Ciliates from the Cecum of Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Bolivia 2. The Family Cycloposthiidae. **European Journal of Protistology**, v.36, p. 169-200, 2000.
- ITO, A., MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Light microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium* ciliates. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.48, p. 440-448, 2001.
- ITO, A., IMAI, S. Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium postero-vesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.50, p. 34-42, 2003.

- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliature and Morphogenesis in Three Rumen *Diplodinium* Ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche*, and *Diplodinium nanum*, Observed by Light Microscopy, **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.52, p.44–51, 2005.
- ITO, A., IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecoid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v.17, p.103–110, 2006.
- ITO, A.; HOVEN, W.V.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. New entodiniomorphid ciliates from the intestine of the wild African white rhinoceros belong to a new family, the *Gilchristidae*. **European Journal of Protistology**, 42, p. 297–307, 2006.
- ITO, A.; HOVEN, W.V.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Two new entodiniomorphid *Triplumaria* ciliates from the intestine of the wild African white rhinoceros. **European Journal of Protistology**, v.44, p. 149–158, 2008.
- ITO, A.; MISHIMA, T.; NATAAMI, K.; IKE, K.; IMAI, S. Infraciliature of eight *Triplumaria* species (Ciliophora, Entodiniomorpha) from Asian elephants with the description of six new species. **European Journal of Protistology**, v.47, p.256–273, 2011.
- MA, H.; CHOI, J.K.; SONG, W. An Improved Silver Carbonate Impregnation for Marine Ciliated Protozoa. **Acta Protozoologica**, v.42, p.161 – 164, 2003.
- MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORII, Y.; KAKENGI, V.A.M.; ITO, A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle, *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stoky* (Buisson, 1924). **European Journal of Protistology**, v.45, p.77–86, 2009.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Les structures infraciliaires chez les Ophryoscolecidae. I. Étude du genre *Epidinium* Crawley. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.242, p.1076-1078, 1956a.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Les structures infraciliaires chez les Ophryoscolecidae. II. Étude du genre *Ophryoscolex* Stein. **Ibid.**, v.242, p.2865-2867, 1956b.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures and ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v.12, p. 526-718, 1960.
- OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**, Tokyo, Japan Scientific Societies Press, 231p, 1981.
- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**, New York: Springer -Verlag New York Inc, 423p, 1992.

- WOLSKA, M. Application of the ammonium-silver impregnation method to the investigation of ciliates from the rumen of herbivorous mammals. **Acta Protozoologica**, v.6, p. 105-112, 1966a.
- WOLSKA, M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung I. Preliminary remarks. **Acta Protozoologica**, v.4, p.97-104, 1966b.
- WOLSKA, M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung II. *Charonina ventriculi* (Jameson). **Acta Protozoologica**, v.4, p.179-283, 1967.
- WOLSKA, M. Study on the family Blepharocorythidae Hsiung V, A review of genera and species, **Acta Protozoologica**, v.9, p.24-43, 1971.

SEÇÃO 3

ESTUDO FILOGENÉTICO DE REPRESENTANTES DA FAMÍLIA OPHRYOSCOLECIDAE Stein, 1859 (CILIOPHORA, LITOSTOMATEA) COM BASE NO GENE 18S-rDNA

RESUMO: Objetivou-se verificar se as três subfamílias de Ophryoscolecidae constituem grupos naturais e investigar se os diferentes padrões de infraciliatura oral presentes neste grupo refletem divergência evolutiva. No presente estudo obtivemos cinco novas sequências do gene 18S-rDNA para gênero *Ostracodinium*, sendo sua posição filogenética determinada com base em dados moleculares. Os principais resultados obtidos, após análises filogenéticas usando dois métodos de reconstrução filogenética (Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana), foram: ¹evidenciação da monofilia das subfamílias Entodiniinae e Ophryoscolecinae; ²a subfamília Diplodiniinae é considerada parafilética e confronta a classificação morfológica; ³os padrões de infraciliatura oral refletem divergência evolutiva na família Ophryoscolecidae; ⁴evidenciação da monofilia dos padrões de ciliatura oral padrão-*Entodinium*, padrão *Ostracodinium* (*Ostracodinium gracile* e *Ostracodinium mammosum*), padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex*; ⁵a condição ancestral do padrão-*Entodinium* sugerida por alguns autores não pôde ser comprovada usando informações do gene 18S-rDNA. As incongruências observadas entre os dados morfológicos e moleculares refletem a necessidade de se ampliar o número de sequências do gene 18S-rDNA para representantes da família Ophryoscolecidae, bem como de se investigar a evolução deste grupo usando outros marcadores moleculares.

Palavras-chaves: 18S-rDNA, filogenia molecular, infraciliatura oral, *Ostracodinium*, rúmen

INTRODUÇÃO

As análises moleculares, que utilizam sequências do gene 18S-rDNA, têm sido usadas de modo a confirmar ou contestar a taxonomia e sistemática de vários grupos de ciliados (WRIGHT et al., 1997; STRUDER-KYPTE et al., 2006, 2007; VD'ACNY et al., 2011a,b). No que diz respeito aos ciliados ruminais, a complexidade morfológica e a limitação de sequências descritas e depositadas em bancos de genes fazem com que o estudo filogenético deste grupo se modifique constantemente. Embora alguns trabalhos corroborem as propostas de classificação baseadas em dados morfológicos (CAMERON & O'DONOGHUE, 2004; CAMERON et al., 2001, 2003; KARNATI et al., 2003; SHIN et al., 2004; STRUDER-KYPKE et al., 2006, 2007; VD'ACNY et al., 2011 a,b), outros apresentam resultados diferentes daqueles inferidos pela morfologia (ITO et al., 2010).

A família Ophryoscolecidae Stein, 1859 foi dividida, com base na ciliatura oral, em três subfamílias (LUBINSKY, 1957c): Entodiniinae Lubinsky, 1957c (ciliatura composta por tufo único), Diplodiniinae Lubinsky, 1957c (duas zonas ciliares dispostas no mesmo plano corporal) e Ophryoscolecinae Lubinsky, 1957c (duas zonas ciliares dispostas em planos diferentes). Assim como a ciliatura oral, outras características foram utilizadas para diferenciar estas três subfamílias, tais como: número e disposição de vacúolos contráteis, presença, número e morfologia das placas esqueléticas e anatomia das projeções caudais (DOGIEL, 1947; LUBINSKY, 1957 a,b,c). Segundo DOGIEL (1947) e LUBINSKY (1957c), dentro da família Ophryoscolecidae os Entodiniinae¹ poderiam ser considerados plesiomórficos, visto sua zona ciliar única, único vacúolo contrátil, espinhos caudais pouco desenvolvidos e ausência de placas esqueléticas; os Ophryoscolecinae² o grupo mais derivado por apresentarem duas zonas ciliares, elevado número de vacúolos e placas esqueléticas, e projeções caudais desenvolvidas; e os Diplodiniinae³ um grupo intermediário, entretanto, esta hipótese sugerida não foi formulada com base em um estudo filogenético.

Estudos moleculares recentes com base em informações do gene 18S-rDNA têm evidenciado a monofilia da família Ophryoscolecidae (CAMERON et al., 2001, CAMERON et al., 2003; STRUDER-KYPKE et al., 2006; STRUDER-KYPKE et al., 2007), entretanto, a divisão desta família em três subfamílias Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae ainda não foi testada usando análises moleculares.

A infraciliatura oral tem sido investigada em detalhe em ciliados ruminais da família Ophryoscolecidae com objetivo ampliar os caracteres usados para diferenciar representantes deste grupo e auxiliar os estudos de taxonomia e sistemática (ITO & IMAI, 1998, 2003, 2006;

MISHIMA et al., 2009). A morfologia da infraciliatura oral nos Ophryoscolecidae, assim como outros caracteres morfológicos (vacúolo contrátil, placas esqueléticas, projeções caudais), é mais complexa nos Ophryoscolecinae, mais simples nos Entodiniinae e com complexidade intermediária nos Diplodiniinae, corroborando a hipótese evolutiva para as subfamílias sugerida por LUBINSKY (1957c). Embora haja alguns estudos moleculares atuais que investiguem se as diferenças entre os padrões de infraciliatura oral refletem divergência evolutiva nos ciliados ruminais da ordem Entodiniomorpha (ITO et al., 2010), esta informação ainda não foi investigada para representantes das três subfamílias que compõem a família Ophryoscolecidae.

Desta forma o presente estudo teve como objetivo ¹verificar se as três subfamílias de Ophryoscolecidae constituem grupos naturais, e ²investigar se os diferentes padrões de infraciliatura oral em Ophryoscolecidae refletem divergência evolutiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, identificação e fixação dos organismos

Com objetivo de obter espécies do gênero *Ostracodinium*, para extração de DNA, foram selecionadas cinco populações de protistas ciliados do rúmen com o intuito de obter sequências do gene 18S-rDNA (Prancha XI).

As amostras foram coletadas na Fazenda Experimental da Embrapa – Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG. Foi utilizado um bovino macho mestiço Holandês-Gir, pesando cerca de 450kg, fistulado no rúmen. As amostras de conteúdo ruminal foram obtidas, via fístula ruminal, do centro da massa do rúmen, armazenadas em garrafas térmicas previamente aquecidas à 39°C e conduzidas ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

No laboratório o conteúdo ruminal foi filtrado em duas camadas de gaze e colocado em tubos do tipo Falcon de 15 mL. A seguir, o material foi centrifugado a 1300rpm durante 5 minutos, utilizando-se uma centrífuga sorológica de bancada, com intuito de separar os protistas do restante do conteúdo ruminal. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada amostra formado no interior do tubo foi fixado com etanol 95%. As amostras foram conservadas em recipientes plásticos, identificadas e homogeneizadas. A seguir, alíquotas destas amostras foram analisadas em microscópio estereoscópico e os ciliados identificados e isolados. Foram isolados cerca de quinze indivíduos de cada uma das cinco espécies do gênero *Ostracodinium* sequenciadas no presente estudo. Estes ciliados foram

lavados exaustivamente em etanol para eliminação de impurezas e, em seguida, foram armazenados em tubos de 1,5mL para posterior extração de DNA genômico.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene 18S-rDNA

As extrações de DNA genômico foram realizadas utilizando o kit DNeasy® (Blood and Tissue - QIAGEN), seguindo as orientações do fabricante para extrações de tecidos animais. Os DNA's genômico extraídos foram estocados em freezer -20°C.

As reações de amplificação do gene-18S-rDNA foram realizadas em termociclador “Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700”, em tubos de 200µL, em um volume final de 50µL, contendo: 39,8µl de H₂O; 5µl de tampão 10X; 1,5µl de MgCl₂ (50mM); 0,5µl de DNTP (25mM); 1,0µL de cada iniciador (50µM); 0,25µL de Taq Platinum® DNA polimerase (Invitrogen)(5U/µL); 1,0µL de DNA genômico purificado. A ciclagem utilizada para as amplificações do 18S rDNA se inicia com: ¹um ciclo de 94°C por 2 minutos; seguido de ²35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 50°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores) e 72°C por 1 minuto (ativação da DNA polimerase); terminando com ³um ciclo de 72°C por 7 minutos para a finalização na polimerização de eventuais fitas inacabadas. Para a amplificação do gene 18S-rDNA foram utilizados iniciadores universais eukA e eukB (MEDLIN et al., 1988).

As reações de sequenciamento foram montadas empregando-se produtos de pelo menos quatro reações de PCR purificados para cada espécie de ciliado ruminal, utilizando o kit “GFX PCR DNA and gel band purification” (GE Healthcare). Para as reações de padrão de sequenciamento (reação final de 10µL) foram utilizados ¹150-500 ng de DNA em um volume máximo de 5,0 µL; ²4,0 µL da solução de reação do Kit de sequenciamento (DYEnami ET Dye terminator Cycle Sequencing Kit for Megabace DNA Analysis Systems, Amersham Biosciences); e ³2 pmoles do iniciador específico: euk A e eukB (MEDLIN et al., 1988), 384-F e 1147-R (DOPHEIDE et al., 2008). A ciclagem de sequenciamento consistiu de 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com 5µL de EDTA 125mM e 60µL de etanol absoluto. Estas amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 13000 rpm e, após retirada do sobrenadante, o DNA foi lavado com 150µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 4°C por 5 minutos a 13000 rpm. As amostras precipitadas foram secas e ressuspendidas em 10µL de formamida. Ao fim deste processo as amostras eram aplicadas no sequenciador ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems). O processamento das amostras, desde a extração do DNA genômico até a obtenção das sequências do gene 18S-rDNA foram

realizadas no Laboratório de Genética Molecular de Eucariotos e Simbiontes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em parceria com o grupo de pesquisa do Dr. Carlos Augusto Gomes Soares.

Alinhamento e análises filogenéticas

O conjunto de sequências utilizadas no presente estudo compreende representantes da classe Litostomatea Small & Lynn, 1981: subclasse Trichostomatia Butschli, 1889 (n=45), subclasse Haptoria Corliss, 1974 (n=1) (grupo externo 1) e subclasse Rhynchostomatia Jankowski, 1980 (n=1) (grupo externo 2) (Tabela 9). As sequências foram selecionadas levando em consideração os seguintes critérios: ¹sequências da família Ophryoscolecidae disponíveis no GenBank; ²um representante de cada família da subclasse Trichostomatia; ³sequência de um representante de cada uma das subclasses Haptoria e Rhynchostomatia; ⁴sequências com mais de 1000 pares de base foram selecionadas; ⁵sequências oriundas de estudos taxonômicos e morfológicos.

Essas sequências foram alinhadas pelo programa Clustal X 2.0. O alinhamento foi editado visualmente usando o programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999).

As análises filogenéticas, usando informações do gene ribossomal 18S-rDNA, foram realizadas empregando dois diferentes métodos de reconstrução filogenética: máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). O modelo evolutivo escolhido para a realização das análises filogenéticas, utilizando o programa JModelTest 0.1, foi GTR+I+G. As análises de máxima verossimilhança foram realizadas no programa PhyML 3.0 (GUINDON & GASCUEL, 2003) usando os métodos de busca randômica SPR & NNI a partir de 5 árvores aleatórias iniciais. Os valores de suporte foram estimados com 1000 réplicas no teste de “bootstrap”. Para a análise bayesiana a árvore foi inferida no programa MrBayes 3.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001) e a distribuição de probabilidades posteriores foi obtida com 65 mil gerações em duas corridas independentes, em quatro cadeias independentes, visitadas a cada 100 gerações. Destas amostragens 1% foi removida em cada corrida como “burn-in”. Os valores de suporte foram medidos pela probabilidade bayesiana posterior.

RESULTADOS

O número de pares de base das sequências do gene 18S-rDNA usadas no presente estudo, bem como das cinco novas sequências de cinco espécies do gênero *Ostracodinium*, estão apresentadas na Tabela 9. As árvores geradas pelos dois métodos de reconstrução filogenética (ML/IB) recuperaram a mesma hipótese filogenética em quase todos os ramos, havendo poucas incongruências (Desenhos 7-9).

Os representantes da família Ophryoscolecidae se agruparam em um clado monofilético nas árvores geradas pelos dois métodos de reconstrução, com elevados valores de suporte (84.7/100) (Desenho 7). Na hipótese filogenética apresentada nos desenhos 7 e 8 observou-se a formação de dois clados dentre os representantes da família Ophryoscolecidae, um deles contendo representantes das subfamílias Ophryoscolecinae + *Metadinium minorum* (Dehority, 1975) e Entodiniinae, e outro contendo representantes da subfamília Diplodiniinae.

Os representantes das subfamílias Ophryoscolecinae e Entodiniinae se agruparam em clados monofiléticos com elevados valores de suporte, 95/100 e 99/100, respectivamente (Desenho 8), ressaltando que estes grupos classificados com base em caracteres morfológicos provavelmente constituem grupos naturais. A posição filogenética de *Metadinium minorum* como grupo irmão de Ophryoscolecinae confronta a sistemática estabelecida com base em caracteres morfológicos, visto que o gênero *Metadinium* Awernzew et Mutafova, 1914 é um representante da subfamília Diplodiniinae. Os representantes da subfamília Diplodiniinae, com exceção de *M. minorum*, se agruparam em um clado com baixo valor de suporte utilizando o método de máxima verossimilhança e em ramos diferentes da árvore com base na reconstrução filogenética utilizando o método de inferência bayesiana (Desenho 7).

Os resultados obtidos na hipótese filogenética apresentada corroboram em parte a divisão da família Ophryoscolecidae em três subfamílias tal como proposto por LUBINSKY (1957c), visto que representantes das subfamílias Ophryoscolecinae e Entodiniinae se agruparam em clados monofiléticos, entretanto, os representantes da subfamília Diplodiniinae não apresentaram agrupamento único (Desenho 8). Assim sendo, fica clara a necessidade de se ampliar o número de sequências do gene 18S-rDNA para representantes da família Ophryoscolecidae bem como de se investigar a evolução deste grupo usando outros marcadores moleculares.

Com base nas análises das hipóteses filogenéticas sobre os padrões de infraciliatura oral, apresentadas no Desenho 9 pode-se concluir que a morfologia da infraciliatura oral em Ophryoscolecidae (ITO & IMAI, 2006) reflete genuína divergência evolutiva. Dentre as

sequências de representantes de Ophryoscolecidae disponíveis no Genbank e aquelas produzidas no presente estudo foram identificados seis padrões gerais de infraciliatura oral: padrão-*Diplodinium*, padrão-*Ostracodinium* (*Ostracodinium gracile* e *Ostracodinium mammosum*), padrão-*Entodinium*, padrão-*Ophryoscolex*, e padrão-*Epidinium*.

Os clados formados na árvore apresentada no desenho 9 ressaltam a importância da caracterização da infraciliatura oral na sistemática de Ophryoscolecidae. A posição da espécie *Metadinium minorum* próximo aos representantes do padrão-*Ophryoscolex* não condiz com a morfologia da infraciliatura oral deste ciliado descrita na Seção 1 como pertencente ao padrão-*Diplodinium* (Página 46, Prancha VIIg). Entretanto, não descartamos a possibilidade de erro na identificação deste ciliado durante o trabalho realizado por TYMENSEN et al. (2012). Estes autores realizaram o processo de extração de DNA em ciliados fixados em etanol 70% e isolados individualmente em microscópio estereoscópio. No entanto, a identificação do gênero *Metadinium* requer técnicas ciliatólogicas que evidenciem caracteres altamente relevantes na caracterização destas espécies, tais como morfologia do aparato nuclear e das placas esqueléticas e posição de vacúolos contráteis. Em amostras fixadas em etanol e analisadas sob microscópio estereoscópio, estes caracteres não são visualizados de forma clara, ressaltando assim a possibilidade de equívoco na identificação do referido ciliado (TYMENSEN et al., 2012).

Os ramos referentes aos padrões padrão-*Ostracodinium* (94/100), padrão-*Entodinium* (99/100), padrão-*Ophryoscolex* (99/100) e padrão-*Epidinium* (90/100) apresentaram elevados valores de suporte, ressaltando a congruência entre dados da morfologia da infraciliatura oral e sequências do gene 18S-rDNA.

O clado contendo os representantes de Ophryoscolecidae que apresentam padrão-*Ostracodinium* (Desenho 9) se agrupou entre clados que apresentam padrão-*Diplodinium* o que sugere que o padrão-*Ostracodinium* é uma derivação sutil do padrão-*Diplodinium*, tal como sugerido pela morfologia (ITO et al., 2001; ITO & IMAI, 1998, 2006).

O ramo referente ao padrão-*Ostracodinium* apresentou-se monofilético com elevados valores de suporte indicando congruência entre a morfologia da infraciliatura oral e as sequências do gene 18S-rDNA. O clado contendo espécies do gênero *Ostracodinium* se dividiu em dois clados diferentes, um deles contendo a espécie *Ostracodinium dentatum* (Fiorentini, 1889) e outro contendo os demais representantes do gênero. As sequências de *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), *Ostracodinium dogieli* (Dogiel, 1927) e *Ostracodinium clipeolum* Kofoid and MacLennan, 1932, obtidas neste estudo e, que segundo a morfologia pertencem ao padrão-*Ostracodinium gracile*, se agruparam com as demais

sequências de *Ostracodinium* disponíveis no Genbank e, que também estão inseridas neste padrão. Entretanto, neste agrupamento contendo espécies do gênero *Ostracodinium*, pela grande semelhança entre as sequências, não foi possível esclarecer em detalhe a relação filogenética entre os táxons, com exceção de *Ostracodinium rugoloricatum* Kofoid and MacLennan, 1932 e *Ostracodinium monolobum* (Dogiel, 1927). Estas duas últimas espécies formaram um clado entre as espécies do padrão-*Ostracodinium gracile*. A espécie *O. rugoloricatum* está incluída no padrão-*Ostracodinium mammosum*, sugerindo que a formação deste clado, com exceção da presença de *O. monolobum*, está de acordo com a proposta morfológica, a qual sugere que o padrão-*Ostracodinium mammosum* é uma modificação do padrão-*Ostracodinium gracile* (Ito & Imai, 2006). A posição de *O. monolobum* como grupo irmão de *O. rugoloricatum* e o agrupamento das espécies do padrão-*Ostracodinium gracile* com distâncias evolutivas praticamente ausentes, ressalta a necessidade de se obter mais sequências do gene 18S-rDNA para este gênero, e principalmente de se utilizar outros marcadores moleculares, visto que os gene 18S-rDNA não apresentou boa resolução para explicar as relações filogenéticas dentro do gênero *Ostracodinium*.

DISCUSSÃO

Sistemática morfológica x Filogenia molecular

A ciliatofauna ruminal possui representantes em duas ordens dentro da Classe Litostomatea: Vestibulifera e Entodiniomorphida. A ordem Vestibuliferida é representada na sua grande maioria por endossimbiontes de mamíferos herbívoros placentários (CORLISS, 1979). No ambiente ruminal esta ordem está representada pela família Isotrichidae que apesar de ser constituída por poucas espécies, pode ser frequentemente observada em ruminantes domésticos (WILLIAMS & COLLEMAN, 1992). A ordem Entodiniomorphida se caracteriza pela riqueza de espécies e apresenta três sub-ordens: Archistomatina, Blepharocorythina, e Entodiniomorphina. As duas primeiras são representadas por uma família cada e são observadas principalmente em cavalos, camelos, elefantes e hipopótamos, com algumas espécies ocorrendo também em bovinos e roedores. A terceira sub-ordem, Entodiniomorphina, compreende muitas famílias, sendo Ophryoscolecidae aquela com maior riqueza de espécies, levando em consideração o número de espécies de ciliados ruminais.

A família Ophryoscolecidae Stein 1859 é constituída por uma gama de protistas ciliados que apresentam alta diversidade morfológica, sendo por isso, agrupados em três subfamílias: Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae (LUBINSKY, 1957c).

A subfamília Entodiniinae é caracterizada por apresentar uma única zona de ciliatura, a zona de ciliatura adoral e, um único vacúolo contrátil. O macronúcleo é localizado, entre o micronúcleo e a membrana corporal. Esta subfamília é composta somente pelo gênero *Entodinium* (LUBINSKY, 1957c).

A subfamília Diplodiniinae apresenta duas zonas de ciliatura, a zona de ciliatura adoral e uma acessória, denominada zona de ciliatura dorsal, situadas no mesmo plano transversal. Dois ou mais vacúolos contráteis estão presentes e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal. As placas esqueléticas podem estar presentes ou não. Esta subfamília inclui grande parte dos gêneros de ciliados que ocorrem comumente no ambiente ruminal. São eles: *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Polyplastron*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron* e *Ostracodinium* (LUBINSKY, 1957c).

A subfamília Ophryoscolecinae também apresenta duas zonas de ciliatura, porém em planos transversais diferentes. Todos os ciliados apresentam placas esqueléticas, dois ou mais vacúolos contráteis e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal (LUBINSKY, 1957c).

Segundo LUBINSKY (1957c) dentro de Ophryoscolecidae a subfamília Entodiniinae é o grupo ancestral, Diplodiniinae um grupo intermediário e Ophryoscolecinae o grupo mais derivado, conforme caracteres morfológicos estudados pelo autor, tais como: número e a posição da ciliatura oral, número de vacúolos contráteis e presença de placas esqueléticas. Esta relação de aumento de complexidade estrutural versus grupos ancestrais e derivados em Ophryoscolecidae foi posteriormente comprovada em estudos ultraestruturais (FURNESS & BUTLER, 1988). O grupo derivado possui maior complexidade no aparato bucal e conseqüentemente é apto a ingerir fibras maiores, como é o caso do gênero *Epidinium* KOFOID & MACLENNAN, 1923 (subfamília Ophryoscolecinae), o grupo intermediário ingere fibras contendo fragmentos de tamanho intermediários, como é o caso do gênero *Polyplastron* DOGIEL, 1927 (subfamília Diplodiniinae), e os representantes da subfamília Entodiniinae ingerem fibras vegetais menores e bactérias. Entretanto, todas estas inferências são subjetivas, visto que não utilizam métodos filogenéticos para sua comprovação.

Embora alguns estudos moleculares, usando sequências do gene 18S-rDNA, tenham recuperado a divisão de Ophryoscolecidae em três subfamílias (WRIGHT & LYNN, 1997

a,b; WRIGHT et al., 1997 a,b; CAMERON & O'DONOGHUE, 2004; CAMERON et al., 2001, 2003; KARNATI et al., 2003; SHIN et al., 2004; STRUDER-KYPKE et al., 2006, 2007; MODRY et al., 2009; VDACNY et al., 2011 a,b; KITTELMANN & JANSSEN, 2011), outros apresentam topologias diferentes da classificação morfológica (ITO et al., 2010; LENG et al., 2011; SINGH et al.; 2011; SHELLING et al., 2011). Dentre todos estes estudos que utilizam sequências de Ophryoscolecidae em suas análises, o presente estudo é pioneiro ao atribuir enfoque específico às relações filogenéticas dentro desta família.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram em parte a divisão da família Ophryoscolecidae em três subfamílias tal como proposto por LUBINSKY (1957c). Os representantes das subfamílias Ophryoscolecinae e Entodiniinae se agruparam em clados monofiléticos, com elevados valores de suporte. Entretanto, os representantes da subfamília Diplodiniinae não apresentaram agrupamento único (Desenho 8), visto que *M. minorum* se agrupou com a subfamília Ophryoscolecinae. Além disso, com exceção de *M. minorum*, os representantes da subfamília Diplodiniinae se agruparam em um clado com baixo valor de suporte. Esta condição parafilética de Diplodiniinae (Desenho 8) também foi observada por SHELLING et al. (2011) ao estudar outros ciliados entodiniomorphidas no intestino de equinos. Assim sendo, fica clara a necessidade de se ampliar o número de sequências do gene 18S-rDNA para representantes da família Ophryoscolecidae, além de investigar a evolução deste grupo usando outros marcadores moleculares.

Evolução da infraciliatura oral

Os padrões de infraciliatura oral em ciliados do rúmen foram inicialmente descritos por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) para a família Ophryoscolecidae e por WOLSKA (1965, 1966, 1967, 1971) para as famílias Blepharocorythidae e Isotrichidae.

São escassos os estudos que utilizam a infraciliatura oral para explicar as relações filogenéticas dos ciliados ruminais baseadas em dados moleculares (CAMERON et al., 2003; ITO et al., 2010). Com base na morfologia da ciliatura oral, WOLSKA (1971) postulou uma hipótese sobre as relações filogenéticas dentro da ordem Entodiniomorphida, sugerindo que a família Blepharocorythidae seria um clado ancestral em relação à Ophryoscolecidae + Cycloposthiidae, e que estas duas famílias formassem juntas um clado terminal dentro da ordem. A proximidade da família Ophryoscolecidae e Cycloposthiidae encontrada no presente estudo (Desenho 9), também foi observada por CAMERON et al. (2003) e ITO et al. (2010),

sendo explicada por duas características morfológicas que essas famílias apresentam em comum: a policinécia adoral em forma de alça circundando a abertura vestibular e a policinécia vestibular descendente (FERNANDEZ-GALEANO, 1959; FERNÁNDEZ-GALEANO et al., 1985).

A infraciliatura oral em ciliados ruminais possui diferenças quanto ao número, presença e morfologia das policinécias. Atualmente, existem 12 padrões de infraciliatura oral descritos para representantes da família Ophryoscolecidae: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Diplodinium polygonale*, padrão-*Diplodinium leche*, padrão-*Diplodinium nanum*, padrão-*Eodinium posterovesiculatum*, padrão-*Ostracodinium gracile*, padrão-*Ostracodinium mammosum*, padrão-*Ostracodinium damaliscus*, padrão-*Enoploplastron stoky*, padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex* (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FERNÁNDEZ-GALEANO, 1958; ITO et al., 1997, 2001, 2002, ITO & IMAI, 1998, 2003, 2005, 2006; MISHIMA et al., 2009). Dentre as espécies de ciliados ruminais da família Ophryoscolecidae com sequências do gene 18Sr-DNA disponíveis no GenBank existem somente seis padrões de infraciliatura oral, conforme os 12 padrões estabelecidos.

A infraciliatura oral, tendo em vista sua diversidade morfológica em protistas ciliados, tem sido utilizada como mais uma importante característica morfológica para explicar a posição filogenética de algumas famílias da Ordem Entodiniomorpha. Entretanto, nenhum estudo enfatizou essa relação para a família Ophryoscolecidae, sendo o presente trabalho pioneiro neste aspecto. De acordo com as análises filogenéticas apresentadas neste estudo, pode-se concluir que a morfologia da infraciliatura oral em Ophryoscolecidae (ITO & IMAI, 2006) reflete genuína divergência evolutiva. Os ramos referentes aos padrões padrão-*Ostracodinium* (*Ostracodinium gracile* e *Ostracodinium mammosum*), padrão-*Entodinium*, padrão-*Ophryoscolex* e padrão-*Epidinium* apresentam congruência entre dados da morfologia da infraciliatura oral e sequências do gene 18S-rDNA.

O clado contendo os representantes do padrão-*Ostracodinium* (Desenho 9) se agrupou entre clados que apresentam padrão-*Diplodinium* o que sugere que o padrão-*Ostracodinium* é uma modificação sutil do padrão-*Diplodinium*. Este fato corrobora dados morfológicos que sugerem que o padrão-*Ostracodinium* teria evoluído do padrão-*Diplodinium*, levando em consideração a presença de uma terceira policinécia oral, a policinécia dorso-adoral e a morfologia da policinécia vestibular (ITO et al 2001; ITO & IMAI, 1998, 2006). A presença do padrão-*Ostracodinium mammosum*, representado pela espécie *O. rugoloricatum* entre os representantes do padrão-*Ostracodinium gracile* também é congruente com a hipótese

evolutiva com base na morfologia, sugerindo a evolução do padrão-*Ostracodinium mammosum* a partir do padrão-*Ostracodinium gracile*. Neste caso, as modificações teriam ocorrido na morfologia do vestíbulo e na presença de um alça de cinécias ligando a policinécia adoral a policinécia dorso-adoral (Desenho 3, g-i, pág. 24).

O clado contendo o padrão-*Epidinium* apresentou-se como grupo irmão do padrão-*Ophryoscolex*, confrontando a hipótese evolutiva entre estes padrões proposta por ITO & IMAI (2006). O clado formado pelo padrão-*Entodinium* também não corroborou tal hipótese, visto que o padrão-*Entodinium* com base na análise do gene 18S-rDNA não pode ser considerado ancestral em relação ao demais padrões.

Estas observações ressaltam a necessidade de mais estudos envolvendo a infraciliatura oral, visto que são poucos os gêneros que apresentam infraciliatura oral descrita com base na morfologia e com sequências disponíveis em bancos de genes.

CONCLUSÃO

A hipótese filogenética apresentada sugere a monofilia das subfamílias Entodiniinae e Ophryoscolecinae, constituindo portando grupos naturais com base em caracteres morfológicos e análise do gene 18S-rDNA. A subfamília Diplodiniinae apresenta-se parafilética, confrontando a classificação morfológica.

As diferenças entre os padrões de infraciliatura oral refletem divergência evolutiva para a família Ophryoscolecidae.

Os padrões padrão-*Entodinium*, padrão *Ostracodinium* (*Ostracodinium gracile* e *Ostracodinium mammosum*), padrão- *Epidinium*, padrão-*Ophryoscolex* são monofiléticos e constituem grupos naturais.

A hipótese do surgimento posterior do padrão-*Ostracodinium* a partir do padrão ancestral padrão-*Diplodinium* não pode ser descartada com base nas análises moleculares deste estudo, entretanto, o possível caráter ancestral do padrão-*Entodinium* não pôde ser comprovado.

Tabela 9. Classificação das espécies (LYNN, 2008; VD'ACŇNÝ et al, 2011), número de acesso e de pares de base das sequências do gene 18S-rDNA de ciliados das subclasses Rhynchostomatia (grupo externo), Haptoria (grupo externo) e Trichostomatia. As sequências nucleotídicas das espécies obtidas no presente estudo estão marcadas em negrito.

Espécies	Número de acesso	Número de pb
Litostomatea		
Rhynchostomatia		
Dimacrocaryonidae		
<i>Dileptus terrenus</i>	HM581674	1639
Haptoria		
Litonotidae		
<i>Loxophyllum rostratum</i>	DQ411864	1623
Trichostomatia		
Isotrichidae		
<i>Isotricha intestinalis</i>	U57770	1639
<i>Isotricha prostoma</i>	AF029762	1641
<i>Dasytricha ruminantium</i>	U57769	1638
Blepharocorithidae		
<i>Blepharocorys curvigula</i>	AB534184	1643
Cycloposthidae		
<i>Cycloposthium edentatum</i>	EF632077	1558
<i>Triplumaria selênica</i>	AB533538	1639
Ophryoscolecidae		
<i>Entodinium nanellum</i>	AM158449	1642
<i>Entodinium bursa</i>	AM158448	1638
<i>Entodinium dubardi</i>	AM158443	1638
<i>Entodinium simplex</i>	AM158466	1647
<i>Entodinium furca dilobum</i>	AM158442	1639
<i>Entodinium furca monolobum</i>	AM158450	1640
<i>Entodinium longinucleatum</i>	AB481099	1594
<i>Entodinium caudatum</i>	U57765	1639
<i>Eudiplodinium rostratum</i>	AB536716	1591
<i>Eudiplodinium maggii</i>	U57766	1637
<i>Diplodinium dentatum</i>	U57764	1638
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	U57767	1639
<i>Epidinium ecaudatum fascículos</i>	AM158465	1637
<i>Epidinium ecaudatum caudatum</i>	AM158474	1637
<i>Epidinium caudatum</i>	U57763	1639
<i>Ophryoscolex caudatum</i>	AM158467	1635
<i>Ophryoscolex purkynjei</i>	U57768	1636
<i>Ostracodinium gracile</i>	AB535662	1594

(continuação...)

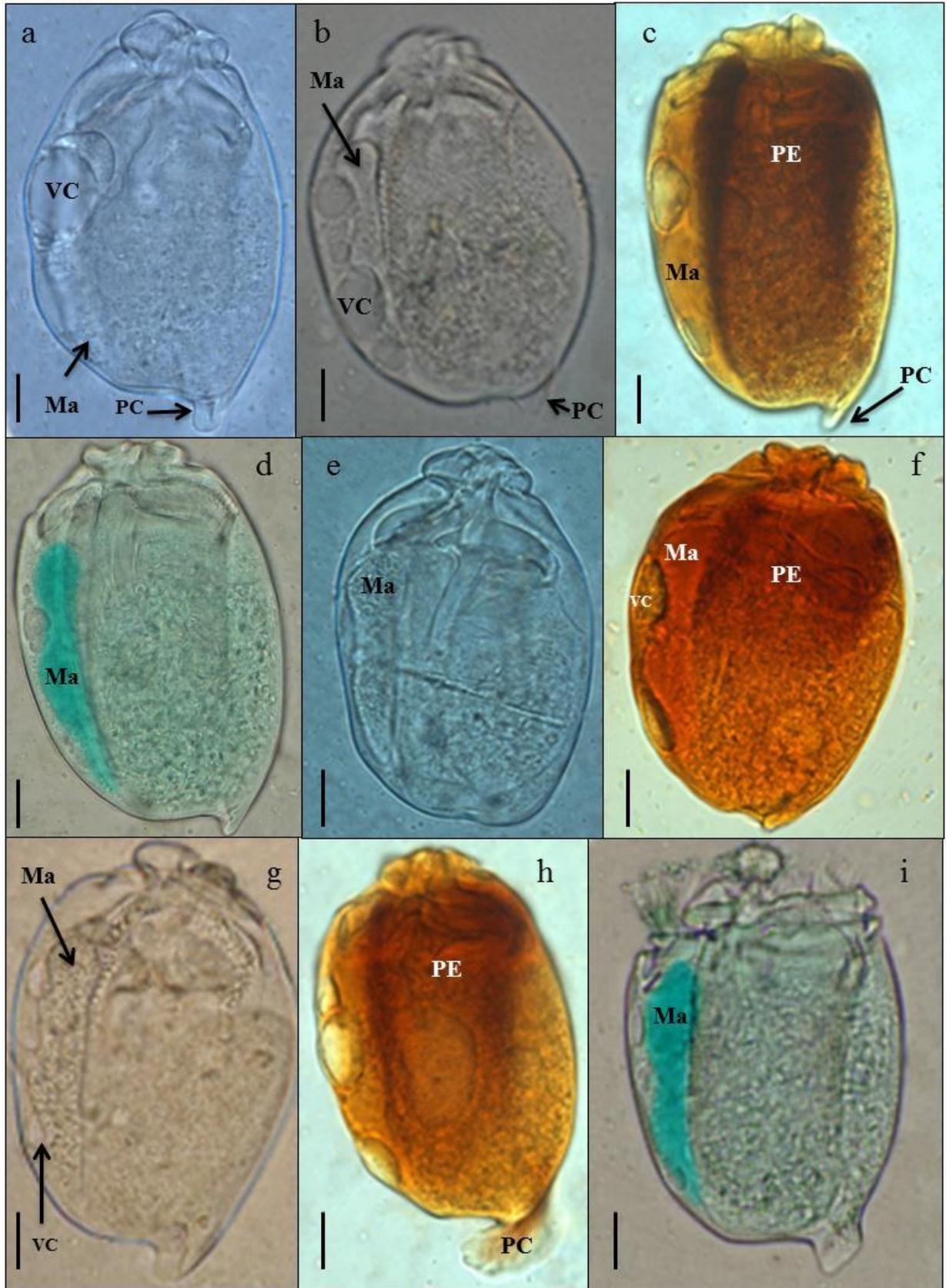
(continuação...)

Tabela 9. Classificação das espécies ((Lynn, 2008; Vd'áčný et al, 2011), número de acesso e de pares de base das sequências do gene 18S-rDNA de ciliados das subclasses Rhynchostomatia (grupo externo), Haptoria (grupo externo) e Trichostomatia. As sequências nucleotídicas das espécies obtidas no presente estudo estão marcadas em negrito.

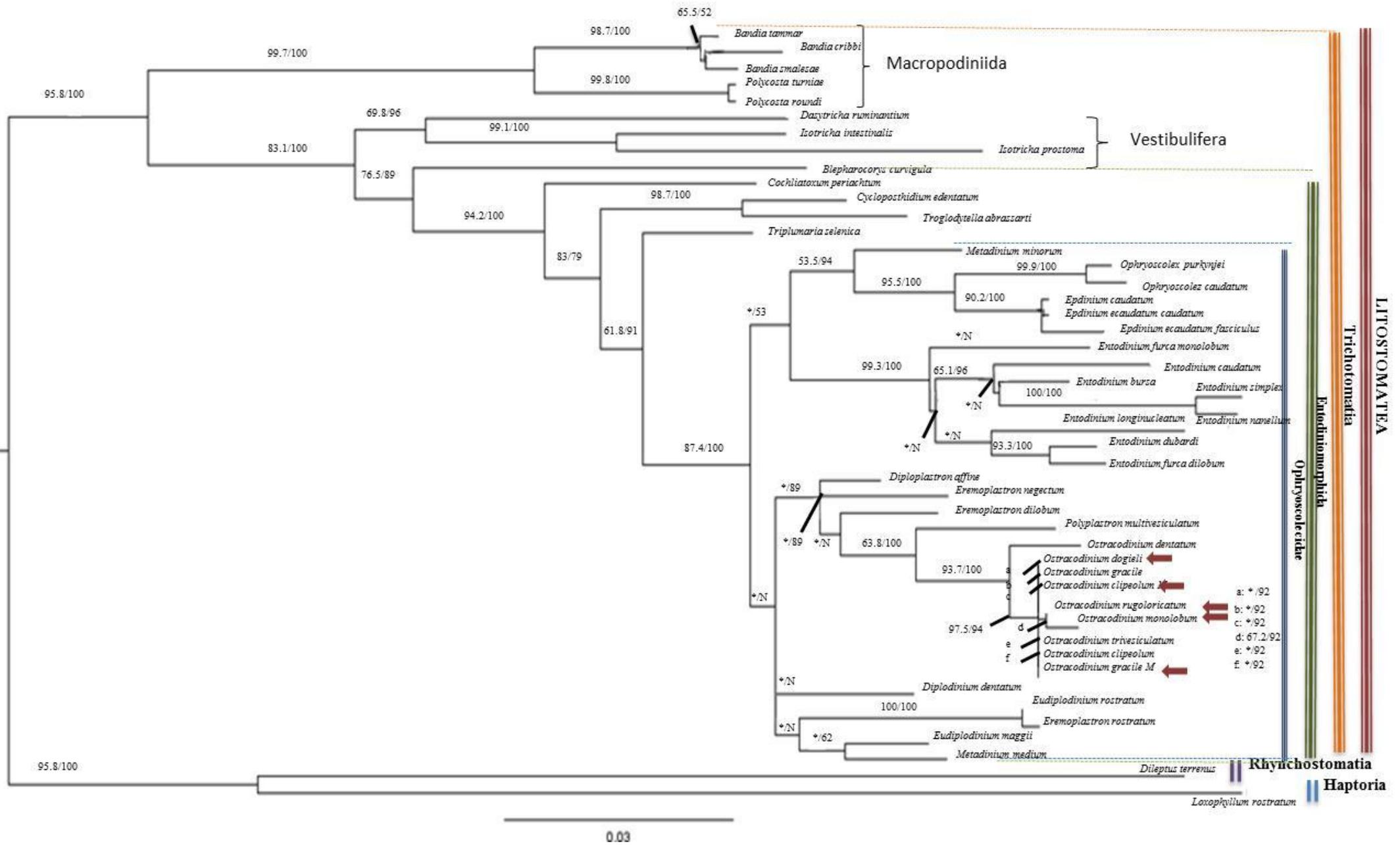
<i>Ostracodinium gracile M</i>	nova sequência	1530
<i>Ostracodinium trivesiculatum</i>	AB536718	1594
<i>Ostracodinium clipeolum</i>	AB536717	1595
<i>Ostracodinium clipeolum M</i>	nova sequência	1503
<i>Ostracodinium dogieli</i>	nova sequência	1552
<i>Ostracodinium monolobum</i>	nova sequência	1532
<i>Ostracodinium rugoloricatum</i>	nova sequência	1475
<i>Ostracodinium dentatum</i>	AM158460	1637
<i>Eremoplastron dilobum</i>	AM158472	1637
<i>Eremoplastron rostratum</i>	AM158469	1635
<i>Eremoplastron neglectum</i>	AM158473	1637
<i>Diploplastron affine</i>	AM158457	1637
<i>Metadinium médium</i>	AB535215	1593
<i>Metadinium minorum</i>	JN116224	1634
Spirodiniidae		
<i>Cochliatoxum periachtum</i>	EF632078	1557
Troglodytelliidae		
<i>Troglodytella abrassarti</i>	EU680307	1316
Macropodiniidae		
<i>Polycosta turniae</i>	AF298818	1642
<i>Polycosta roundi</i>	AF298819	1641
Amylovoracidae		
<i>Bandia smalesae</i>	AF298822	1640
<i>Bandia tammar</i>	AF298823	1642
<i>Bandia cribbi</i>	AF298824	1643

Prancha XI

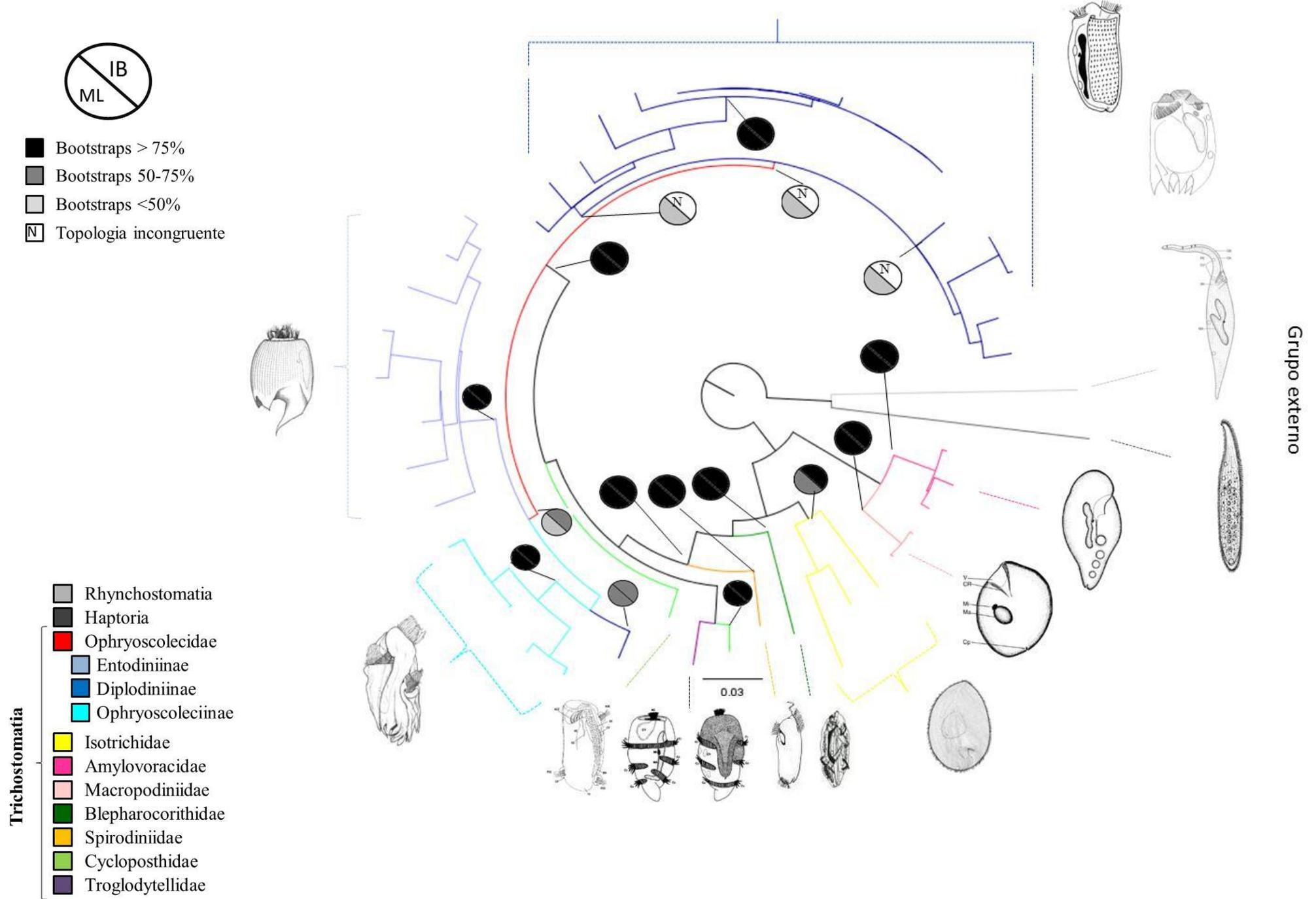
Fotografias a-i: Espécies de protistas ciliados do rúmen de bovino Holandês-Gir sequenciadas no presente estudo; **a:** *Ostracodinium dogieli*; **b:** *Ostracodinium monolobum*; **c-d:** *Ostracodinium rugoloricatum*; **e-f:** *Ostracodinium gracile*; **g-i:** *Ostracodinium clipeolum*. Barras: 20µm.



Desenho 7: Árvore filogenética de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA. As subclasses Rhynchostomatia e Haptoria foram escolhidas como grupos-externo. Os valores em cada nó da árvore significam respectivamente: bootstrap da análise de máxima verossimilhança (ML); valores de probabilidade posterior da inferência bayesiana (BI). A sigla N indica incogruência na topologia usando determinado método de reconstrução filogenética e o (*) indica valor de bootstrap<50%. As novas sequências de ciliados do rúmen de bovino Holandês-Gir obtidas no presente estudo estão destacadas em vermelho (setas).



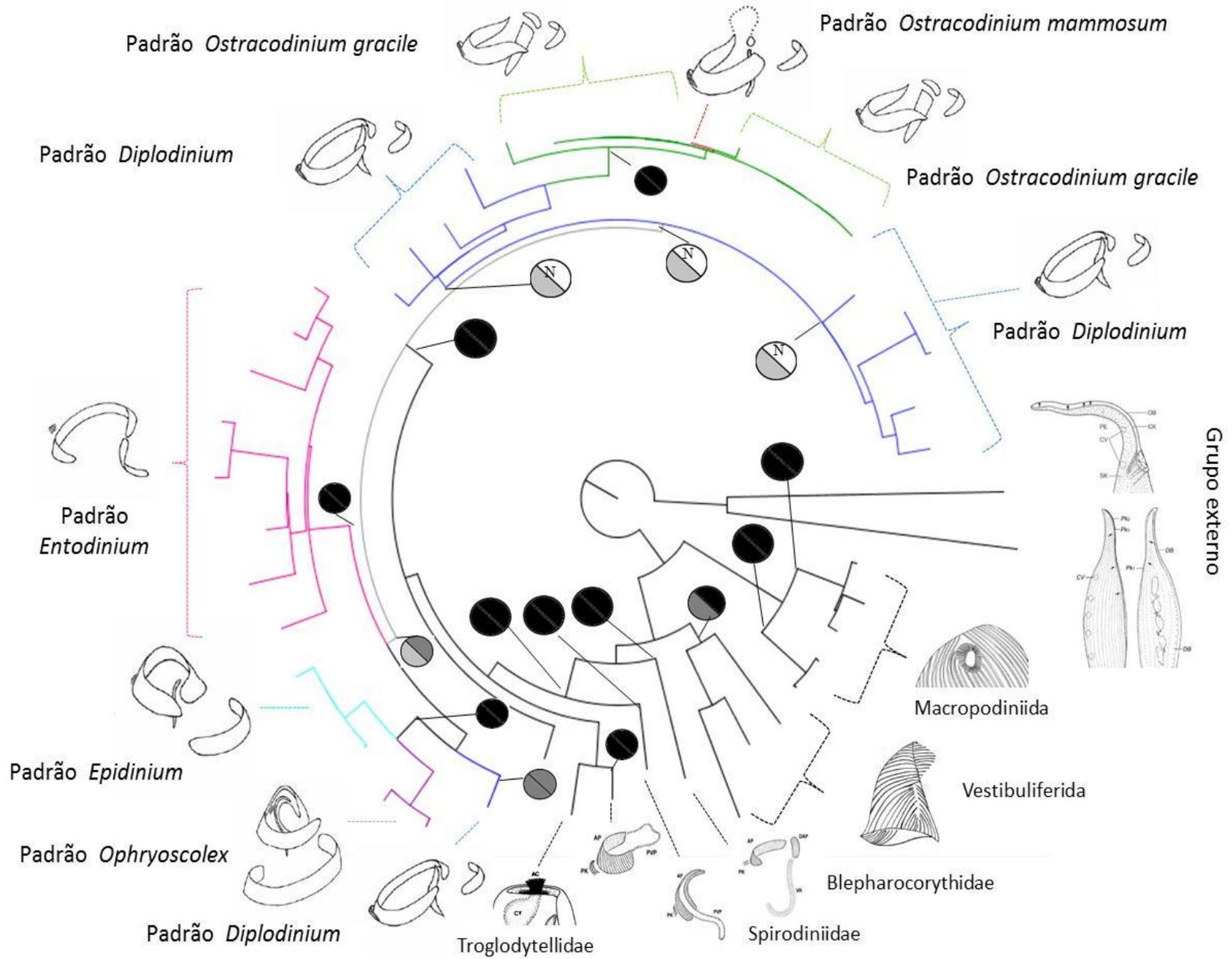
Desenho 8. Árvore filogenética pictorial de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA. As subclasses Rhynchostomatia e Haptoria foram escolhidas como grupos- externo. As cores nos dois compartimentos dos círculos em cada nó da árvore significam: bootstrap da análise de máxima verossimilhança (ML) e valores de probabilidade posterior da inferência bayesiana (BI). As cores dos ramos da árvore indicam a classificação dos táxons (famílias e subfamílias) conforme LYNN (2008) e VD'ANČY et al. (2011). A sigla N indica incongruência na topologia usando determinado método de reconstrução filogenética.



Desenho 9. Árvore filogenética pictorial de representantes das subclasses Rhynchostomatia, Haptoria e Trichostomatia obtida por máxima verossimilhança, com base em sequências do gene 18S-rDNA. As subclasses Rhynchostomatia e Haptoria foram escolhidas como grupos- externo. As cores nos dois compartimentos dos círculos em cada nó da árvore significam: bootstrap da análise de máxima verossimilhança (ML) e valores de probabilidade posterior da inferência bayesiana (BI). As cores dos ramos da árvore indicam os padrões de infraciliatura oral. A sigla N indica incongruência na topologia usando determinado método de reconstrução filogenética.



- Bootstraps > 75%
- Bootstraps 50-75%
- Bootstraps < 50%
- Ⓝ Topologia incongruente



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMERON, S.L., ADLARD, R.D., O'DONOGHUE, P.J. Molecular evidence for an independent radiation of holotrich trichostome ciliates in Australian marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, p. 302 – 310. 2001.
- CAMERON, S.L.; WRIGHT, A.D.G.; O'DONOGHUE, P.J. An Expanded Phylogeny of the Entodiniomorphida (Ciliophora: Litostomatea). **Acta Protozoologica**, v. 42. p. 1 – 6. 2003.
- CAMERON, S.L.; O'DONOGHUE, P.J. Phylogeny and Biogeography of the “Australian” Trichostomes (Ciliophora: Litostomata). **Protist**, v.155, p. 215–235, 2004.
- CORLISS, J. **The ciliated protozoa; characterization, classification and guide to the literature**. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 455 pp. 1979.
- DOGIEL, V. The Phylogeny of the Stomach-Infusorians of Ruminants in the Light of palaeontological and parasitological Data. **The Zoological Laboratory of Leningrad University**, v.88, p.337-342, 1947.
- DOPHEIDE, A.; LEAR, G.; STOTT, R.; LEWIS, G. Molecular characterization of ciliate diversity in Stream Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.1740-1747, 2008.
- FERNANDEZ-GALEANO, D. La infraciliacion en *Polyplastron multivesiculatum* y su génesis durante la division del ciliado. **Bolletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, v. 56, p.89-108, 1958.
- FERNÁNDEZ-GALEANO, D. La infraciliación en *Cycloposthium edentatum* Strelkow. **Bolletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, v. 57, p. 139-150, 1959.
- FERNÁNDEZ-GALEANO, T; SERRANO, S.; FERNÁNDEZ-GALEANO, D. General morphology and stomatogenesis of two species of the genus *Entodinium* (Ciliophora, Entodiniomorphida). **Acta Protozoologica**, v. 24, p. 181-186, 1985.
- FURNESS, D. N.; BUTLER, R.D. The functional and evolucionary significance of the ultrastructural of the Ophryoscolecidae (Order Entodiniomorphida). **Journal of Protozoology**, v. 35, p. 34-38, 1988.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Bilogy**, v. 52, p. 696-704, 2003.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MR. BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v.17, p. 754-755, 2001.
- ITO, A.; ARAI, N.; TSUTSUMI, Y. & IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of sassaby antelope, *Damaliscus lunatus lunatus*, including the description of a new species and form. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.44, p.586-591, 1997.
- ITO, A. & IMAI, S. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecid ciliate, *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by lighth microscopy. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.45, p. 628-636, 1998.
- ITO, A.; MIYAZAKI, Y. & IMAI, S. Lighth microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium* ciliates. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48, n.4, p.440-448, 2001.
- ITO, A.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Descriptions of new *Parentodinium* ciliates in the family Parentodiniidae n.fam, from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodiniomorphs from horses and cattle. **European Journal of Protistology**, v.37, p.405–426, 2002.
- ITO, A.; IMAI, S. Lighth microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.50, p.34-42, 2003.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliature and Morphogenesis in Three Rumen *Diplodinium* Ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche*, and *Diplodinium nanum*, Observed by Light Microscopy. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.52, p.44–51, 2005.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates, **Endocytobiosis and Cell Research**, v.17, p.103-110, 2006.
- ITO, A.; HONMA, H.; GURELLI, G.; GOCMEN, B.; MISHIMA, T.; NAKAI, Y.; IMAI, S. Redescription of *Triplumaria selenica* Latteur et al., 1970 (Ciliophora, Entodiniomorphida) and its phylogenetic position based on the infraciliary bands and 18SSU rRNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, v. 46. p. 180–188. 2010.
- KARNATI, S. K. R.; YU, Z.; SYLVESTER, J.T.; DEHORITY, B.A.; MORRISON, M.; FIRKINS, J.L. Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. **Journal of Animal Science**, v.81. p.812-815. 2003.

- KITTELMANN, S.; JANSSEN, P.H. Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, v.75, p.468–481, 2011.
- LENG, J.; ZHONG, X.; ZHU, R.J.; YANG, S.L.; GOU, X.; MAO, H.M. Assessment of protozoa in Yunnan Yellow Cattle rumen based on the 18S rRNA sequences. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.577–585, 2011.
- LUBINSKY, G. Studies on the evolution of Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha).I. A new species of *Entodinium* with ‘*caudatum*’, ‘*loboso-spinosum*’ and ‘*dubardi*’ forms and some evolutionary trends in the genus *Entodinium*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 111-133. 1957a.
- LUBINSKY, G. Studies on the evolution of Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha).II. On the origin of the higher Ophryoscolecidae. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 135-140. 1957b.
- LUBINSKY, G. Studies on the evolution of Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha).III. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 141-159. 1957c.
- LYNN, D.H. **The ciliated protozoa. Characterization, classification, and guide to the literature**, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 2008.
- MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v.71, p. 491-499, 1988.
- MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORII, Y.; KAKENGI, V,A,M; ITO, A, Rumens ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle, *Bos Taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp, and *Enoploplastron stoky* (Buisson, 1924), **European Journal of Protistology**, v,45, p,77–86, 2009.
- MODRY, D.; PETRŽELKOVÁ, K.J.; POMAJBÍKOVÁ, K.; TOKIWA, T.; KŘÍEK, J.; IMAI, S.; VALLO, P.; PROFOUSOVÁ, I.; ŠLAPETA, J. The Occurrence and Ape-to-Ape Transmission of the Entodiniomorphid Ciliate *Troglodytella abrassarti* in Captive Gorillas. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 83–87, 2009.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoseoleeidae. Structures et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale**, v.2, 527-718. 1960.

- SNELLING, T.; PINLOCHE, E.; WORGAN, H.J.; NEWBOLD, C.J.; McEWAN, N.R. Molecular Phylogeny of *Spirodinium equi*, *Triadinium caudatum* and *Blepharocorys* sp. from the Equine Hindgut. **Acta Protozoologica**, v.50, p.319–326, 2011.
- SHIN, E.C.; CHO, K.M.; LIM, W.L.; HONG, S.Y.; AN, C.L.; KIM, E.J.; KIM, Y.K.; CHOI, B.R.; AN, J.M.; KANG, J.M.; KIM, H.; YUN, H.D. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97,, p. 378–383, 2004.
- SINGH, K.M.; TRIPATHI, A.K.; PANDYA, P.R.; RANK, D.N.; KOTHARI, R.K.; JOSHI, C.G. *Dasytricha* Dominance in Surti Buffalo Rumen Revealed by 18S rRNA Sequences and Real-Time PCR Assay. **Current Microbiology**, v.63, p. 281–288, 2011.
- STRUDER-KYPKE, M.C., WRIGHT, A.-D.G., FOISSNER, W., CHATZINOTAS, A., LYNN, D.H. Molecular phylogeny of litostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) with emphasis on free-living Haptorian Genera. **Protist**, v. 157, p. 261–278. 2006.
- STRUDER-KYPKE, M.C.; KORNILOVA, O.A.; LYNN, D.H. Phylogeny of trichostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) endosymbiotic in the Yakut horse (*Equus caballus*). **European Journal of Protistology**, v.43, p. 319–328. 2007.
- TYMENSEN, L.; BARKLEY, C.; MCALLISTER, T.A. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.88, p.1–6, 2012.
- VD' AČNÝ, P.; ORSI, W.; BOURLAND, W.A.; SHIMANO, S.; EPSTEIN, S.S.; FOISSNER, W. Morphological and molecular phylogeny of dileptid and tracheliid ciliates: Resolution at the base of the class Litostomatea (Ciliophora, Rhynchostomatia). **European Journal of Protistology**, v. 47, p.295–313, 2011a.
- VD' AČNÝ, P. ; BOURLAND, W.A.; ORSI, W.; EPSTEIN, S.S.; FOISSNER, W. Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.59, p.510–522, 2011b.
- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. New York: **Springer** -Verlag New York Inc. 423p. 1992.
- WOLSKA, M, Remarks on the adoral ciliature in the order Entodiniomorpha. **Acta Protozoologica**, v.3, p.322-328, 1965.
- WOLSKA, M, Study on the family Blepharocorythidae Hsiung I, Preliminary remarks. **Acta Protozoologica**, v.4, p.97-104, 1966.

- WOLSKA, M, Study on the family Blepharocorythidae Hsiung II, *Charonina ventriculi* (Jameson). **Acta Protozoologica**, v.4, p.179-283, 1967.
- WOLSKA, M, Study on the family Blepharocorythidae Hsiung V, A review of genera and species. **Acta Protozoologica**, v.9, p.24-43, 1971.
- WRIGHT, A.D.G., LYNN, D.H. Monophyly of the trichostome ciliates (phylum Ciliophora: class Litostomatea) tested using new 18S rRNA sequences from the vestibuliferids, *Isotricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium*, and the haptorian, *Didinium nasutum*. **European Journal of Protistology**, v.33, p.305–315, 1997a.
- WRIGHT, A.D.G., LYNN, D.H. Phylogenetic analysis of the rumen ciliate family Ophryoscolecidae based on 18s ribosomal RNA sequences, with new sequences from *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, and *Ophryoscolex*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, p.963-970, 1997b.
- WRIGHT, A.D.G.; DEHORITY, B.A.; LYNN, D.H. Phylogeny of the Rumen Ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorpha) Inferred from Small Subunit Ribosomal RNA Sequences. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 44, n.1; p. 61-67. 1997.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 10, Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, n=20) de espécies da família Blepharocorithidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo	Largura Macronúcleo	Comprimento corpo /Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo/Comprimento Corpo	Comprimento Macronúcleo/Largura Macronúcleo
<i>Charonina ventriculi</i>							
BOVINO	33,67± 4,49 (25,11 - 43,57)	14,52± 2,13 (10,51 - 18,25)	8,33± 1,99 (4,9 - 12,63)	5,10±1,30 (2,93 - 7,17)	2,35±0,36 (1,88-3,17)	0,25±0,06 (0,14-0,42)	1,76±0,67 (0,79-3,16)
OVINO	34,55± 4,76 (27,15 - 43,19)	14,639±1,64 (10,97- 18,1)	9,25±2,27 (5,75 - 12,67)	6,49±0,50 (4,9 - 8,53)	2,38±0,46 (1,88-3,93)	0,27±0,01 (0,19-0,41)	1,47±0,50 (0,86-2,59)

ANEXO 2

Tabela 11. Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, n=20) de espécies da família Isotrichidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar.

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo	Largura Macronúcleo	Comprimento corpo/ Largura do corpo	Comprimento Macronúcleo/ Comprimento Corpo	Comprimento Macronúcleo/ Largura Macronúcleo	Profundidade do vestibulo	Diâmetro do vestibulo
<i>Dasytricha ruminantium</i>									
BOVINO	55,45±7,03 (44,24-66,39)	30,10±4,48 (20,17-36,73)	16,07±3,97 (8,80-24,90)	9,10±1,43 (6,50-11,73)	1,87±0,28 (1,35-2,44)	0,29±0,08 (0,14-0,52)	1,76±0,33 (1,11-2,26)	10,13±1,81 (6,97-13,83)	3,77±1,03 (2,13-5,36)
OVINO	57,35±9,42 (38,66-73,91)	34,66±6,39 (24,61-46,74)	17,44±17,64 (9,37-23,38)	12,10±1,92 (7,73-15,14)	1,68±0,31 (1,28-2,62)	0,31±0,08 (0,17-0,55)	1,46±0,34 (0,96-2,03)	10,15±2,06 (5,92-13,59)	4,42±1,16 (2,13-7,17)
<i>Isotricha prostoma</i>									
BOVINO	166,36±47,02 (94,32-257,50)	93,80±17,36 (56,58-141,82)	53,00±14,49 (26,77-85,55)	15,84±4,33 (8,36-25,39)	1,76±0,30 (1,30-2,43)	0,32±0,06 (0,22-0,48)	3,71±1,71 (1,33-7,31)	22,13±4,95 (11,84-29,80)	11,50±3,24 (5,39-19,21)
OVINO	122,17±2,65 (82,13-155,09)	78,64±16,82 (49,90-108,39)	45,01±9,74 (22,42-71,34)	19,54±3,39 (12,66-25,01)	1,60±0,34 (1,20-2,47)	0,38±0,10 (0,18-0,57)	2,37±0,67 (1,31-3,93)	17,39±4,39 (10,97-31,46)	9,60±2,75 (5,70-15,28)
<i>Isotricha intestinalis</i>									
OVINO	132,49±34,63 (89,99-212,10)	76,85±15,34 (53,06-102,26)	38,70±5,60 (28,84-48,83)	24,25±6,11 (11,47-40,40)	1,73±0,29 (1,12-2,33)	0,31±0,08 (0,18-0,49)	1,68±0,47 (1,16-3,11)	18,17±5,70 (9,98-33,27)	9,39±3,05 (5,74-16,55)

ANEXO 3

Tabela 12, Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies da família Ophryoscolecidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar,

Espécies	Comprimento do corpo	Largura do Corpo	Comprimento Macronúcleo	Largura Macronúcleo	Distância entre o Micronúcleo e a extremidade anterior do Macronúcleo	D/ Comprimento Macronúcleo	Comprimento corpo/ Largura do Corpo	Comprimento Macronúcleo/ Comprimento Corpo	Comprimento Macronúcleo/ Largura Macronúcleo	Comprimento do braço ventral da placa
<i>Diplodinium dentatum</i>										
BOVINO	69,14±6,07 (58-82,08)	53,72±5,33 (42,58-64,87)	42,57±4,71 (32,82-52,60)	14,93±3,34 (7,46-21,04)	5,48±2,08 (2,26-9,08)	0,13±0,05 (0,06-0,22)	1,29±0,10 (1,44-1,53)	0,61±0,04 (0,52-0,66)	2,99±0,78 (2,07-5,58)	Ausente
OVINO	79,98±11,28 (64,10-102,89)	60,89±7,75 (46,39-81,37)	42,42±7,79 (27,57-59,89)	14,92±2,11 (11,16-18,48)	10,98±2,52 (7,06-15,51)	0,27±0,06 (0,16-0,39)	1,32±0,16 (1,01-1,71)	0,53±0,07 (0,39-0,69)	2,88±0,57 (2,07-5,58)	Ausente
<i>Diplodinium anisacanthum</i>										
BOVINO	63,28±7,10 (52,13-82,59)	51,82±5,82 (43,32-66,66)	32,08±5,61 (27,57-59,89)	14,73±4,32 (5,62-25,29)	5,13±2,66 (1,43-10,14)	0,16±0,09 (0,05-0,34)	1,23±0,10 (1,06-1,50)	0,51±0,06 (0,39-0,63)	2,41±1,18 (1,56-6,98)	Ausente
OVINO	77,42±13,27 (55,40-101,87)	64,60±13,69 (46,07-92,34)	36,67±6,64 (27,99-53,71)	16,28±3,40 (11,51-25,77)	12,24±2,14 (8,27-17,58)	0,31±0,06 (0,21-0,47)	1,21±0,16 (0,94-1,71)	0,52±0,05 (0,43-0,58)	2,49±0,42 (1,83-3,37)	Ausente
<i>Diplodinium polygonale</i>										
BOVINO	34,97±4,91 (26,73-42,42)	23,78±3,36 (18,67-30,41)	10,57±2,23 (5,84-15,69)	5,60±0,82 (4,07-7,04)	5,51±1,81 (3,10-8,61)	0,53±0,18 (0,25-0,86)	1,48±0,17 (1,15-1,77)	0,45±0,09 (0,41-0,55)	1,90±0,37 (1,19-2,78)	Ausente
<i>Diploplastron affine</i>										
OVINO	84,18±10,78 (67,47-115,75)	59,48±7,15 (49,69-82,40)	44,67±9,54 (30,89-70,20)	12,37±2,72 (6,68-16,98)	23,70±5,43 (14,99-33,63)	0,53±0,09 (0,33-0,76)	1,42±0,18 (1,14-1,94)	0,53±0,07 (0,35-0,63)	3,77±1,05 (1,95-6,39)	28,10±5,08 (17,13-35,97)
<i>Eodinium posterovesiculatum bilobosum</i>										
BOVINO	51,19±5,23 (42,35-60,37)	34,63±3,04 (28,57-41,34)	30,77±4,81 (16,63-35,63)	8,76±2,04 (5,12-13,24)	13,62±3,26 (5,33-17,97)	0,45±0,09 (0,24-0,65)	1,48±0,13 (1,28-1,74)	0,59±0,09 (0,38-0,69)	3,64±1,15 (1,60-6,22)	Ausente
<i>Eodinium posterovesiculatum posterovesiculatum</i>										
	49,34±4,47	31,54±3,10	30,42±3,91	8,67±2,04	14,84±4,34	0,49±0,07	1,57±0,12	0,62±0,04	3,57±0,63	Ausente

OVINO

	(40,75-58,22)	(24,23-36,02)	(22,68-36,35)	(5,87-12,14)	(6,82-22,66)	(0,41-0,69)	(1,30-1,78)	(0,56-0,68)	(2,80-5,66)	Ausente
--	---------------	---------------	---------------	--------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	---------

*Eodinium
posterovesiculatum
lobatum*

BOVINO

48,93±4,62	34,13±2,89	29,64±5,15	7,66±1,85	13,33±3,52	0,45±0,09	1,43±0,13	0,60±0,08	4,07±1,17	Ausente
(38,75-56,07)	(29,70-41,79)	(19,33-39,04)	(4,96-12,16)	(5,01-21,23)	(0,26-0,60)	(1,04-1,59)	(0,42-0,71)	(2,11-6,75)	Ausente

OVINO

42,77±2,69	30,16±2,47	29,64±5,15	7,79±1,53	11,16±3,08	0,49±0,13	1,43±0,14	0,53±0,08	3,02±0,66	Ausente
(37,71-47,19)	(25,64-36,96)	(19,33-39,04)	(5,23-10,66)	(3,70-16,27)	(0,25-0,66)	(1,18-1,72)	(0,43-0,69)	(2,11-6,75)	Ausente

*Eodinium
posterovesiculatum
monolobosum*

BOVINO

51,48±4,63	36,02±3,95	22,75±3,10	8,60±1,51	15,60±3,46	0,49±0,11	1,44±0,15	0,61±0,08	3,75±0,81	Ausente
(44,11-61,47)	(30,11-46,46)	(21-44,36)	(6,48-12,61)	(9,43-23,73)	(0,20-0,69)	(1,08-1,68)	(0,46-0,72)	(1,86-5,37)	Ausente

OVINO

47,3275±4,13	32,19±4,21	31,57±6,19	8,80±2,01	16,16±3,60	0,53±0,08	1,49±0,16	0,65±0,07	3,62±0,093	Ausente
(38,13-54,56)	(26,13-46,46)	(18,03-28,10)	(4,56-12,09)	(8,53-21,75)	(0,37-0,64)	(1,22-1,76)	(0,45-0,77)	(2,61-6,56)	Ausente

Eremoplastron rostratum

BOVINO

48,70±8,19	34,48±5,22	20,01±5,88	7,48±2,16	11,83±2,99	0,61±0,61	1,41±0,13	0,41±0,07	2,7±0,47	Ausente
(37,31-64,64)	(24,24-47,84)	(9,34-37,12)	(4,8-14,47)	(6,95-15,78)	(0,40-1,03)	(1,20-1,70)	(0,24-0,58)	(1,85-3,47)	Ausente

Metadinium ypsilon

OVINO

86,81±13,77	64,86±9,45	55,51±12,91	11,54±2,94	25,06±6,30	0,46±0,09	1,34±0,16	0,64±0,08	5,05±1,66	23,23±5,81
(60,08-122,13)	(55,06-88,24)	(37,87-92,30)	(7,46-19,70)	(16,56-42,08)	(0,33-0,66)	(1,06-1,73)	(0,51-0,76)	(2,40-10,17)	(14,29-32,97)

Metadinium minorum

OVINO

89,33±8,14	61,21±5,39	58,48±10,11	11,19±2,94	26,27±6,41	0,46±0,13	1,46±0,12	0,65±0,10	5,44±1,42	29,44±4,78
(73,06-101,58)	(53,04-71,84)	(38,96-76,58)	(7,46-19,70)	(18,97-43,07)	(0,33-0,89)	(1,29-1,79)	(0,45-0,83)	(3,03-8,31)	(20,64-36,69)

*Ostracodinium
trivesiculatum*

BOVINO

101,07±11,08	63,89±10,12	67,89±10,07	10,65±2,80	30,93±7,19	0,46±0,08	1,60±0,19	0,67±0,06	6,78±2,15	Ausente
(80,26-127,22)	(47,26-83,67)	(49,37-90,06)	(5,41-17,22)	(17,44-43,64)	(0,25-0,55)	(1,30-2,01)	(0,53-0,78)	(4,09-13,42)	Ausente

OVINO

105,11±12,36	67,13±14,93	60,85±7,11	10,16±2,13	29,39±3,91	0,49±0,06	1,60±0,18	0,58±0,06	6,20±1,42	Ausente
(86,93-123,68)	(49,02-90,52)	(44,12-70,73)	(7,54-14,72)	(17,44-34,84)	(0,38-0,55)	(1,36-1,84)	(0,51-0,70)	(4,61-8,56)	Ausente

Ostracodinium dogieli

BOVINO

100,50±11,74	65,40±5,76	70,36±11,45	11,46±2,60	30,87±6,89	0,44±0,07	1,53±0,09	0,70±0,07	6,43±1,78	Ausente
(81,34-119,63)	(55,87-76,92)	(51,06-93,51)	(6,68-16,42)	(19,67-48,20)	(0,31-0,52)	(1,33-1,69)	(0,56-0,84)	(3,96-10,64)	Ausente

Ostracodinium mammosum

OVINO

65,15±8,31	43,37±5,88	47,91±9,38	8,30±2,45	17,59±4,39	0,37±0,08	1,52±0,21	0,74±0,12	6,12±1,67	Ausente
------------	------------	------------	-----------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------	---------

<i>Ostracodinium clipeolum</i>	(52,93-84,70)	(29,60-57,72)	(35,79-78,12)	(5,25-14,45)	(10,41-23,28)	(0,25-0,55)	(1,26-2,23)	(0,58-1,13)	(3,41-9,07)	Ausente
BOVINO	95,54±12,12 (76,74-119,97)	65,31±8,10 (48,06-82,66)	68,87±11,05 (44,22-89,54)	11,34±2,41 (6,15-14,56)	30,73±6,43 (18,75-40,43)	0,45±0,08 (0,31-0,59)	1,47±0,33 (0,18-1,81)	0,99±1,37 (0,54-0,80)	6,33±1,56 (3,11-9,97)	Ausente Ausente
OVINO	112,67±8,31 (101,81-122,04)	64,58±7,61 (56,82-75,04)	71,63±6,45 (62,19-76,54)	9,63±3,41 (5,75-13,87)	27,37±6,65 (20,04-36,09)	0,38±0,08 (0,27-0,47)	1,75±0,08 (1,63-1,80)	0,64±0,02 (0,61-0,66)	8,06±2,38 (5,27-10,82)	Ausente Ausente
<i>Ostracodinium rugoloricatum</i>										
BOVINO	100,12±11,93 (73,58-116,80)	65,91±7,78 (48,74-80,46)	70,42±11,63 (49,84-93,45)	10,07±3,31 (5,05-17,59)	28,16±6,01 (19,20-45,14)	0,40±0,08 (0,30-0,58)	1,52±0,11 (1,31-1,72)	0,70±0,05 (0,61-0,82)	7,54±2,17 (4,18-12,14)	Ausente Ausente
OVINO	110,20±3,87 (107,46-112,93)	65,63±3,02 (63,49-67,76)	69,88±2,16 (67,72-72,04)	10,69±0,16 (10,58-10,80)	32,28±3,08 (30,10-34,46)	0,46±0,02 (0,44-0,48)	1,68±0,02 (1,67-1,69)	0,64±0,05 (0,60-0,67)	6,54±0,19 (6,40-6,67)	Ausente Ausente
<i>Ostracodinium monolobum</i>										
BOVINO	106,79±11,33 (86,26-128,66)	71,18±11,13 (48,56-95,52)	71,44±10,63 (55,81-88,01)	10,77±2,15 (7,55-15,60)	29,07±5,57 (18,04-39,16)	0,41±0,07 (0,28-0,55)	1,52±0,19 (1,34-2,03)	0,67±0,07 (0,55-0,77)	6,88±1,70 (4,30-11,66)	Ausente Ausente
<i>Ostracodinium gracile</i>										
BOVINO	96,68±8,34 (74,29-122,56)	56,99±8,92 (45,09-68,18)	57,69±4,99 (51,83-65,45)	12,26±2,80 (7,64-16,28)	26,95±3,15 (24,24-32,01)	0,47±0,03 (0,41-0,49)	1,66±0,21 (1,48-2,03)	0,62±0,08 (0,53-0,72)	4,95±1,40 (0,28-0,63)	Ausente Ausente
OVINO	93,28±8,24 (84,26-106,74)	61,93±6,99 (47,57-75,23)	64,37±6,82 (50,31-81,25)	10,96±2,48 (6,83-16,28)	30,42±4,38 (22,53-37,94)	0,48±0,07 (0,38-0,67)	1,57±0,12 (1,35-1,82)	0,67±0,06 (0,49-0,76)	6,18±1,67 (4,09-10,78)	Ausente Ausente
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>										
BOVINO	165,93±20,21 (113,25-204,33)	115,08±17,57 (86,52-162,66)	96,22±11,77 (77,07-125,22)	15,68±5,92 (6,87-26,77)	43,39±8,87 (28,92-60,16)	0,45±0,11 (0,29-0,76)	1,45±0,15 (1,10-1,68)	0,58±0,06 (0,44-0,68)	6,94±2,43 (3,45-12,16)	Ausente Ausente
OVINO	182,57±32,86 (123,91-271,31)	119,48±24,50 (76,59-174,86)	112,60±18,82 (71,91-142,56)	22,16±5,60 (11,88-31,79)	42,42±9,10 (26,00-61,69)	0,38±0,07 (0,23-0,49)	1,54±0,14 (1,31-1,77)	0,62±0,05 (0,47-0,70)	5,04±1,47 (0,04-7,09)	Ausente Ausente
<i>Entodinium alces</i>										
BOVINO	39,79±5,22 (30,93-55,11)	27,18±3,77 (19,61-33,05)	21,78±3,20 (16,81-30,28)	5,91±1,49 (3,71-9,07)	9,44±2,70 (4,65-14,14)	0,44±0,11 (0,19-0,60)	1,48±0,19 (1,23-1,93)	0,55±0,08 (0,42-0,68)	3,87±0,97 (2,46-5,60)	Ausente Ausente
<i>Entodinium biconcavum</i>										
BOVINO	43,46±4,72 (32,62-52,37)	30,11±3,39 (23,21-38,34)	24,14±6,35 (15,25-33,87)	5,64±1,47 (3,19-9,33)	10,18±3,42 (4,43-16,78)	0,42±0,10 (0,25-0,58)	1,45±0,11 (1,20-1,67)	0,55±0,12 (0,36-0,76)	4,59±1,80 (1,91-9,66)	Ausente Ausente
<i>Entodinium bovis</i>										
BOVINO	32,70±4,77 (23,15-40,56)	26,48±4,53 (7,46-33,65)	14,78±3,62 (8,83-21,04)	5,37±1,54 (2,52-8,28)	7,09±2,17 (3,21-10,98)	0,50±0,17 (0,22-0,81)	1,25±0,14 (0,90-1,45)	0,45±0,08 (0,31-0,59)	3,03±1,29 (1,25-6,68)	Ausente Ausente
OVINO	32,72±5,34 (27,34-49,25)	25,69±3,52 (21,94-37,52)	17,16±3,62 (11,03-25,21)	5,88±1,57 (3,50-8,71)	8,29±2,15 (4,34-13,53)	0,49±0,13 (0,23-0,70)	1,27±0,09 (1,07-1,46)	0,53±0,09 (0,31-0,69)	3,15±1,14 (1,72-5,00)	Ausente Ausente
<i>Entodinium caudatum</i>										
	30,23±7,14	22,17±4,03	15,88±4,35	5,22±1,09	8,33±2,33	0,54±0,17	1,37±0,22	0,53±0,08	3,12±0,80	Ausente

<i>lobosospinosum</i>											
OVINO	(22,76-55,71)	(16,16-36,61)	(11,57-28,98)	(2,88-7,15)	(3,62-13,85)	(0,22-0,84)	(1,09-2,08)	(0,37-0,70)	(2,05-5,24)	Ausente	
<i>Entodinium dubardi</i>											
dubardi											
BOVINO	36,83±6,45	26,99±4,84	20,60±3,95	5,36±1,73	8,76±1,91	0,43±0,08	1,38±0,17	0,56±0,06	4,11±1,14	Ausente	
	(24,79-48,67)	(17,18-36,09)	(14,22-30,3)	(2,45-9,45)	(6,03-12,57)	(0,26-0,59)	(1,07-1,81)	(0,44-0,71)	(02,50-7,55)	Ausente	
<i>Entodinium exiguum</i>											
BOVINO	30,25±4,72	20,68±3,72	15,39±3,24	5,11±1,50	6,83±2,03	0,46±0,14	1,47±0,13	0,51±0,10	3,36±1,59	Ausente	
	(24,31-39,59)	(14,24-27,71)	(10,43-21,49)	(2,13-8,11)	(3,99-12,41)	(0,22-0,74)	(1,24-1,78)	(0,36-0,75)	(1,79-8,54)	Ausente	
<i>Entodinium longinucleatum</i>											
longinucleatum											
BOVINO	57,67±9,46	46,23±8,27	49,19±5,55	6,02±1,44	17,83±5,93	0,36±0,10	1,25±0,11	0,86±0,09	8,62±2,38	Ausente	
	(47,52-89,35)	(38,85-77,07)	(40,53-59,99)	(3,62-9,37)	(8,16-28,71)	(0,19-0,53)	(1,10-1,52)	(0,64-1,04)	(5,17-14,72)	Ausente	
OVINO	45,42±7,8	31,89±5,96	34,34±8,65	5,01±1,34	13,20±3,28	0,40±0,11	1,44±0,14	0,76±0,17	7,47±3,34	Ausente	
	(33,88-61,61)	(22,50-47,46)	(16,70-46,43)	(2,39-7,67)	(6,22-19,34)	(0,24-0,61)	(1,18-1,71)	(0,49-1,02)	(3,63-17,64)	Ausente	
<i>Entodinium nanellum</i>											
OVINO	26,03±3,46	20,18±4,33	13,72±3,15	4,28±1,06	8,03±2,11	0,60±0,16	1,32±0,23	0,53±0,11	3,36±0,92	Ausente	
	(20,04-32,80)	(13,35-32,53)	(9,81-21,23)	(2,39-5,87)	(4,41-11,88)	(0,36-0,87)	(0,99-1,86)	(0,35-0,71)	(1,87-5,34)	Ausente	
<i>Entodinium ovinum</i>											
BOVINO	49,43±6,20	32,85±4,74	28,16±7,26	5,68±1,03	12,58±3,72	0,45±0,09	1,52±0,19	0,57±0,12	5,15±1,84	Ausente	
	(39,12-60,47)	(19,39-41,29)	(17,15-40,64)	(4,00-7,69)	(7,40-18,97)	(0,30-0,60)	(1,27-2,08)	(0,37-0,75)	(2,97-10,16)	Ausente	
<i>Entodinium parvum</i>											
parvum											
BOVINO	39,30±6,27	20,88±3,07	20,28±4,79	4,52±0,86	8,08±1,89	0,41±0,09	1,71±0,13	0,57±0,12	4,59±1,22	Ausente	
	(29,21-43,78)	(17,53-27,50)	(12,73-28,92)	(3,21-5,86)	(4,29-12,29)	(0,25-0,63)	(1,46-2,06)	(0,33-0,76)	(2,80-7,20)	Ausente	
OVINO	40,78±11,78	23,19±7,09	23,65±4,23	6,27±2,96	10,51±3,50	0,44±0,11	1,78±0,20	0,60±0,11	4,49±2,05	Ausente	
	(23,52-71,1)	(15,87-37,61)	(18,12-33,39)	(2,74-12,53)	(6,18-17,05)	(0,28-0,66)	(1,39-2,18)	(0,40-0,78)	(2,32-9,33)	Ausente	
<i>Entodinium retangulatum</i>											
Retangulatum											
BOVINO	43,22±4,14	29,45±3,44	25,63±4,87	5,83±1,11	10,07±3,69	0,40±0,17	1,48±0,20	0,59±0,10	4,54±1,19	Ausente	
	(37,19-51,46)	(22,76-35,20)	(18,93-36,25)	(3,84-7,99)	(3,47-20,53)	(0,16-1,01)	(1,24-2,14)	(0,46-0,83)	(2,37-7,25)	Ausente	
<i>Entodinium rostratum</i>											
BOVINO	39,30±6,27	21,64±2,50	22,52±5,16	4,87±0,87	9,67±2,82	0,44±0,11	1,82±0,18	0,57±0,07	4,73±1,26	Ausente	
	(29,65-51,68)	(15,70-26,61)	(15,35-34,42)	(3,41-6,5)	(5,25-14,21)	(0,22-0,58)	(1,51-2,16)	(0,41-0,69)	(3,26-7,22)	Ausente	
OVINO	36,64±4,30	19,73±2,03	21,10±4,24	4,63±1,45	10,04±3,22	0,48±0,13	1,87±0,67	0,57±0,09	5,13±2,13	Ausente	
	(28,08-45,33)	(14,93-22,93)	(12,05-26,50)	(2,51-7,19)	(5,07-16,79)	(0,29-0,80)	(1,37-2,75)	(0,35-0,68)	(1,79-9,04)	Ausente	
<i>Entodinium simplex</i>											
OVINO	35,65±5,63	23,14±2,95	21,91±5,55	6,09±5,04	10,02±3,59	0,46±0,12	1,54±0,67	0,61±0,11	4,71±2,62	Ausente	
	(28,08-51,29)	(17,77-31,46)	(14,08-31,46)	(2,66-26,44)	(4,71-17,54)	(0,20-0,61)	(1,37-2,75)	(0,46-0,88)	(1,19-11,35)	Ausente	

*A morfometria das espécies *Ostracodinium trivesiculatum* (n=11), *Ostracodinium clipeolum* (n=4), *Ostracodinium ruguloricatum* (n=2) e *Ostracodinium gracile* (n=4) encontrados em ovino foi realizada com número amostral inferior a 20, pois não foram encontrados em grande quantidade na amost

Tabela 12 (continuação), Morfometria (μm da média, desvio-padrão, máximo e mínimo, $n=20^*$) de espécies da família Ophryoscolecidae em bovino Holandês-Gir e ovino Morada Nova, alimentados com bagaço de cana-de-açúcar,

Espécies	Comprimento do braço dorsal da placa	Distância entre o final da placa e o ponto de fusão	Comprimento total da Placa	Largura da Placa		Comprimento lobo Ventral	Comprimento lobo dorsal	Comprimento do espinho ventral 1	Comprimento do espinho ventral 2	Comprimento do espinho dorsal
				Distância entre os braços	Largura no ponto de fusão das placas					
<i>Diplodinium dentatum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Diplodinium anisacanthum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Diplodinium polygonale</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Diploplastron affine</i>	26,26 \pm 4,41	12,26 \pm 4,95	40,36 \pm 6,67	9,54 \pm 2,74	6,67 \pm 2,41	9,42 \pm 1,82	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	(17,76-34,01)	(6,09-23,39)	(0,17-1,49)	(3,93-15,23)	(2,88-12,32)	(5,01-13,13)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Eodinium posterovesiculatum bilobosum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	8,01 \pm 2,52	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(3,46-15,89)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Eodinium posterovesiculatum posterovesiculatum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Eodinium posterovesiculatum posterovesiculatum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

OVINO

Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

Eodinium posterovesiculatum lobatum

BOVINO

Ausente Ausente Ausente Ausente 4,91±0,88 2,96±1,21 Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente Ausente Ausente (3,21-6,41) (1,33-7,57) Ausente Ausente Ausente Ausente

OVINO

Ausente Ausente Ausente Ausente 3,95±0,87 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente Ausente Ausente (2,45-5,87) Ausente Ausente Ausente Ausente

Eodinium posterovesiculatum monolobosum

BOVINO

Ausente Ausente Ausente Ausente 6,82±1,46 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente Ausente Ausente (4,41-9,89) Ausente Ausente Ausente Ausente

OVINO

Ausente Ausente Ausente Ausente 6,26±1,70 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente Ausente Ausente (3,73-11,31) Ausente Ausente Ausente Ausente

Eremoplastron rostratum

BOVINO

Ausente Ausente 25,13±6,36 5,19±1,79 Ausente Ausente 21,86±4,40 Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente (16,53-39,11) (2,78-11,11) Ausente Ausente (14,95-31,90) Ausente Ausente

Metadinium ypsilon

OVINO

23,31±5,69 39,07±11,70 62,30±12,28 8,58±2,96 22,89±3,73 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 (13,03-31,73) (25,02-69,74) (43,79-90,19) (5,03-17,41) (14,89-28,77) Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

Metadinium minorum

OVINO

29,49±5,07 40,02±9,32 69,46±10,39 8,96±2,59 18,81±3,53 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 (17,72-37,14) (23,22-55,06) (50,28-101,58) (4,26-14,79) (12,73-26,65) Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

Ostracodinium trivesiculatum

BOVINO

Ausente Ausente 71,57±14,46 48,17±6,51 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente (49,64-115,08) (38,87-61,67) Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

OVINO

Ausente Ausente 70,35±12,58 49,34±7,77 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente
 Ausente Ausente (50,28-87,30) (40,33-62,47) Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

Ostracodinium dogieli

BOVINO

Ausente Ausente 76,01±13,10 50,76±7,06 8,38±1,91 Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente

<i>Ostracodinium mammosum</i> OVINO	Ausente	Ausente	(55,18-98,24)	(37,60-67,25)	(5,92-14,24)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Ostracodinium clipeolum</i> BOVINO	Ausente	Ausente	41,75±8,47	34,24±3,90	8,44±2,21	8,64±2,00	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(26,59-59,11)	(27,45-40,90)	(4,82-13,17)	(4,34-12,43)	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Ostracodinium rugoloricatum</i> BOVINO	Ausente	Ausente	76,89±11,95	53,73±7,22	11,86±2,70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(46,63-97,00)	(39,75-64,52)	(6,18-16,11)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	81,47±4,83	50,49±4,78	9,01±2,03	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(75,23-87,01)	(45,98-55,69)	(6,39-10,99)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Ostracodinium monolobum</i> BOVINO	Ausente	Ausente	72,35±7,60	50,72±6,90	4,79±1,31	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(61,35-86,92)	(37,62-63,43)	(2,63-8,26)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	72,52±2,76	50,02±4,05	5,34±0,60	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(70,57-74,47)	(47,15-52,88)	(4,91-5,76)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Ostracodinium gracile</i> BOVINO	Ausente	Ausente	61,68±9,87	35,07±4,49	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(53,07-74,11)	(29,55-41,01)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	68,20±15,29	42,79±5,28	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	(27,73-100,95)	(36,03-48,56)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Polyplastron multivesiculatum</i> BOVINO	Ausente	Ausente	NM**	NM**	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	NM**	NM**	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	NM**	NM**	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	NM**	NM**	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium alces</i> BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5,89±1,19	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(3,99-8,50)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium biconcavum</i> BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	6±1,53	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(3,46-8,14)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium bovis</i> BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium caudatum lobosospinosum</i>										
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	4,51±1,31	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	7,20±2,45
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(2,41-7,99)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(4,29-16,37)
<i>Entodinium dubardi dubardi</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium exiguum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	3,68±1,15	3,73±1,53	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(2,29-6,93)	(1,86-7,99)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium longinucleatum longinucleatum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium nanellum</i>										
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium ovinum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5,01±1,54	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(2,26-7,75)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium parvum parvum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Entodinium retangulatum retangulatum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	6,98±2,49	5,59±1,30	7,62±3,58	
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(3,57-12,54)	(3,25-8,91)	(3,46-15,91)	
<i>Entodinium rostratum</i>										
BOVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	8,92±3,25	Ausente	Ausente	

	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(2,93-13,17)	Ausente	Ausente
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	6,08±1,88	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	(3,47-11,31)	Ausente	Ausente
<i>Entodinium simplex</i>									
OVINO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

*A morfometria das espécies *Ostracodinium trivesiculatum* (n=11), *Ostracodinium clipeolum* (n=4), *Ostracodinium ruguloricatum* (n=2) e *Ostracodinium gracile* (n=4) encontrados em ovino foi realizada com número amostral inferior a 20, pois não foram encontrados em grande quantidade na amostra,

** NM indica caracter não-mensurado,

ANEXO 4

Técnica de coloração pela solução de Lugol

(D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999)

- 1- Fixar o conteúdo ruminal (v/v) em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984);
- 2- Colocar 1 mL da amostra já fixada em tubo de ensaio;
- 3- Adicionar ao tubo de ensaio 3 gotas de solução de Lugol e aguardar aproximadamente 15 minutos;
- 4- Analisar entre lâmina e lamínula em microscopia óptica.

Reagentes:

Solução de Lugol: 10 g de iodeto de potássio
100 mL de água destilada
5 g de cristais de iodo.

Dissolver 10 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada. Adicionar lentamente 5 g de cristais de iodo, agitando simultaneamente. Filtrar e armazenar em frasco âmbar.

ANEXO 5

Método de fixação e coloração pela Solução de Verde Brilhante

(Dehority, 1984)

- 1- Pode-se utilizar em protozoários ciliados *in vivo* ou fixados em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984);
- 2- Colocar uma alíquota da amostra fresca ou fixada em um vidro de relógio;
- 3- Adicionar ao vidro de relógio 2 gotas de solução de verde brilhante;
- 4- Analisar entre lâmina e lamínula em microscopia óptica.

Reagentes:

Solução de verde brilhante: 2 g de corante verde brilhante
2 ml de ácido acético glacial
100 ml de água destilada

ANEXO 6

Método aperfeiçoado de impregnação pelo carbonato de prata

- 7) Centrifugar as amostras de conteúdo ruminal a 1300 rpm por 5 minutos;
- 8) Fixar o *pellet* das amostras com formalina 18,5% (v/v) (DEHORITY, 1984);
- 9) Em um tubo de ensaio adicionar 3 gotas da amostra fixada e 4mL de água destilada;
- 10) Adicionar os seguintes reagentes em sequência: 4 gotas de piridina PA; 6 gotas de proteose peptona bacteriológica 4%; 40 gotas de solução Rio-Hortega (FERNANDEZ-GALEANO, 1976). Neste momento, a solução torna-se branco leite;
- 11) Incubar o tubo de ensaio em banho-maria em temperatura aproximada de 40°C por aproximadamente 30 minutos. Após alguns minutos de incubação, a solução torna-se marrom transparente, e posteriormente marrom opaco;
- 12) Após 30 minutos de incubação, observar os ciliados entre lâmina e lamínula em microscopia óptica.

Reagentes:

- a) Formalina 18,5%: 50mL de formaldeído em concentração comercial, 50 mL de água destilada
- b) Proteose peptona bacteriológica a 4%: 96 mL de água destilada, 4 g de proteose peptona bacteriológica, 0,5 mL de formaldeído em concentração comercial
- c) Carbonato de prata amoniacal (FERNANDEZ-GALEANO, 1976): As proporções são importantes! Em um frasco colocar 50 mL de uma solução de nitrato de prata a 10% e acrescentar 150 mL de uma solução de carbonato de sódio, gotejar amônia aos poucos, até dissolver o precipitado, após, adicionar 750 mL de água destilada.

ANEXO 7

Microscopia eletrônica de varredura

(Silva-Neto et al., 2012)

- 1- Fixar aproximadamente 1 mL de conteúdo ruminal recentemente coletado em 1 mL de glutaraldeído 12%, 1 mL de solução tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,2) e 2 mL de tetróxido de ósmio 2% por 30 minutos;
- 2- Triar os ciliados em microscópio estereoscópico com auxílio de micropipetas;
- 3- Concentrar os ciliados em saleira e lavar em água destilada para retirada do excesso de fixador;
- 4- Desidratar o material em série alcoólica crescente (30°, 50°, 70°, 85°, 90°, 95° e 100°) por 15 minutos em cada;
- 5- Secar pelo método do ponto crítico em CO₂ em aparelho Balzers CPD-20, utilizando tubos de vidro vedados com rede de plâncton (15µm);
- 6- Transferir os ciliados para suportes metálicos contendo fita adesiva dupla face e conduzir para a metalização em aparelho Leica EM SCD050;
- 7- As amostras metalizadas são analisadas em microscópio eletrônico de varredura.

Reagentes

- a) Glutaraldeído 12%
- b) Solução tampão cacodilato de sódio 0,2 M
- c) Tetróxido de ósmio 2%