

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

Franciane Cedrola Vale

**Taxonomia e morfologia de protozoários ciliados (Litostomatea, Trichostomatia)
endossimbiontes de ruminantes domésticos no Brasil**

Juiz de Fora

2016

Franciane Cedrola Vale

**Taxonomia e morfologia de protozoários ciliados (Listostomatea, Trichostomatia)
endossimbiontes de ruminantes domésticos no Brasil**

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: Profa. Dra. Marta Tavares D'Agosto

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

Dra. Isabel Martinele Corrêa

Juiz de Fora

2016

Franciane Cedrola Vale

**Taxonomia e morfologia de protozoários ciliados (Litostomatea, Trichostomatia)
endossimbiontes de ruminantes domésticos no Brasil**

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.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Tavares D'Agosto (orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Thiago da Silva Paiva
Universidade Federal do Pará

*Dedico este trabalho à minha avó
Amélia Cedrola (in memoriam) que
sempre torceu pelas vitórias de seus
netos...*

*“C’est le temps que tu a perdu pour ta
rose qui fait ta rose si importante”*

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Ao concluir esta trajetória sinto-me na necessidade de agradecer àqueles que comigo percorreram este caminho e o tornaram mais ameno.

Agradeço primeiramente à **Deus** por me dar forças nos momentos difíceis.

À minha mãe **Lourdes** e à minha irmã **Geovana**, agradeço por todo o carinho e amor, por estarem sempre ao meu lado, pelas risadas e por todo companheirismo do dia-a-dia. Ao meu pai, **Francisco** agradeço pelo incentivo.

À querida **Tia Gina** sou eternamente grata por desempenhar o papel de mãe para mim, pelo carinho e por torcer e comemorar comigo cada conquista.

Ao **Ricardo**, meu amor, agradeço pelo companheirismo, amor, paciência e por toda ajuda durante a elaboração deste trabalho. Seu carinho e compreensão foram essenciais para que eu chegasse ao fim de mais esta etapa.

À Profa. Dra. **Marta D'Agosto** agradeço a orientação e confiança desde o início da Iniciação Científica, por todo acompanhamento e oportunidades muito importantes para o meu crescimento.

À Dra. **Isabel Martinele** agradeço pela amizade e por todo apoio durante toda minha trajetória desde o Início da Iniciação Científica e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Roberto Júnio Pedroso Dias** agradeço pela grande amizade, por compartilhar comigo o amor pela taxonomia, pelo tempo dedicado à minha formação e por todos os ensinamentos, conversas e conselhos ao longo deste tempo que trabalhamos juntos. Espero que nossa parceria dure por longos anos.

Ao Prof. Dr. **Geovergue Rodrigues de Medeiros** (Universidade Federal Rural de Pernambuco), ao Prof. Dr. **Gladston Rafael Arruda Santos** e ao Doutorando **José Adelson Santa-Neto** (Universidade Federal de Sergipe) agradeço por me enviarem as amostras de conteúdo ruminal utilizadas para a realização deste belo trabalho.

Ao Prof. Dr. **Burk A. Dehority**, da Ohio University, agradeço pelo envio de parte essencial da bibliografia para a conclusão das revisões taxonômicas realizadas nesta dissertação.

À Profa. Dra. **Sthefane D'Ávila** agradeço por todo carinho e paciência ao realizar alguns dos desenhos esquemáticos dos ciliados apresentados nesta dissertação.

À querida amiga **Luísa Oliveira** agradeço por todo o carinho e companheirismo, ajuda, desabafos, loucuras e risadas no dia-a-dia. A sua amizade trouxe leveza e alegria durante todo este caminho.

Ao querido amigo **Roberto de Oliveira Marchesini** agradeço pela grande amizade que cultivamos, não somente ao longo do Mestrado, mas durante todo o Curso de Ciências Biológicas. Você é um grande amigo!

À amiga **Rafaela Venançoni Matoso** agradeço pela amizade, companheirismo, risadas e conselhos ao longo deste último ano de Mestrado. Você é muito especial!

À amiga **Jéssica Andrade** agradeço a amizade e companheirismo. A sua amizade foi um grande presente que ganhei neste último ano de Mestrado. Espero que nossa parceria perdure por muitos anos!

Ao Dr. **Marcus Vinicius Xavier Senra** agradeço pela amizade, companheirismo e toda ajuda e tempo destinado à minha formação. Espero que ainda possamos trabalhar por muito tempo em parceria. Você é um grande profissional e amigo!

À querida **Rosângela (Rô)** agradeço pela amizade, carinho, conversas e pelas risadas e momentos de descontração no dia-a-dia da Pós-Graduação. À **Marlú e Osmar** agradeço por toda ajuda e por resolverem, sempre de bom humor, os problemas burocráticos na secretaria da Pós-Graduação.

Aos **Amigos do LabProto e “agregados” Raquel Tostes, Talys Jardim, Felipe Santos, Elen Furtado, Alessandra Louzada, Bianca Sartini, Mariana Rossi e Alyssa Borges** agradeço pelo companheirismo e por toda a alegria que vocês me proporcionam no meu dia-a-dia! Agradeço em especial, às bolsistas da linha de pesquisa em protozoários ciliados do rúmen, **Priscila Fregulia** e **Suyane Bordim** por toda a amizade, carinho e ajuda na elaboração deste trabalho e em trabalhos paralelos desenvolvidos no LabProto!

Aos demais **familiares e amigos**, que de alguma forma contribuíram para esta conquista, meus sinceros agradecimentos.

À **CAPES** agradeço pela concessão da bolsa de Mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (SEÇÃO 1). Ciliados do rúmen preparados com os métodos descritos neste estudo.....	36
Figura 1 (SEÇÃO 2). Abundância relativa média das três famílias de ciliados do rúmen de ovinos (<i>Ovis aries</i>) (Isotrichidae, Ophryoscolecidae e Parentodiniidae) alimentados com níveis crescentes de concentrado energético (20%, 40%, 60% e 80%).....	53
Figura 2 (SEÇÃO 2). Abundância relativa média das duas subfamílias de ciliados ofrioscolecídeos em ovinos (<i>Ovis aries</i>) alimentados com níveis crescentes de concentrado energético (20%, 40%, 60% e 80%).....	53
Figura 3 (SEÇÃO 2). <i>Entodinium contractum</i> Kofoid & Christenson registrados em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	55
Figura 1 (SEÇÃO 3). Seis morfotipos de <i>Diplodinium anisacanthum</i> da Cunha em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	75
Figura 2-28 (SEÇÃO 3). Desenhos esquemáticos de espécies descritas no gênero <i>Diplodinium</i> Schuberg baseados na descrição original.....	77
Figura 1 (SEÇÃO 4). <i>Diploplastron affine</i> (Dogiel & Fedorowa) e <i>Diploplastron dehorityi</i> n. sp. registrados em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (SEÇÃO 1). Primers utilizados na amplificação do gene 18S rDNA de ciliados do rúmen.....	33
Tabela 2 (SEÇÃO 1). Principais estruturas reveladas pelos métodos morfológicos descritos neste estudo.....	35
Tabela 3 (SEÇÃO 1). Métodos para estudar os diferentes caracteres morfológicos dos ciliados.....	35
Tabela 1 (SEÇÃO 2) Prevalência e abundância relativa \pm DP de protozoários ciliados registrados em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	52
Tabela 2 (SEÇÃO 2). Caracterização morfométrica de <i>Entodinium contractum</i> registrado em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	54
Tabela 1 (SEÇÃO 3). Medidas [μ m; média \pm DP; (mínimo-máximo); $n=20$] de seis morfotipos de <i>Diplodinium anisacanthum</i> da Cunha registrados em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	79
Tabela 2 (SEÇÃO 3). Características das espécies do gênero <i>Diplodinium</i> Schuberg.....	80
Tabela 1 (SEÇÃO 4). Medidas [μ m; média \pm DP; (mínimo-máximo); $n=20$] de duas espécies de <i>Diploplastron</i> Kofoid & MacLennan registradas em ovinos (<i>Ovis aries</i>) no Brasil.....	96

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
APRESENTAÇÃO	13
INTRODUÇÃO	14
SEÇÃO 1. Métodos taxonômicos utilizados no estudo de ciliados do rúmen (Alveolata, Ciliophora): uma breve revisão.....	21
SEÇÃO 2. Protozoários ciliados do rúmen de ovinos (<i>Ovis aries</i> L.) no Brasil, com novos registros e redescrição de <i>Entodinium contractum</i> (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae).....	47
SEÇÃO 3. Caracterização morfológica de <i>Diplodinium anisacanthum</i> da Cunha (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae) e notas taxonômicas do gênero <i>Diplodinium</i> Schuberg.....	65
SEÇÃO 4. Caracterização morfológica de duas espécies de <i>Diploplastron</i> e descrição de <i>Diploplastron dehorityi</i> , uma nova espécie de ciliados do rúmen de ovinos (<i>Ovis aries</i> L.) no Brasil.....	88

RESUMO

O presente estudo versa sobre taxonomia e morfologia de protozoários ciliados (Litostomatea, Trichostomatia) endossimbiontes de ruminantes domésticos no Brasil. O trabalho encontra-se dividido em quatro seções. A Seção 1 revisa os principais métodos em microscopia e biologia molecular utilizados no estudo taxonômico de protistas ciliados do rúmen. A Seção 2 apresenta um inventário de espécies de protozoários ciliados do rúmen de ovinos no Brasil, no qual foram inventariadas 28 espécies de ciliados, sendo que, *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum* e *Metadinium rotundatum* foram observados pela primeira vez em ovinos e outras 12 espécies foram observadas pela primeira vez em ovinos no Brasil. Ainda, a sessão apresenta a redescrição da espécie *Entodinium contractum* com base na morfologia geral e descrição da infraciliatura oral; a Seção 3 faz a caracterização morfológica de seis morfotipos da espécie *Diplodinium anisacanthum* e breve revisão taxonômica do gênero *Diplodinium*. A caracterização morfológica e morfométrica dos morfotipos de *D. anisacanthum* demonstraram grande similiaridade entre os mesmos sugerindo que tais ciliados constituam uma única espécie dotada de polimorfismos. A breve revisão realizada destaca as incongruências taxonômicas existentes no gênero *Diplodinium* e aponta a necessidade de estudos recentes com os representantes deste gênero de modo a reformular a taxonomia do grupo. Por fim, a Seção 4 descreve uma nova espécie de ciliado ofrioscolecídeo, *Diploplastron dehorityi* e redescrive a espécie *Diploplastron affine* com base em dados morfológicos, morfométricos e detalhes da infraciliatura oral. A nova espécie difere em alguns aspectos da espécie *D. affine*. As placas esqueléticas em *D. dehorityi* não são justapostas e possuem formato recurvado. Ainda, a nova espécie possui o corpo em formato oval, diferindo do formato elíptico de *D. affine*. Além das semelhanças existentes entre a nova espécie e a espécie congênere, *D. dehorityi* possui grande similaridade morfológica com espécies pertencentes ao gênero *Eremoplastron*, diferindo apenas no número de placas esqueléticas.

Palavras-chave: ciliados do rúmen, infraciliatura, ovinos, taxonomia

ABSTRACT

This study is about taxonomy and morphology of endosymbiotic ciliated protozoa (Litostomatea, Trichostomatia) of Brazilian domestic ruminants. The work is divided into four sections. Section 1 reviews the main methods in microscopy and molecular biology used in the taxonomic study of rumen ciliates. Section 2 presents an inventory of species of ciliated protozoa Brazilian sheep, which were inventoried 28 species of ciliates, and, *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum* and *Metadinium rotundatum* were first observed in sheep and other 12 species were first observed in Brazilian sheep. Still, the session shows the redescription of *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson (Entodiniomorphida, Ophryosoclecidae) based on general morphology and description of oral infraciliature; Section 3 is the morphological characterization of a polymorphic species of ophryoscolecid ciliate *Diplodinium anisacanthum* da Cunha and a brief taxonomic revision of the genus *Diplodinium* Schuberg. The morphological and morphometric characterization of *D. anisacanthum* showed great similarities among morphotypes suggesting that such ciliates constitute a single species endowed with polymorphism. A brief review conducted highlights the inconsistencies in the taxonomy of the genus *Diplodinium* and demonstrates the need for recent studies with representatives of the genus in order to improve the taxonomy of it. Finally, Section 4 describes a new species of ophryoscolecid ciliate *Diploplastron dehorityi* and redescrbe the species *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa) based on morphological and morphometric characterization and details of oral infraciliature. The new species differs in some aspects of the species *D. affine*. The skeletal plates in *D. dehorityi* are not juxtaposed and have curved shape. Still, the new species has the oval body, differing from the elliptical body of *D. affine*. In addition to the similarities between the new species and congener species, *D. dehorityi* has great morphological similarity to species of the genus *Eremoplastron*, differing only in the number of skeletal plates.

Key-words: infraciliature, rumen ciliate, sheep, taxonomy

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de Mestrado versa sobre taxonomia e morfologia de protozoários ciliados endossimbiontes de ruminantes domésticos no Brasil. Está dividida em quatro seções cada uma correspondendo a um artigo. A **SEÇÃO 1** é uma revisão sobre os principais métodos em microscopia e biologia molecular utilizados no estudo taxonômico de protozoários ciliados do rúmen; a **SEÇÃO 2** apresenta um inventário de espécies de protozoários ciliados do rúmen de ovinos no Brasil, com novos registros e redescrição da espécie *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae); a **SEÇÃO 3** faz a caracterização morfológica de uma espécie polimórfica de ciliado ofrioscolecídeo, *Diplodinium anisacanthum* da Cunha e breve revisão taxonômica do gênero *Diplodinium* Schuberg. A **SEÇÃO 4** descreve uma nova espécie de ciliado ofrioscolecídeo, *Diploplastron dehorityi* sp. nov. e redescrive a espécie *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa) com base em dados morfológicos, morfométricos e detalhes da infraciliatura oral. Em **ANEXO** estão apresentados os trabalhos aceitos para publicação e os trabalhos publicados ao longo do desenvolvimento da dissertação.

INTRODUÇÃO

Os protozoários ciliados (Alveolata, Ciliophora) constituem um grupo monofilético de eucariotos unicelulares reunidos pelo dimorfismo nuclear, reprodução sexuada por conjugação e complexa infraciliatura. São representados por aproximadamente 8000 espécies descritas, sendo dessas, aproximadamente 3000 de organismos endossimbiontes. Dentre tais, destacam-se aqueles pertencentes à subclasse Trichostomatia (Ciliophora, Litostomatea) que são essencialmente endossimbiontes em vertebrados, principalmente mamíferos herbívoros (LYNN, 2008).

Em mamíferos ruminantes, ciliados tricostomatídeos distribuem-se em duas ordens: Vestibuliferida Puytorac et al., 1974 e Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929. A ordem Vestibuliferida consiste de cinco famílias de ciliados endossimbiontes associados com praticamente todos os táxons de mamíferos herbívoros. Em ruminantes, ciliados vestibuliferídeos são principalmente representados pela família Isotrichidae Bütschli, 1889, que inclui espécies cobertas por densas cinécias (LYNN, 2008; DEHORITY, 1986b).

A ordem Entodiniomorphida é encontrada em associação com mamíferos de fermentação pré e pós-gástrica e é dividida em três subordens. As duas primeiras, Archistomatina Puytorac et al., 1974 e Blepharocorythina Wolska, 1971 são representadas pelas famílias Buetschliidae Poche, 1913 e Blepharocorythidae Hsiung, 1929, respectivamente. A terceira subordem, Entodiniomorphina Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929, compreende 10 famílias de ciliados endossimbiontes, incluindo a família Ophryoscolecidae. Os membros desta última são amplamente encontrados em mamíferos ruminantes e são caracterizados por apresentar zonas de ciliatura retráteis e macronúcleo alongado (LYNN, 2008; DEHORITY, 1986b).

Os ciliados ruminais foram descobertos por GRUBY & DELAFOND (1843) que os descreveram sem nomear e desenhar as espécies, relatando a presença de quatro morfotipos. Os primeiros desenhos esquemáticos destes protozoários foram realizados por COLIN (1854) em tratado sobre fisiologia comparada dos animais. Após estes primeiros relatos, foram descritos de forma sucinta diversos táxons de ciliados ruminais ao redor do mundo, bem como realizados trabalhos de caráter morfológico e taxonômico, destacando-se os estudos sobre sistemática do grupo desenvolvidos por DOGIEL (1923a, 1925a, 1926a, b, 1927; 1928, 1932, 1934, 1935), KOFOID & MACLENNAN (1930; 1932; 1933) e LUBINSKY (1957a-c). Até a década de 1960, o estudo morfológico e taxonômico de ciliados endossimbiontes de ruminantes envolveu

a descrição de novas espécies por meio do uso de preparações semipermanentes confeccionadas essencialmente com organismos fixados. NOIROT-TIMOTHÉE (1960) ampliou a visão sobre a complexidade morfológica destes organismos com detalhado estudo estrutural e ultraestrutural utilizando novas técnicas, tais como: impregnações pelo nitrato de prata, carbonato de prata amoniacal e técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Este estudo abriu caminho para os estudos atuais sobre morfologia e taxonomia dos ciliados endossimbiontes de ruminantes (ITO & IMAI, 1998; 2000; ITO et al., 2001; ITO & IMAI, 2003; 2005; 2006; MISHIMA et al., 2009; CEDROLA et al., 2014; 2016).

No Brasil, os estudos sobre ciliados do rúmen tiveram início com inventário taxonômico da ciliatofauna em bovinos e ovinos realizado por DA CUNHA (1914). Entretanto, novos estudos taxonômicos só foram retomados anos mais tarde (DEHORITY, 1979; 1986a; D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994; ROSSI, 2013; CEDROLA et al., 2014; 2016), o que ressalta necessidade de ampliação do conhecimento a cerca da taxonomia do grupo no Brasil. Nos estudos atuais no país, os organismos são essencialmente identificados em nível de gênero, com estudos abordando principalmente os seguintes temas: papel dos ciliados no metabolismo do hospedeiro (MARTINELE et al., 2008; 2010; 2014), ecologia (MARTINELE et al., 2007) e comportamento predatório (MARTINELE & D'AGOSTO, 2008), sendo escassos inventários taxonômicos (ROSSI, 2013; CEDROLA et al., 2016). DEHORITY (1986a) destaca que a diversidade de protistas ciliados do rúmen no Brasil possui importante parcela de endemismo e ressalta necessidade de investimento em estudos de levantamento principalmente devido à riqueza de hospedeiros silvestres e domesticados na pouco explorada região neotropical.

O presente estudo tem como objetivos ¹revisar os principais métodos em microscopia e biologia molecular utilizados no estudo taxonômico de protozoários ciliados ruminais; ²inventariar e determinar a prevalência e abundância relativa de protozoários ciliados de ovinos no Brasil e redescrever a espécie *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae); ³caracterizar morfológicamente seis morfotipos da espécie *Diplodinium anisacanthum* da Cunha (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) e realizar breve revisão taxonômica do gênero *Diplodinium* Schuberg; e ⁴caracterizar morfológicamente duas espécies pertencentes ao gênero *Diploplastron* Kofoid & MacLennan e descrever a espécie *Diploplastron dehorityi*, uma nova espécie de ciliado endossimbionte do rúmen de ovinos no Brasil.

REFERÊNCIAS

CEDROLA, F., MARTINELE, I., ROSSI, M. MEDEIROS, G. R., SANTOS, G. R. A., CARVALHO, F. F. R., D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados do rúmen de ovinos do nordeste brasileiro e infraciliatura de *Enoploplastron triloricatum* (Dogiel, 1925). **Principia**, v. 17, p. 71–79, 2014.

CEDROLA, F., ROSSI, M., DIAS, R. J. P., MARTINELE, I., D'AGOSTO, M. Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. **Zoological Science**, v. 32, p. 8–15, 2015.

CEDROLA, F., MARTINELE, I., DIAS, R.J.P., FREGULIA, P., D'AGOSTO, M. Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries* L.) with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). **Zootaxa**, v. 4088, n. 2, p. 292–300, 2016.

COLIN, G. Traité de physiologie comparée des animaux; considere dans ses rapports avec les sciences naturelles, la medicine, la zootechnie, et l'economie rurale. v. 1. Paris, Baillière, 1854.

CUNHA, A. M. Sobre os ciliados intetinaes de mamíferos no Brasil I. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 134–145, 1914.

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**, v. 11, p. 215–225, 1994.

DEHORITY, B. A. Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. **Journal of Protozoology**, v. 26, p. 536–544, 1979.

DEHORITY, B. A. Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: Occurrence of several ciliates new to the rumen, including the cyclosthid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 416–421, 1986a.

DEHORITY, B.A. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. **Insect Science and its application**, v. 7, n. 3, p. 279–296, 1986b.

DOGIEL, V. A. Die artbildung in der Infusorien-familie *Ophryoscolecidae*. **Biologisches Zentralblatt**, v. 43, p. 289–291, 1923.

DOGIEL, V. A. Nouveaux infusores de la famille de *Ophryoscolecidae* parasites d'antilopes africaines. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 3, p. 116–142, 1925a.

DOGIEL, V. A. On the influence of the macronucleus on the formation of new morphological characters in infusoria. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 69, p. 611–617, 1925b.

DOGIEL, V. A. Une nouvelle espece du genre *Blepharocorys*, *B. bovis* n. sp. habitant l'estomac du boeuf. **Annales de Parasitologie**, v. 4, p. 61–64, 1926.

DOGIEL, V. A. Monographie der familie *Ophryoscolecidae*. **Archiv fur Protistenkunde**, v. 59, p. 1–288, 1927.

DOGIEL, V. A. La faune d'infusoires inhabitant l'estomac du buffle et du dromadaire. **Annales de Parasitologie**, v. 6, p. 323–338, 1928.

DOGIEL, V. A. Beschreibung einiger neuer vertreter der Familie *Ophryoscolecidae* aus afrikanischen Antilopen nebst Revision der infusorien Fauna afrikanischer Wiederkauer. **Archiv fur Protistenkunde**, v. 77, p. 92–107, 1932.

DOGIEL, V. A. Angaben ber die *Ophryoscolecidae* des Wildschafs aus kamtschatka des Elches und des Yaks, nebst deren zoogeographischen Verwertung. **Archiv fur Protistenkunde**, v. 82, p. 290–297, 1934.

DOGIEL, V. A. Eine Notiz ber die Infusorien des Renttiermagens. **Transactions of the Arctic Institute, Leningrad**, v. 24, p. 144–148, 1935.

GRUBY, D. & DELAFOND, H. M. O. Recherches sur des animalcules se developant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. **Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences**, v.17, p. 1304–1308, 1843.

ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecid ciliate. *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925) observed by light microscopy. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 628–636, 1998.

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 Ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 103–110, 2006.

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.

KOFOID, C. A & MACLENNAN, R. F. 1930. 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. A revision of *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, v. 37, p. 53–152, 1932.

KOFOID, C. A. & MACLENNAN, R. F. Ciliates from *Bos indicus* Linn. 3. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen. nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, v. 39, p. 1–34, 1933.

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 the *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 the *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.

MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (Ciliophora: Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 451–455, 2008.

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 Zootecnia**, v. 9, p. 63–66, 2007.

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 área. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 169–175, 2010.

MARTINELE, I.; SILVA, L.F.; D'AGOSTO, M.; MUNIZ, E.N.; SÁ, J.L. de; SANTOS, G.R.A. Abundance and diversity of rumen protozoa in lambs fed Gliricidia sepium silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 8, p. 436-439, 2014.

MARTINELE, I., SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V., D' AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção e Animal**, v. 9, p. 74–81, 2008.

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-TIMOTHEE, C. Etude d'une famille de cilies: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v. 2, p. 527–718, 1960.

ROSSI, M. **Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de protistas ciliados (Ciliophora, Litostomatea) encontrados em ruminantes domésticos**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 153 pp. 2013.

ROSSI, M., DIAS, R. J. P., SENRA, M. V. X., MARTINELE, I., SOARES, C. A. G., D'AGOSTO, M. Molecular Phylogeny of the Family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) Inferred from 18S rDNA Sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 1, p. 1–7, 2015.

SEÇÃO 1

MÉTODOS TAXONÔMICOS UTILIZADOS NO ESTUDO DE CILIADOS DO RÚMEN (ALVEOLATA, CILIOPHORA): UMA BREVE REVISÃO

(artigo publicado no periódico Zoological Science, anexo 1)

ABSTRACT: This review presents the principal methods used in taxonomic studies of rumen ciliates: live observation, Lugol staining, fixation and staining with methyl-green formalin saline (MFS) solution, protargol staining, silver carbonate impregnation, scanning electron microscopy and molecular techniques. Mastering these techniques is essential for successful research on the taxonomy of rumen ciliates. No single technique reveals all of characteristics required for a complete description of a rumen ciliate; therefore, it is necessary to combine the use of these techniques as appropriate for the rumen ciliate group under study. Tables are provided to summarize: 1) morphological methods more appropriate to reveal each morphological structure to be studied, 2) morphological methods indicated for each group of rumen ciliates, and 3) main primers used for PCR amplification of the 18S rDNA of rumen ciliates.

Key words: Lugol's solution, methyl green, molecular techniques, protargol, rumen protozoa, silver carbonate, SEM

INTRODUÇÃO

Desde a primeira observação dos ciliados do rúmen por GRUBY & DELAFOND (1843), estes protistas são observados em diversos hospedeiros ruminantes domésticos e selvagens ao redor do mundo (D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994). O interesse a respeito deles é crescente, visto a questionável participação que apresentam na fisiologia digestiva do hospedeiro, especialmente no processo de produção de metano entérico e nas intrínsecas relações ecológicas que estabelecem com os demais organismos que compõem a microbiota ruminal. Para melhor entendimento destas questões, faz-se necessário o reconhecimento específico das populações de protozoários ruminais. Entretanto, frente aos trabalhos que são produzidos envolvendo este grupo, poucos se preocupam com a caracterização morfológica eficaz.

Os ciliados do rúmen (Litostomatea, Trichostomatia) são um grupo morfológicamente diverso com representantes em duas ordens: Vestibuliferida Puytorac et al., 1974 e Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929. A ordem Vestibuliferida consiste de cinco famílias de ciliados endossimbiontes associados com mamíferos placentários. Em mamíferos ruminantes, ciliados vestibuliferídeos são principalmente representados pela família Isotrichidae Bütschli, 1889, que inclui espécies cobertas por densas cinécias (LYNN, 2008).

A ordem Entodiniomorphida é comumente encontrada em mamíferos herbívoros e é dividida em três subordens. As duas primeiras subordens, Archistomatina Puytorac et al., 1974 e Blepharocorythina Wolska, 1971 são representadas pelas famílias Buetschliidae Poche, 1913 e Blepharocorythidae Hsiung, 1929. A terceira subordem, Entodiniomorphina Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929, compreende 10 famílias de ciliados endossimbiontes, incluindo a família Ophryoscolecidae. Os membros desta última são amplamente encontrados em mamíferos ruminantes e são caracterizados por apresentar zonas de ciliatura retráteis e macronúcleo alongado (LYNN, 2008).

Segundo FOISSNER (2014), um único método morfológico não revela todos os detalhes necessários para a descrição completa de um ciliado, e nenhum método é igualmente adequado para todos os grupos. Descrições detalhadas de ciliados do rúmen usualmente exigem, no mínimo, coloração pela solução de Lugol e impregnação pelo carbonato de prata (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999; ITO & IMAI, 2006). Entretanto, observação *in vivo*, coloração pela solução salina de verde de metila e formalina (solução MFS), impregnação pelo protargol e microscopia eletrônica de varredura ampliam a gama de possíveis caracteres morfológicos a serem usados na taxonomia

deste grupo de ciliados (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; IMAI & OGIMOTO, 1978; OGIMOTO & IMAI, 1981; D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994).

O estudo taxonômico de ciliados ruminais inicialmente envolvia o uso de preparações semipermanentes confeccionadas essencialmente com organismos fixados (DOGIEL, 1927). Trabalhos com protozoários ciliados do rúmen envolvendo observação *in vivo* são escassos na literatura, devido à dificuldade da manutenção de tais organismos em culturas laboratoriais. As preparações semipermanentes com corantes à base de iodo (KOFOID & MACLENNAN, 1932; KOFOID & CHRISTENSON, 1933; D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) e verde de metila (CLARKE, 1964; DEHORITY, 1984; IMAI, 1988) são as mais comuns, pois evidenciam os principais caracteres taxonômicos usados na identificação em nível de gênero deste grupo.

As preparações permanentes foram utilizadas posteriormente e atualmente fazem parte dos requisitos necessários para se obter uma descrição completa de um ciliado do rúmen (ITO & IMAI, 1998; D'AGOSTO & SANTA ROSA, 2000). Além das técnicas para microscopia óptica, a microscopia eletrônica de varredura e transmissão tem sido utilizadas, pois evidenciam importantes detalhes da morfologia dos ciliados ruminais tais como ornamentação da superfície externa e disposição dos cinetossomos que compõem as infraciliaturas oral e somática (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; IMAI & OGIMOTO, 1978; IMAI & TASHIRO, 1982; IMAI, 1988; IMAI et al., 1992).

Estudos taxonômicos recentes de ciliados tem utilizado abordagens multidisciplinares para caracterizar cada espécie, incluindo dados morfológicos, ecológicos e moleculares (MODEO et al., 2006, 2013). Os estudos moleculares com ciliados do rúmen iniciaram com o sequenciamento do gene 18s rDNA com objetivo de esclarecer a filogenia interna da classe Litostomatea (WRIGHT et al., 1997; WRIGHT & LYNN, 1997a, b). Numerosos estudos quantitativos e qualitativos sobre a diversidade de ciliados do rúmen foram realizados posteriormente utilizando as seguintes técnicas: polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) (REGENSBOGENOVA et al., 2004a; TYMENSEN et al., 2012), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (REGENSBOGENOVA et al., 2004b; MCEWAN et al., 2005; de la FUENTE et al., 2009; BELANCHE et al., 2010; KITTELMAN & JANSEN, 2011), PCR em tempo real (qPCR) (SILVESTER et al., 2004; SKILMMAN et al., 2006; BELANCHE et al., 2010; KITTELMAN & JANSEN, 2011) e sequenciamento de nova geração (NGS) (KITTELMAN et al., 2013; ISHAQ & WHRIGHT, 2014). Devido à dificuldade de manutenção dos ciliados em culturas monoclonais e do isolamento dos mesmos do

restante do conteúdo ruminal foram desenvolvidos iniciadores específicos para a amplificação do gene 18S rDNA de ciliados ruminais (KANARTI et al., 2003; REGENSBOGENOVA et al., 2004b; SYLVESTER et al., 2004).

Este trabalho fornece protocolos descritos passo a passo dos principais métodos em microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e técnicas moleculares usados em estudos de morfologia e taxonomia de ciliados do rúmen. Existem diversos protocolos propostos na literatura, entretanto, foram selecionados aqueles mais utilizados por nosso grupo de pesquisa, sendo os resultados obtidos com os métodos apresentados destacados e comentados.

MÉTODOS

1. Observação *in vivo* de ciliados do rúmen

A observação *in vivo* é um método importante no estudo taxonômico de ciliados, pois permite a análise de caracteres dificilmente observados em preparações com organismos fixados (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FOISSNER, 2014). Entretanto, devido à dificuldade de manutenção dos ciliados do rúmen em cultivos laboratoriais, estudos desta natureza são raros (SHARP, 1914; KOFOID & MACLENNAN, 1930, 1932, 1933; NOIROT-TIMOTHÉE, 1960).

Os sistemas de cultivo de ciliados do rúmen podem ser divididos em dois tipos: o sistema de cultivo descontínuo e o sistema de cultivo contínuo (também conhecido por rúmen artificial) (OGIMOTO & IMAI, 1981). No sistema de cultivo descontínuo, os cultivos são montados em garrafas ou em tubos do tipo *falcon* preenchidos com uma solução de sais minerais contendo grama seca, amido e fluido ruminal fresco; gaseificada com CO₂ ou 5% CO₂ + 95% N₂ e vedados com rolhas de cortiça (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLEMAN, 1992; HOBSON & STEWART, 1997; DEHORITY, 2003). Neste tipo de cultivo, os ciliados não sobrevivem por longos períodos (um mês em média), e as culturas mistas são difíceis de manter.

O Sistema de cultivo contínuo (rúmen artificial) opera em condições similares às encontradas no rúmen. Este sistema representa um modelo perfeito para estudos sobre a função do ambiente ruminal e mantém os ciliados vivos por longos períodos. Entretanto, sua manutenção é cara e raramente são usados em estudos que possuem o foco unicamente nos ciliados ruminais (OGIMOTO & IMAI, 1981; WILLIAMS & COLEMAN, 1992).

Para realização de estudos taxonômicos, como alternativa aos métodos de cultivo, pode-se utilizar amostras frescas de conteúdo ruminal mantidas em garrafas térmicas. Os ciliados neste método sobrevivem por aproximadamente 12 horas, tempo suficiente para realização de estudos taxonômicos. Especificamente, ciliados ofrioscolecídeos e isotriquídeos são mantidos por aproximadamente 9 e 12 horas, respectivamente.

Os ciliados em cultivo ou em amostras frescas podem ser triados individualmente com micropipetas de fabricação própria (DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS, 1989), transferidos para uma lâmina, cobertos por lamínula, contendo pinceladas de vaselina (FOISSNER, 2014), e observados sob microscópio de campo claro e/ou com contraste diferencial interferencial (Nomarski microscopy). Existem alguns métodos físicos e químicos usados para retardar o movimento de ciliados de diversos grupos (para detalhes ver FOISSNER, 2014), entretanto não há relatos do uso destes métodos para ciliados do rúmen.

Nas observações *in vivo* é possível verificar o ¹aspecto das zonas ciliares, principalmente nos ciliados ofrioscolecídeos, os quais apresentam arranjo ciliar característico, que se desfaz em certas condições, como na presença de formaldeído durante a fixação, ²formato do corpo, ³morfologia do vestíbulo, ⁴presença, número e posição de vacúolos contráteis, ⁵formato e posição do aparato nuclear, ⁶citoprocto, bem como a ⁷coloração do corpo. Nas Figuras 1 (A; B) observam-se protozoários ciliados ruminais das espécies *Entodinium ovinum* Dogiel, 1927 e *Eremoplastron rostratum* (Fiorentini, 1889) *in vivo*, evidenciando o formato do corpo, morfologia do vestíbulo, vacúolos contráteis e aspecto das zonas ciliares.

2. Preparações semipermanentes com corantes à base de iodo

As técnicas mais adequadas para visualização das placas esqueléticas em ciliados do rúmen são as preparações contendo corantes à base de iodo (KOFOID & CHRISTENSON, 1933; CLARKE, 1964; DEHORITY, 1974; VAN HOVEN, 1983; D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999), pois este corante apresenta afinidade por polissacarídeos, que são os principais constituintes das placas esqueléticas encontradas em grande parte dos gêneros de ciliados ofrioscolecídeos (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960). O número, a morfologia e a biometria das placas esqueléticas constituem importantes caracteres diagnósticos de gêneros e espécies dentre os Ophryoscolecidae (WILLIAMS & COLEMAN, 1992).

A técnica de coloração pela solução de Lugol proposta por D'AGOSTO & CARNEIRO (1999) é pouco utilizada em estudos taxonômicos de ciliados, embora seja de grande importância no estudo de ciliados ruminais. Esta técnica é prática, rápida e fácil de ser reproduzida. Nas Figuras 1 (C; D) estão evidenciadas as placas esqueléticas de *Metadinium esalqum* (Dehority, 1979) e *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa, 1925), respectivamente, coradas por meio deste método.

Procedimento (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999)

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

Reagentes

a) Solução de Lugol:

10 g de iodeto de potássio

100 mL de água destilada

5 g de cristais de iodo

Observações: 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.

3. Preparações semipermanentes com corantes à base de verde de metila

As preparações mais indicadas para visualização do aparato nuclear são aquelas à base do corante verde de metila (CLARKE, 1964; DEHORITY, 1984; OGIMOTO & IMAI, 1981). O protocolo proposto por OGIMOTO & IMAI (1981) é um dos mais utilizados no estudo da ciliatofauna ruminal. Nas Figuras 1 (E; F) é possível observar em detalhe o macronúcleo das espécies *Ostracodinium dogieli* (Dogiel, 1927) e *Isotricha intestinalis* Stein, 1858, corados por meio deste método.

Procedimento (OGIMOTO & IMAI, 1981)

1. Preparar a solução MFS.
2. Adicionar à alíquota de conteúdo ruminal coletada, 5 a 10 volumes de solução MFS.
3. Após 30 minutos, observar em microscopia óptica.

Reagentes

a) Solução MFS:

100 ml de formaldeído 35%
900 ml de água destilada
0,6g de verde de metila
8g de cloreto de sódio

Observações: Misturar todos os reagentes e armazenar no escuro, pois o verde de metila em contato com a luminosidade transforma-se em violeta de metila inutilizando o reagente.

4. Método de impregnação pelo proteinato de prata (Protargol)

A técnica de impregnação pelo proteinato de prata (protargol) descrita por BODIAN (1936, 1937) foi modificada para o estudo morfológico de protistas ciliados por vários autores (DRAGESCO, 1962; TUFFRAU, 1967; WILBERT, 1975; FOISSNER, 1991; DIECKMANN; 1995; SILVA-NETO, 2000). Entretanto, existem poucos protocolos adaptados para o estudo dos ciliados do rúmen, destacando-se o trabalho de D'AGOSTO & SANTA-ROSA (1994). No entanto, devido à falta de formas comercialmente disponíveis de protargol apropriadas para a impregnação pela prata de protozoários ciliados, o nosso grupo de pesquisa tem sintetizado este reagente usando o protocolo descrito por PAN et al. (2013).

As principais estruturas impregnadas pelo protargol em ciliados do rúmen são as ¹zonas ciliares, as ²bandas de infraciliatura e o ³aparato nuclear. Iremos apresentar aqui uma pequena modificação do protocolo estabelecido por TUFFRAU (1967) sugerida por D'AGOSTO & SANTA-ROSA (1994) e utilizada por nosso grupo de pesquisa. Nas Figuras 1 (G; H) estão evidenciados alguns caracteres morfológicos de duas espécies do gênero *Entodinium* Stein, 1859 impregnados por meio desta técnica.

Procedimento (TUFFRAU, 1967)

Fixação:

1. Fixar o conteúdo ruminal (v/v) em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984).
2. Triar os ciliados com auxílio de micropipetas.
3. Aderir os ciliados às lâminas de microscopia com uma gota de albumina glicerinada de Mayer e deixar secar por pelo menos 24 horas em temperatura ambiente.

Pós Fixação:

1. Imergir a lâmina em borel contendo Bouin por 25 minutos.
2. Imergir a lâmina em borel contendo álcool 70% por 1 hora e 15 minutos.
3. Lavar a lâmina em água corrente por 10 minutos.
4. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 2 minutos (2 vezes).
5. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 5 minutos.
6. Imergir a lâmina em borel contendo permanganato de potássio 0,5% por 2 minutos.
7. Lavar a lâmina em água corrente por 10 minutos.
8. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 2 minutos (2 vezes).
9. Imergir a lâmina em borel contendo ácido oxálico a 5% por 2 minutos.
10. Lavar a lâmina em água corrente por 10 minutos.
11. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 2 minutos (2 vezes).

Impregnação:

12. Imergir a lâmina em borel contendo proteinato de prata 1% por até 12 horas em temperatura ambiente
13. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 2 minutos (2 vezes).

Revelação:

14. Imergir a lâmina em borel contendo hidroquinona 0,1% por 2 minutos.
15. Imergir a lâmina em borel contendo água destilada por 1 minuto.
16. Imergir a lâmina em água destilada por 2 minutos (2 vezes).

Desidratação:

17. Imergir a lâmina em série alcoólica crescente (álcool 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100% por 2 minutos em cada).
18. Montar a lâmina em meio sintético e deixar secar em temperatura ambiente.

Reagentes

- a) Bouin:
 - 150 ml de álcool 80%
 - 60 ml de formaldeído em concentração comercial (37%)
 - 1g de ácido pícrico
 - 15 ml de ácido acético glacial
- b) Permanganato de potássio 0,5%:
 - 0,5g de permanganato de potássio
 - 100 ml de água destilada
- c) Ácido oxálico 5%:
 - 5g de ácido oxálico
 - 100 ml de água destilada
- d) Proteinato de prata a 1%:
 - 0,1g de proteinato de prata
 - 10 ml de água destilada.

Observações: Colocar o pó sobre a água e deixar decantar *overnight*. Armazenar no escuro em frasco coberto com papel alumínio.

- e) Hidroquinona:
 - 10 ml de água destilada
 - 0,5g de sulfito de sódio
 - 0,1g de hidroquinona.

Observações: Armazenar em geladeira em frasco coberto com papel alumínio.

5. Método de impregnação pelo carbonato de prata

A técnica de impregnação pelo carbonato de prata amoniacal com piridina foi descrita por FERNANDEZ-GALIANO (1976) e modificada por diversos autores de acordo com o grupo de ciliado em estudo (FOISSNER, 2014). É utilizada para evidenciar a infraciliatura oral e somática e o aparato nuclear de vários grupos de ciliados. Esta técnica é rápida e funciona bem para diversos grupos de ciliados, entretanto, requer grande quantidade de organismos (FOISSNER, 2014).

Dentre as técnicas de impregnação pela prata, a impregnação pelo carbonato de prata é a mais adequada para os ciliados do rúmen, havendo alguns protocolos adaptados para estes ciliados (ITO & IMAI, 1998, 2006). Nas figuras 1I e 1J estão evidenciadas as bandas de infraciliatura e o aparato nuclear de *Eodinium posterovesiculatum bilobosum* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Entodinium bursa* Stein,

1858 respectivamente, submetidos a este método de impregnação. Este método tem sido utilizado de forma rotineira em estudos de taxonomia de ciliados do rúmen, principalmente para os ofrioscóleceídeos, visto que a organização da ciliatura oral varia consideravelmente entre as espécies destes ciliados (ITO & IMAI, 2006; MISHIMA et al., 2009).

Procedimento (ITO & IMAI, 2006)

1. Fixar o conteúdo ruminal contendo os ciliados em 3-5 volumes de solução MFS ou em 10% formalina 10%.
2. Observação: armazenar em local escuro.
3. Concentrar os ciliados por centrifugação a 1300 rpm.
4. Colocar três gotas da amostra concentrada em um tubo de ensaio contendo 4-6 mL de água destilada.
5. Adicionar quatro gotas de piridina pura, seis gotas de proteose peptona 4% e 10 gotas de Rio Hortega (solução de carbonato de prata amoniacal) (FERNANDEZ-GALIANO, 1976).
6. Incubar o tubo de ensaio em banho-maria a 60-70° C por dois minutos.
7. Adicionar aproximadamente 4-6 mL de água destilada ao tubo de ensaio.
8. Concentrar os ciliados por centrifugação a 1300 rpm. Remover o sobrenadante.

Reagentes

- a) Solução MFS:
 - 100 mL de formaldeído 35%
 - 900 mL de água destilada
 - 0,6 g de verde de metila
 - 8 g de cloreto de sódio
- b) Formalina 10%:
 - 10 mL de formaldeído 37%
 - 90 mL de água destilada
- c) Peptona 4%:
 - 96 mL de água destilada
 - 4 g de proteose peptona bacteriologica
 - 0,5 mL formalina 37%

d) Rio Hortega (solução de carbonato de prata amoniacal) (FERNANDEZ-GALIANO, 1976): As proporções são importantes! 50 mL de solução de nitrato de prata a 10% são adicionados em um frasco; 150 mL de solução de carbonato de prata a 5% são adicionados pouco a pouco. Ocorre a formação de um precipitado; adicionar amônia 25%, gota a gota, até que o precipitado formado se dissolva. Atentar para não adicionar amônia em excesso; finalmente, adicionar água destilada até completar o volume de 750 mL. A solução permanece estável por vários anos.

6. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura revela importantes caracteres da morfologia da superfície externa dos ciliados ruminais, tais como ¹estriações da película, ²poros excretores, ³detalhes da ciliatura oral e somática e ⁴morfologia de lobos e espinhos na região posterior do corpo (IMAI et al., 1992; FOISNNER, 2014).

Embora a maioria dos caracteres de importância taxonômica em ciliados do rúmen seja revelado por microscopia óptica, a identificação específica de certos táxons de Ophryoscolecidae necessita a utilização de microscopia eletrônica de varredura. Por exemplo, a espécie *Diplodinium lochinvarense* Imai et al., 1992 a qual apresenta a superfície do corpo coberta por pequenas protuberâncias (IMAI et al., 1992).

Em nossos estudos com ciliados ruminais, nosso grupo de pesquisa utiliza o reagentes e fixadores indicados por SILVA-NETO (1994) e o protocolo descrito em SILVA-NETO et al. (2012). (Figuras 1 K; L).

Procedimento (SILVA-NETO et al., 2012)

1. Fixar aproximadamente 1 mL de conteúdo ruminal em uma mistura contendo 1 mL de glutaraldeído 12% + 1 mL de solução tampão cacodilato de sódio 0.2 M (pH 7.2) + 2 mL de tetróxido de ósmio por 30 minutos;
2. Concentrar os ciliados em estereomicroscópio, com auxílio de uma micropipeta e após, lavá-los em água destilada para retirar o excesso de fixador;
3. Desidratar o material em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 85%, 90% e 100%), por 15 minutos em cada;
4. Secar o material utilizando CO₂ em ponto crítico;

5. Transferir o material para suportes contendo fita dupla-face e seguir para a metalização;
6. Examinar o material em microscópio eletrônico de varredura;

Reagentes

- a) Glutaraldeído 12 % (solução comercial 25%):
 - 48 mL de glutaraldeído 25%
 - 52 mL de água destilada
- b) Solução tampão cacodilato de sódio 0.2 M (pH 7.2)
 - 42,8 g de cacodilato de sódio
 - 1000 mL de água destilada
- c) Tetróxido de ósmio 2%
 - 1 g de tetróxido de ósmio
 - 50 mL de água destilada

TÉCNICAS MOLECULARES

Técnicas moleculares foram introduzidas no estudo de ciliados do rúmen na década de 1990 com o sequenciamento do gene 18 rDNA dos organismos objetivando compreender as relações filogenéticas entre os representantes da classe Litostomatea (WRIGHT et al., 1997; WRIGHT & LYNN, 1997a, b). Estes estudos iniciais eram realizados com ciliados isolados de culturas monoclonais ou diretamente do rúmen (BAROIN-TOURANCHEAU et al., 1992, 1995, 1998; EMBLEY et al., 1995; WRIGHT et al., 1997; WRIGHT & LYNN, 1997a, b). No último caso, no entanto, o uso de iniciadores universais favorecia a contaminação da amostra com DNA de outros eucariotos presentes no ambiente ruminal, tais como fungos, protistas flagelados e partículas vegetais. Recentemente, os dados moleculares, especificamente sequências do gene 18S rDNA, tem sido usados para reavaliar a taxonomia e sistemática de vários grupos de ciliados (STOECK et al., 1998; LI et al., 2006; HUANG et al., 2012; BACHY et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Embora os resultados de vários estudos corroborem a classificação com base em dados morfológicos e / ou ontogenéticos, alguns resultados levaram a conclusões radicalmente diferentes (STRUDER-KYPKE et al., 2000; CAMERON et al., 2001; CHEN & SONG, 2002; CAMERON et al., 2003; LI & SONG, 2006). A quantidade de sequências do gene 18S rDNA disponíveis no

GenBank para ciliados do rúmen é muito pequena em relação ao grande número de sequências existentes para outros grupos de ciliados. A fim de melhor utilizar esse marcador molecular em decisões taxonômicas neste grupo de estudo, é necessário aumentar o banco de dados com mais sequências. Recentemente, iniciadores específicos para ciliados ruminais foram desenhados visando a amplificação do gene de 18S rDNA desses microrganismos (KANARTI et al., 2003; REGENSBOGENOVA et al., 2004b; SYLVESTER et al., 2004; SKILLMAN et al., 2006) (Tabela 1). Embora a maioria dos estudos moleculares com ciliados ruminais possuam como alvo o gene de 18S rDNA, outros marcadores moleculares podem ser utilizados, tais como 28S rRNA (BAROIN-TOURANCHEAU et al., 1992, 1995), ITS (WRIGHT, 1999), e α -tubulina (BAROIN-TOURANCHEAU et al., 1995). Além do foco na sistemática e taxonomia, estudos moleculares utilizando as técnicas RFLP (REGENSBOGENOVA et al., 2004a), DGGE (REGENSBOGENOVA et al., 2004b; de la FUENTE et al., 2009; BELANCHE et al., 2010; KITTELMAN et al., 2011), e NGS do gene 18S rDNA (KITTELMAN et al., 2013; ISHAQ & WRIGHT, 2014) tem sido realizados para revelar a riqueza destes ciliados em diferentes hospedeiros e sob diferentes dietas e em diferentes regiões geográficas. Além disso, a qPCR (SYLVESTER et al., 2004; SKILLMAN et al., 2006; BELANCHE et al., 2010; KITTELMANN & JANSSEN, 2011) e T-RFLP (TYMENSEN et al., 2012) tem sido utilizadas na investigação da estrutura da ciliatofauna ruminal.

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação do gene 18S r DNA de ciliados do rúmen

Grupo / Gênero / Espécie	Região amplificada	Foward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento	Referência
Células eucarióticas	18S rDNA	AACCTGGTTGATC CTGCCAGT	TGATCCTTCTGCAG GTTCACCTAC	50°C	Medlin et al.
Protozoários do rúmen (Vestibuliferídeos e Entodiniomorífídeos)	18S rDNA	CTTTCGATGGTAG TGTATTGGACTAC	TGATCCTTCTGCAG GTTCACCTAC	37°C	Kanarti et al.
Protozoários do rúmen (Vestibuliferídeos e Entodiniomorífídeos)	18S rDNA	GGTGGTGCATGG CCG	AATTGCAAAGATC TATCCC	60°C	Regensbogenova et al.
Protozoários do rúmen (Vestibuliferídeos e Entodiniomorífídeos)	18S rDNA	CAYGTCTAAGTAT AAATAACTAC	CTCTAGGTGATWW GRTTTAC	55°C	Sylvester et al.
Protozoários do rúmen (<i>Entodinium</i> , <i>Epidinium</i> e <i>Ophryoscolex</i>)	18S rDNA	GAGCTAATACAT GCTAAGGC	TGATCCTTCTGCAG GTTCACCTAC	56°C	Skillman et al.
Protozoários do rúmen (<i>Entodinium</i>)	18S rDNA	GAGCTAATACAT GCTAAGGC	CCCTCACTACAATC GAGATTTAAGG	55°C	Skillman et al.
Protozoários do rúmen (<i>Dasytricha ruminantium</i>)	18S rDNA	CTAGAGCTAATA CATGCC	CTACAATCACAAT TAAATTGC	55°C	Skillman et al.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento acerca dos principais métodos em microscopia empregados em estudos de morfologia e taxonomia para os diversos grupos de ciliados do rúmen permite a escolha adequada do método a ser realizado conforme a estrutura a ser evidenciada e a técnica mais adequada para grupo de ciliado ruminal (Tabelas 2; 3).

As principais revisões sobre as metodologias adequadas para estudo taxonômico de diversos grupos de ciliados (FOISSNER, 1991; 2014) não apresentam em detalhe os procedimentos e técnicas específicos para protozoários ciliados do rúmen. Os protocolos apresentados nesta revisão foram plenamente eficazes na visualização de caracteres morfológicos relevantes para a caracterização taxonômica dos ciliados ruminais, sendo também mais simples do que muitas técnicas descritas em trabalhos anteriores.

A observação dos ciliados do rúmen *in vivo* evidencia caracteres não observados em organismos fixados, sendo essencial em estudos morfológicos detalhados. A zona de ciliatura nos ciliados da família Ophryoscolecidae que apresenta arranjo característico, se desfaz no momento da fixação (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960), sendo observada em detalhe somente *in vivo*. As preparações semipermanentes são práticas e rápidas, sendo úteis em estudos ecológicos que abordem o papel da dieta dos ruminantes sobre a estrutura e composição da taxocenose de ciliados do rúmen, pois evidenciam características espécie-específicas destes micro-organismos tais como: formato do corpo, formato e número das placas esqueléticas e formato e posição do aparato nuclear. Os métodos de impregnação pela prata são essenciais em estudos taxonômicos de ciliados, visto que impregnam as ciliaturas oral e somática, características espécie-específicas dentre os ciliados ruminais (ITO & IMAI, 2003, 2005), e produzem lâminas permanentes que podem ser depositadas em coleções de referência. Os fixadores utilizados na técnica de microscopia eletrônica de varredura permitem a manutenção do formato corporal, em especial dos lobos e espinhos caudais, e preservam em detalhe a película destes ciliados, sendo importante ainda no estudo das bactérias metanogênicas ectossimbiontes associadas a estes ciliados (VOGELS et al., 1980). Ainda, dados moleculares tem se mostrado muito importantes em estudos taxonômicos de ciliados do rúmen, e, conseqüentemente, é necessário aumentar o número de marcadores moleculares e sequências de genes 18S rDNA para esses microrganismos em bancos de dados genéticos.

A presente revisão atinge diferentes áreas de conhecimento, uma vez que conta com metodologias de simples e fácil aplicação, cujo emprego se faz necessário em pesquisas na Zootecnia, além de protocolos mais elaborados para estudos de caráter taxonômico.

Tabela 2. Principais estruturas reveladas pelos métodos morfológicos descritos neste estudo

Estrutura revelada	Observação in vivo	Solução de Lugol	Solução MFS	Protargol	Carbonato de Prata	MEV
Aparato nuclear	+	+/-	++	++	++	-
Zonas ciliares	++	+/-	+/-	+	-	+
Citoprocto	+	++	+	+	+	+
Coloração	++	-	-	-	-	-
Ornamentação externa	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++
Formato do corpo	++	+	+	+	+	++
Bandas infraciliares	-	-	-	+/-	++	-
Placas esqueléticas	+	++	+/-	+/-	+/-	-
Lobos caudais, espinhos	++	++	++	++	++	++
Vacúolos contráteis	++	+	+/-	+/-	+/-	-
Formato do vestíbulo	++	+	+	+/-	+/-	-

++: Excelente; +: bom; +/-: às vezes, eficaz; -: não revelado

Tabela 3. Métodos para estudar os diferentes caracteres morfológicos dos ciliados

Táxon	Observação in vivo	Solução Lugol	Solução MFS	Protargol	Carbonato de Prata	MEV
Ordem Vestibuliferida						
Família Isotrichidae (e.g., <i>Dasytricha</i> , <i>Isotricha</i>)	++	+/-	++	++	+/-	++/-
Família Paraisotrichidae (e.g., <i>Paraisotricha</i>)	++	+/-	++	++	+/-	++/-
Ordem Entodiniomorphida						
Família Buetschliidae (e.g., <i>Blepharoconus</i> , <i>Buetschilia</i> , <i>Bundleia</i> , <i>Parabundleia</i> ...)	++	+/-	++	*	++	*
Família Blepharocorythidae (e.g., <i>Charonina</i>)	++	+/-	++	+/-	++	++/-
Família Ophryoscolecidae (e.g., <i>Entodinium</i> , <i>Diplodinium</i> , <i>Metadinium</i> , <i>Ophryoscolex</i> ...)	++	++	++	+/-	++	++/-
Família Parentodiniidae (e.g., <i>Parentodinium</i>)	++	+/-	++	+/-	++	++/-

+: recomendada; ++: Muito recomendada; +/-: às vezes, depende da espécie; *: ausência de informações

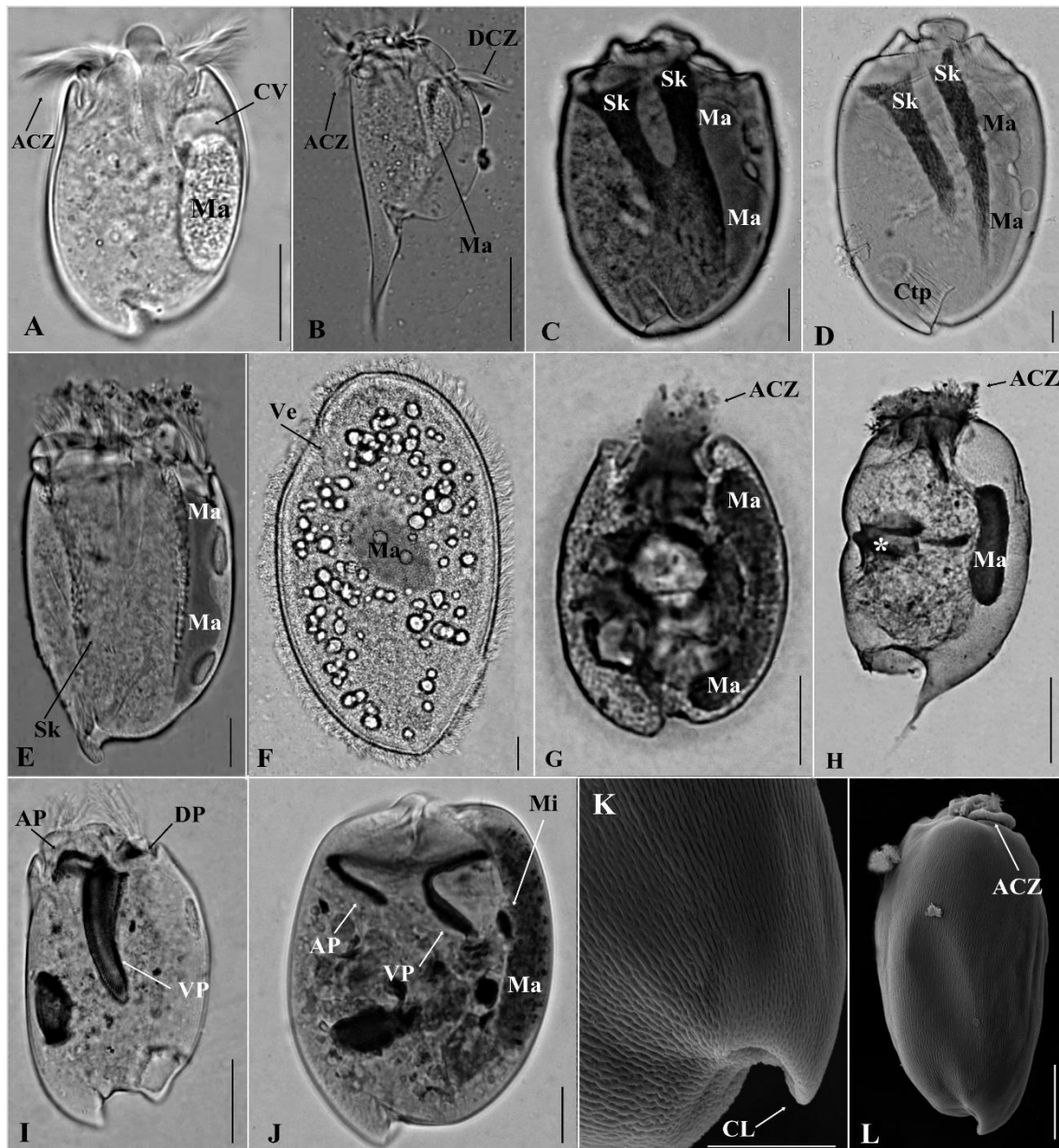


Figura 1. Ciliados do rúmen preparados com os métodos descritos neste estudo. **A, B.** Observação *in vivo*, evidenciando formato do corpo, morfologia do vestíbulo, vacúolos contráteis e aspecto das zonas ciliares; **C, D.** Preparações semipermanentes com solução de Lugol evidenciando as placas esqueléticas; **E, F.** Preparações semipermanentes com solução salina de verde de metila e formalina, evidenciando detalhes do aparato nuclear; **G, H.** Impregnação pelo Protargol; **I, J.** Impregnação pelo carbonato de prata; **K, L.** MEV, evidenciando em detalhe as estriações na película externa e formato de lobo caudal na região posterior do corpo. **A.** *Entodinium ovinum* Dogiel, 1927; **B.** *Eremoplastron rostratum* (Fiorentini, 1889); **C.** *Metadinium esalqum* (Dehority, 1979); **D.** *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa, 1925); **E.** *Ostracodinium dogieli* (Dogiel, 1927); **F.** *Isotricha intestinalis* Stein, 1858; **G.** *Entodinium longinucleatum* Dogiel, 1925; **H.** *Entodinium caudatum lobosospinosum* Stein, 1858; **I.** *Eodinium postero-vesiculatum bilobosum* Kofoid & MacLennan, 1932; **J.** *Entodinium bursa* Stein, 1858; **K, L.** *Eodinium postero-vesiculatum monolobosum* Kofoid & MacLennan, 1932. Abreviações: ACZ: Zona adoral de ciliatura; AP: policinécia adoral; CL: lobo caudal; Ctp: citoprocto; CV: vacúolo contrátil; DCZ: zona dorsal de ciliatura; DP: policinécia dorsal; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; Sk: placa esquelética; Ve: vestíbulo; Asterisco (*): primórdio oral. Barras: 20 µm.

REFERÊNCIAS

BACHY, C., GÓMEZ, F., LÓPEZ-GARCÍA, P., DOLAN J.R., MOREIRA, D. Molecular phylogeny of Tintinnid ciliates (Tintinida, Ciliophora). **Protist**, v. 163 p. 873–887, 2012.

BAROIN-TOURANCHEAU, A., DELGADO, P., PERASSO, R., ADOUTTE, A. A broad molecular phylogeny: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 9764–9768, 1992.

BAROIN-TOURANCHEAU, A.; TSAO, N.; KLOBUTCHER, L.A.; PEARLMAN, R.E.; ADOUTTE, A. Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3262–3267, 1995.

Baroin-Tourancheau, A.; Villalobo, E.; Tsao, N.; Torres, A.; Pearlman, R.E. Protein coding gene trees in ciliates: Comparison with rRNA-based Phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, p. 299–309, 1998.

BELANCHE, A.; BALCELLS, J.; DE LA FUENTE, G.; YAÑEZ-RUÍZ, D.R.; FONDEVILA, M.; CALLEJA, L. Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 648–658, 2010.

BODIAN, D. The new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. **The Anatomical Record**, v. 69, p. 153–162, 1936.

BODIAN, D. The staining of paraffin sections of nervous tissues with activated protargol. The role of fixatives. **The Anatomical Record**, v. 70, p. 153–162, 1937.

CAMERON, S.L.; ADLARD, R.D.; O'DONOGUE, P.J. Evidence for an independent radiation of endosymbiotic litostome ciliates within Australian marsupial herbivores. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 20 p. 302–310, 2001.

CAMERON, S.L.; WRIGHT, A.-D.G.; O'DONOGUE, P.J. An expanded phylogeny of the Entodiniomorphida (Ciliophora: Litostomatea). **Acta Protozoologica**, v. 42, p. 1–6, 2003.

CHEN, Z.; SONG, W. Phylogenetic positions of *Aspidisca steini* and *Euplotes vannus* within the order Euplotida (Hypotrichia: Ciliophora) inferred from complete small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Acta Protozoologica**, v. 41, p. 1–9, 2002.

Clarke, R.T.J. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). **New Zealand Journal of Agriculture Research**, v. 7, p. 248–257, 1964.

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.; 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.

DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; ABECIA, L.; DEHORITY, B.A.; FONDEVILA, M. Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). **European Journal of Protistology**, v. 45, p. 112–120, 2009.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibus moschattus*) and dall mountain sheep (*Ovis dalli*). **Journal of Protozoology**, v. 21, p. 26–32, 1974.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 182–185, 1984.

DEHORITY, B.A. **Rumen Microbiology**. 2nd ed, Nottingham University Press, Nottingham, 2003.

DIECKMANN, J. An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results. *European Journal of Protistology*, v. 31, p. 372–382, 1995.

DOGIEL, V.A. Monographie der familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, v. 59, p. 1–288, 1927.

DRAGESCO, J. L'orientation actuelle de la systématique des ciliés et la technique d'imprégnation au protéinate d'argent. **Bulletin of Microbiology Applied**, v. 11, p. 49–58, 1962.

DRAGESCO, J. & DRAGESCO-KERNEIS, A. Ciliés libres de l'Afrique intertropicale. **Faune Tropicale**, v. 26, p. 1–559, 1986.

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**, v. 262, p. 97–93, 1995.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with pyritinated 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. An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 271–292, 2014.

GRUBY, D.; DELAFOND, O. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestins, pendant la digestion des animaux herbivores e carnivores. **Compte rendus hebdomadaires des séances de l'Academie des sciences**, v. 17, p. 1304–1308, 1843.

HOBSON P.N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed, Balckie Academic & Professional, London, 1997.

HUANG, J.; DUNTHORN, M.; SONG, W. Expanding character sampling for the molecular phylogeny of euplotid ciliates (Protozoa, Ciliophora) using three markers, with a focus on the family Uronychiidae. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 63, p. 598–605, 2012.

IMAI, S.; OGIMOTO, K. Scanning electron and fluorescent microscopic studies on the attachment of spherical bacteria to ciliate protozoa in the ovine rumen. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, p. 9–19, 1978.

IMAI, S.; TASHIRO, H. A resin-pulverizing procedure for scanning electron microscopy of rumen ciliates (Protozoa: Ciliophora). **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 101, p. 299–302, 1982.

IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. **Journal of Protozoology**, v. 35, p. 130–136, 1988.

IMAI, S.; TSMITSUMI, Y.; YUMURA, S.; MULENGA, A. Ciliate protozoa in the rumen of Kafue Lechwe, *Kobus leche kafuensis*, in Zambia, with the description of four new species. **Journal of Protozoology**, v. 39, p. 564–572, 1992.

ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in the rumen ophryoscolecid ciliate *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 628–636, 1998.

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 ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 103–110, 2006.

ISHAQ, S.L.; WRIGHT, A.-D.G. Design and validation of four new primers for next-generation sequencing to target the 18S rRNA gene for gastrointestinal ciliate protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 5515–5521, 2014.

KANARTI, 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.

KITTELMAN, 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.

KITTELMAN, S.; SEEDORF, H.; WALTERS, W.A.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **Plos One**, v. 8, p. 1–11, 2013.

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.

KOFOID C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen. nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, v. 39, p. 1–34, 1933.

Li, L.; Song, W. Phylogenetic position of the marine ciliate, *Certesia quadrinucleata* (Ciliophora; Hypotrichia; Hypotrichida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, v. 42, p. 55–61, 2006.

LI, L.; SONG, W.; WARREN, A.; WANG, Y.; MA, H.; HU, Y. Phylogenetic position of the marine ciliate, *Cardiostomatella vermiforme* (Kahl, 1928) Corliss, 1960 inferred from the complete SSrRNA gene sequence, with establishment of a new order Loxocephalida n. ord. (Ciliophora, Olygohymenophorea). **European Journal of Protistology**, v. 42, p. 107–114, 2006.

LYNN, D.H. **The ciliated protozoa**. 3rd ed, Springer, New York, 2008.

MCEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M.; ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; NEWBOLD, C.J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 97–71, 2005.

MODEO, L.; ROSATI, G.; ANDREOLI, I.; GABRIELLI, S.; VERNI, F.; PETRONI, G. Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). **Proceedings of Japan Academy**, v. 82, p. 359–374, 2006.

MODEO, L.; PETRONI, G.; LOBBAN, C.S.; VERNI, F.; VANNINI, C. Morphological, ultrastructural and molecular characterization of *Euplotes rosati* n.sp. (Ciliophora, Euplotida) from Guam. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, p. 25–36, 2013.

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-TIMOTHEE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. **Annales de Sciences Naturelles Zoologique**, 12, v. 526–718, 1960.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**. 1nd ed, Japan Scientific Societies Press, Tokio, 1981.

PAN, X.; BOURLAND, W.A.; SONG, W. Protargol synthesis: An in house protocol. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, p. 609–614, 2013.

REGENSBOGENOVA, M.; KISIDAYOVA, S.; MICHALOWISKI, T.; JAVORSKY, P.; MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; MOON-VAN DER STAAY, G.W.M. Rapid identification of rumen protozoa by Restriction Analysis of Amplified 18S rDNA gene. **Acta Protozoologica**, v. 43, p. 219–224, 2004a

REGENSBOGENOVA, M.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P.; MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; MOON-VAN DER STAAY, G.W.M.; HACKSTEIN, J.H.P. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 144–147, 2004b.

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 Zoologique**, v. 15, p. 49–62, 1992.

SILVA-NETO, I.D. Improvement of silver impregnation technique (protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalينات. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, p. 451–459, 2000.

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.

SHARP, R. *Diplodinium ecaudatum* with an account of neuromotor apparatus. **University of California Publications in Zoology**, v. 13, p. 43–122, 1914.

SKILLMAN, L.C.; TOOVEY, A.F.; WILLIAMS, A.J.; WRIGHT, A.-D.G. Development and validation of real time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between *Entodinium* populations in sheep offered a hay-based diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 200–206, 2006.

STOECK, T.; PRZYBOS, E.; SCHMIDT, H.J. A combination of genetics with inter- and intra-strain crosses and RAPD-fingerprints reveals different population structures within the *Paramecium aurelia* species complex. **European Journal of Protistology**, v. 34, p. 348–355, 1998.

STRÜDER-KYPKE, M.C.; WRIGHT, A.-D.G.; FOKIN, S.I.; LYNN, D.H. Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47: 419–429, 2006.

SYLVESTER, J.T.; KANARTI, S.K.R.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J.L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3378–3384, 2004.

TUFFRAU, M. Perfectionnements et pratique de la technique d'impregnation au protargol des infusoires ciliés. **Protist**, v. 3, p. 369–399, 1967.

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.

VAN HOVEN, W. Rumen ciliates with description of two new species from the African reedbuck species. **Journal of Protozoology**, v. 30, p. 127–130, 1989.

WILBERT, N. Eine verbesserte technik der protargol-impregnation für ciliaten. **Mikrokosmos**, v. 6, p. 171–179, 1975.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**. Springer, New York, 1992.

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 Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 61–67, 1997.

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, 1997a.

WRIGHT, A.-D.G.; LYNN, D.H. Monophyly of Tricostome 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, 1997b.

WRIGHT, A.-D.G. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 445–446, 1999.

ZHANG, Q. YI, Z.; FAN, X.; WARREN, A.; GONG, J.; SONG, W. Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista, Ciliophora). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 70, p. 162–170, 2006.

SEÇÃO 2

PROTOZOÁRIOS CILIADOS DO RÚMEN DE OVINOS (*Ovis aries* L.) NO BRASIL, COM NOVOS REGISTROS E REDESCRIBÇÃO DE *Entodinium contractum* (ENTODINIMORPHIDA, OPHRYOSCOLECIDAE)

(artigo publicado no periódico Zootaxa)

ABSTRACT: The species composition, prevalence, and average relative abundance of rumen ciliates were analyzed in 16 Brazilian sheep. 28 species of ciliates were identified belonging to 3 families: Isotrichidae, Ophryoscolecidae, and Parentodiniidae. Among these ciliates, *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum*, and *M. rotundatum* were found for the first time in sheep, and other 12 species for the first time in Brazilian sheep. Different morphotypes of parentodiniid ciliates were identified in 7 of the 16 sheep analyzed and this is the second report of this family in ruminants. The species *Entodinium contractum* was redescribed based on the new data on the general morphological features; for the first time, we described the oral infraciliature, which in this species is of the *Entodinium*-type. In this species, it is noteworthy that the prominent vestibular polybrachykinety can be used as an important identifying characteristic.

Key words: Brazilian domestic sheep, ciliated protozoa, *Entodinium contractum*, Neotropical zone

INTRODUÇÃO

Na maioria dos estudos sobre a ciliatofauna ruminal no Brasil estes micro-organismos são identificados em nível de gênero e os trabalhos abordam principalmente os seguintes temas: papel dos ciliados no metabolismo do hospedeiro (MARTINELE et al., 2008; 2010; RÍSPOLI et al., 2009), uso de técnicas ciliatológicas e morfologia (D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1994; CEDROLA et al., 2015), ecologia (MARTINELE et al., 2007) e comportamento (MARTINELE & D'AGOSTO, 2008), sendo escassos levantamentos detalhados da ciliatofauna ruminal no Brasil (CUNHA, 1914; DEHORITY, 1979; 1986; ROSSI, 2013). DEHORITY (1986) destaca que a diversidade de protozoários ciliados no Brasil possui particularidades o que ressalta necessidade de investimento em estudos de levantamento principalmente devido à riqueza de hospedeiros silvestres e domesticados na pouco explorada região Neotropical. Estudos prévios sobre a ciliatofauna ruminal em ovinos domésticos no Brasil identificaram um total de 30 espécies (CUNHA, 1914; MARTINELE & D'AGOSTO, 2008; ROSSI, 2013; CEDROLA et al., 2014), não havendo, até a presente data, estudos em outras áreas da América do Sul. Assim sendo, o presente trabalho visa inventariar e determinar a prevalência e abundância relativa de espécies de ciliados presentes no rúmen de ovinos no Brasil e redescrever a espécie *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 ovinos (*Ovis aries* L.) mantidos em baias individuais no Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil. Os animais foram distribuídos em quatro blocos casualizados de forma que cada bloco recebeu 20, 40, 60 ou 80% de concentrado na dieta, sendo este concentrado composto por milho, farelo de soja e óleo vegetal. A dieta basal foi constituída por feno de Tifton (*Cynodon dactylon*). Antes do abate os animais foram desprovidos de alimentação por 12 horas; durante este tempo receberam água *ad libitum*. As amostras foram obtidas manualmente do centro da massa ruminal, consistindo de 20 cm³ de conteúdo ruminal fixado em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984).

A identificação das espécies foi baseada em descrições propostas por DOGIEL (1927), KOFOID & MACLENNAN (1930, 1932), KOFOID & CHRISTENSON (1933), DEHORITY (1979), OGIMOTO & IMAI (1981) e WILLIAMS & COLEMAN

(1992). Para a identificação foi realizada morfometria de 20 espécimes de cada espécie corados pela solução de Lugol e impregnados pela prata (para detalhes ver CEDROLA et al., 2015) usando o software Image-Pro Plus 6.0. A orientação dos ciliados para descrição seguiu DOGIEL (1927); o lado próximo ao macronúcleo é chamado de lado dorsal, o oposto a este é o lado ventral, definindo os lados direito e esquerdo. As bandas de infraciliatura foram impregnadas pela técnica do carbonato de prata (ITO & IMAI, 2006). O termo policinécia se refere a bandas infraciliares compostas por numerosas, pequenas e paralelas cinécias (FERNANDEZ-GALIANO, 1979).

Os desenhos de *Entodinium contractum in vivo* foram realizados a mão livre durante observação dos espécimes sob microscópio Olympus BX51 equipado com contraste interferencial diferencial. Os desenhos dos espécimes impregnados pela prata foram elaborados em câmara clara. Todos os desenhos foram orientados com a região anterior para o topo da página. Lâminas permanentes foram depositadas na coleção do Laboratório de Protozoologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (Brasil).

A prevalência de cada espécie foi determinada segundo BUSH et al. (1997) e a abundância relativa foi estimada de uma amostra de 300 células de cada animal (ITO et al., 1994; MISHIMA et al., 2009). O índice de riqueza de Margalef foi calculado utilizando o programa PAST versão 3.0 (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS

Um total de três famílias, nove gêneros e 28 espécies foram identificados (Tabela 1). A composição e riqueza de espécies variaram entre os quatro tratamentos experimentais (Tabela 1). Os animais que receberam o tratamento contendo 20% de concentrado na dieta apresentaram maior índice de riqueza de Margalef (4,47) quando comparados aos animais submetidos aos tratamentos de 40% (2,19), 60% (2,19) e 80% (2,17).

A família Ophryoscolecidae Stein dominou a abundância relativa nos tratamentos contendo 20, 40 e 80% de concentrado, enquanto a família Parentodiniidae Ito *et al.* foi a mais abundante no tratamento com 60% de concentrado. Dentre as três famílias registradas neste estudo, Isotrichidae Bütschli foi aquela com menor abundância relativa nos tratamentos contendo 20, 40 e 60% de concentrado (Tabela 1; Figura 1). Dentre os ciliados ofrioscolicídeos, as espécies pertencentes à subfamília Diplodiniinae Lubinsky foram observadas em maior número no tratamento contendo 20% de concentrado, tendo reduzido em número no tratamento contendo 40%, não sendo registrada nos tratamentos contendo 60 e 80%. As espécies pertencentes à

subfamília Entodiniinae Lubinsky foram observadas em grande número em todos os tratamentos experimentais (Tabela 1; Figura 2).

A maior parte dos ciliados presentes na maioria dos animais são pertencentes ao gênero *Entodinium* Stein, que constituiu mais de 90% da abundância total de protozoários. As espécies *Entodinium simplex* Dogiel e *Entodinium exiguum* Dogiel apresentaram maior prevalência (87.50%) e *Entodinium rectangulatum lobosospinosum* foi a espécie com maior abundância relativa (25.33%).

Dentre as espécies inventariadas *Entodinium alces* Dehority, *Metadinium esalqum* (Dehority) e *M. rotundatum* Kofoid & Christenson foram registradas pela primeira vez em ovinos; e *Entodinium biconcavum* Kofoid & MacLennan, *E. dubardi dubardi* Buisson, *E. exiguum* Dogiel, *E. ovinum* Dogiel, *E. rectangulatum lobosospinosum* Lubinsky, *Diplodinium monacanthum* (Dogiel), *D. diacanthum* (Dogiel), *D. triacanthum* (Dogiel), *D. tetracanthum* (Dogiel), *D. pentacanthum* (Dogiel), *Eremoplastron rostratum* (Fiorentini) e *Eudiplodinium maggii* (Fiorentini) foram observadas pela primeira vez em ovinos no Brasil.

Diferentes morfotipos de ciliados paterontodinídeos foram observados em sete dos 15 ovinos analisados, sendo este o segundo registro de ciliados desta família em mamíferos ruminantes, anteriormente reportados em hipopótamos (THURSTON & NOIROT-TIMOTHÉE, 1973; ITO et al., 2002) e em bovinos (DEHORITY, 1986).

Entodinium contractum, originalmente descrita no conteúdo ruminal do gauro (*Bos gaurus* Smith) (KOFOID & CHRISTENSON, 1933) e não subsequentemente observada, foi redescoberta neste estudo. A espécie foi redescrita em detalhe (Figura 3; Tabela 2) utilizando informações obtidas de espécimes corados pela solução de Lugol e impregnados pelo carbonato de prata.

O corpo de *E. contractum* apresenta formato piriforme (Figura 3B), lateralmente comprimido e levemente arredondado na região posterior (comprimento do corpo: $52,09 \pm 3,14$; largura do corpo: $32,64 \pm 2,76$). Não foram observados processos caudais. A película externa possui pequenas estriações longitudinais (Figura 3A e 3C). Uma única zona ciliar retrátil, a zona adoral de ciliatura, está localizada na região anterior do corpo, circundando a abertura vestibular (Figura 3B). O vestíbulo é longo e proeminente (ocupando aproximadamente 1/3 do comprimento corporal) e curva-se dorsalmente em direção ao macronúcleo (Figura 3B e 3C). O ectoplasma é evidente, e contém o aparato nuclear e o vacúolo contrátil (Figura 3A e 3C). O macronúcleo, em formato de bastão, é mais largo na região anterior que na posterior, sendo longo e levemente recurvado (comprimento macronuclear: $47,46 \pm 7,35$). O micronúcleo é oval e se localiza

ventralmente ao macronúcleo (Figura 3C). Um pequeno vacúolo contrátil está localizado na superfície direita do macronúcleo. O endoplasma é evidente e contém, frequentemente, número considerável de vacúolos digestivos. O reto é uma estrutura tubular delgada, localizada na região posterior do corpo, que se abre por meio de um pequeno poro, o citoprocto (Figura 3A e 3B).

A infraciliatura oral em *Entodinium contractum* é composta por uma policinécia adoral (PA), uma policinécia vestibular (PV) e por cinécias parolabiais (CP). A PA, em formato de C, envolve a abertura vestibular. A PV possui a mesma largura da PA e se estende para o interior do vestíbulo a partir da extremidade dorsal da PA. As CP são compostas por quatro ou mais cinécias transversas que se estendem ao longo do lado ventral da PA (Figura 3C).

Tabela 1. Prevalência e abundância relativa \pm DP de protozoários ciliados registrados em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil (n=16)

Ordem / Família / Espécie	Prevalência	Abundância relativa média			
		Níveis de concentrado			
		20%	40%	60%	80%
Ordem Vestibuliferida					
Família Isotrichidae					
<i>Dasytricha ruminantium</i>	37.5	5.8 \pm 4.4	1.6 \pm 1.8	0	0
<i>Isotricha intestinalis</i>	18.7	0	0	12.5 \pm 0.9	0
<i>Isotricha prostoma</i>	6.2	2.4 \pm 2.3	0	1.6 \pm 2.8	0
Ordem Entodiniomorphida					
Família Ophryoscolecidae					
<i>Entodinium alces</i> *	31.2	0	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.8	3.42 \pm 1.8
<i>Entodinium biconcavum</i> **	6.2	0	0	0	11.14 \pm 0.9
<i>Entodinium caudatum</i>	18.7	4.8 \pm 3.7	0	0	0
<i>Entodinium contractum</i> *	25	2.4 \pm 2	0	0	0
<i>Entodinium dubardi dubardi</i> **	37.5	0	12.3 \pm 0.5	3.3 \pm 5.7	13.2 \pm 5.6
<i>Entodinium exiguum</i> **	87.5	20 \pm 8.6	17 \pm 14.7	16.4 \pm 14.2	10.2 \pm 14.6
<i>Entodinium longinucleatum longinucleatum</i>	62.5	0	1 \pm 1	17 \pm 12.9	8 \pm 11.2
<i>Entodinium ovinum</i> **	6.2	0	0	0	14.9 \pm 1
<i>Entodinium nanellum</i>	87.5	16 \pm 6	7.4 \pm 0.9	9.1 \pm 9.9	16.9 \pm 10.9
<i>Entodinium parvum parvum</i>	81.2	7.5 \pm 5.7	7.3 \pm 10.7	5.2 \pm 6.1	13.3 \pm 5.3
<i>Entodinium rectangulatum lobosospinosum</i> **	62.5	9.8 \pm 5	58.8 \pm 18.9	1 \pm 1.7	6.2 \pm 11.8
<i>Entodinium simplex</i>	87.5	13 \pm 11.9	2.6 \pm 3.7	13.6 \pm 11.8	0
<i>Diplodinium monacanthum</i> **	18.7	1.6 \pm 1.3	0	0	0
<i>Diplodinium diacanthum</i> **	25	2 \pm 1.6	0	0	0
<i>Diplodinium triacanthum</i> **	25	1.4 \pm 1.4	0	0	0
<i>Diplodinium tetracanthum</i> **	25	2.4 \pm 3.2	0	0	0
<i>Diplodinium pentacanthum</i> **	18	2 \pm 1.5	0	0	0
<i>Diplodinium anisacanthum</i> **	18	1.4 \pm 1.4	0	0	0
<i>Diplodinium flabellum</i>	18	0.6 \pm 0.7	0	0	0
<i>Eudiplodinium maggii</i> **	12	0.6 \pm 1.2	1.6 \pm 2.8	0	0
<i>Eremoplastron rostratum</i> **	6	0.6 \pm 0.3	0	0	0
<i>Elytroplastron bubali</i>	12	0.8 \pm 1.6	0	0	0
<i>Metadinium esalqum</i> *	18	1.3 \pm 0.9	0	0	0
<i>Metadinium rotundatum</i> *	6	0.1 \pm 0.3	0	0	0
Família Parentodiinidae					
<i>Parentodinium spp.</i> *	43	0	1.8 \pm 3.2	31.2 \pm 38.3	5.92 \pm 7.6
Total de espécies		21	12	11	10

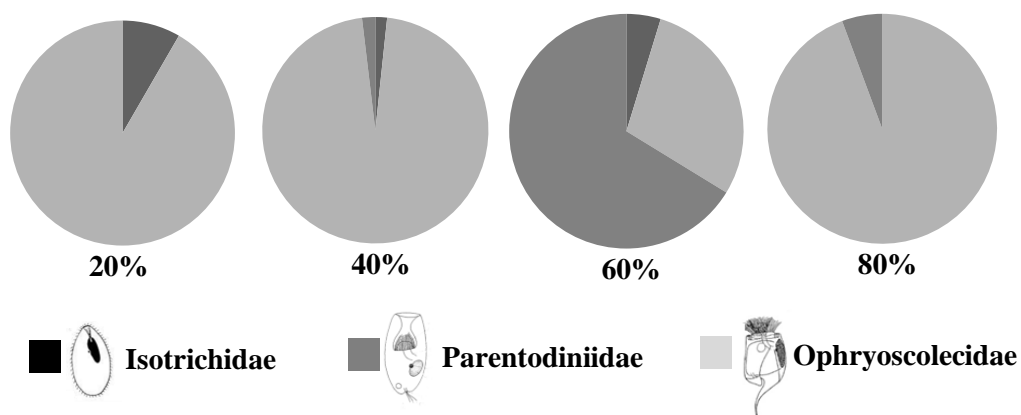


Figura 1. Abundância relativa média das três famílias (Isotrichidae, Ophryoscolecidae e Parentodiniidae) de ciliados do rúmen em ovinos (*Ovis aries*) alimentados com níveis crescentes de concentrado energético (20%, 40%, 60% e 80%).

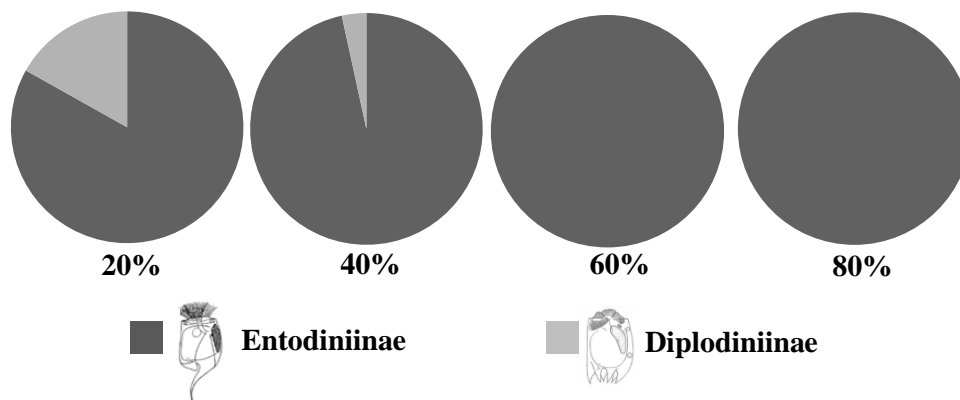


Figura 2. Abundância relativa média das duas subfamílias de ciliados ofrisocolecídeos em ovinos alimentados com níveis crescentes de concentrado energético (20%, 40%, 60% e 80%).

Tabela 2. Caracterização morfométrica de *Entodinium contractum* registrados em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil

Caracteres	Média	DP	Mín	Máx	CV (%)	N
Comprimento corpo*	52,09	3,14	44,47	58,21	6	20
Largura corpo	32,64	2,76	26,71	38,50	8	20
Comprimento corpo /Largura corpo	1,60	00,14	1,37	1,92	9	20
Comprimento macronuclear	47,46	7,35	42,20	50,32	15	20
Largura macronuclear	5,47	0,66	4,32	6,72	12	20
Comprimento macronuclear / Comprimento corpo	0,91	00,14	00,40	1,05	15	20
Comprimento macronuclear / Largura macronuclear	8,83	1,80	3,26	11,65	20	20

*Baseado em espécimes corados pela solução de Lugol. Todas as medidas em micrômetros.

CV: coeficiente de variação (%); Média: média aritmética; DP: desvio padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo; n: tamanho da amostra

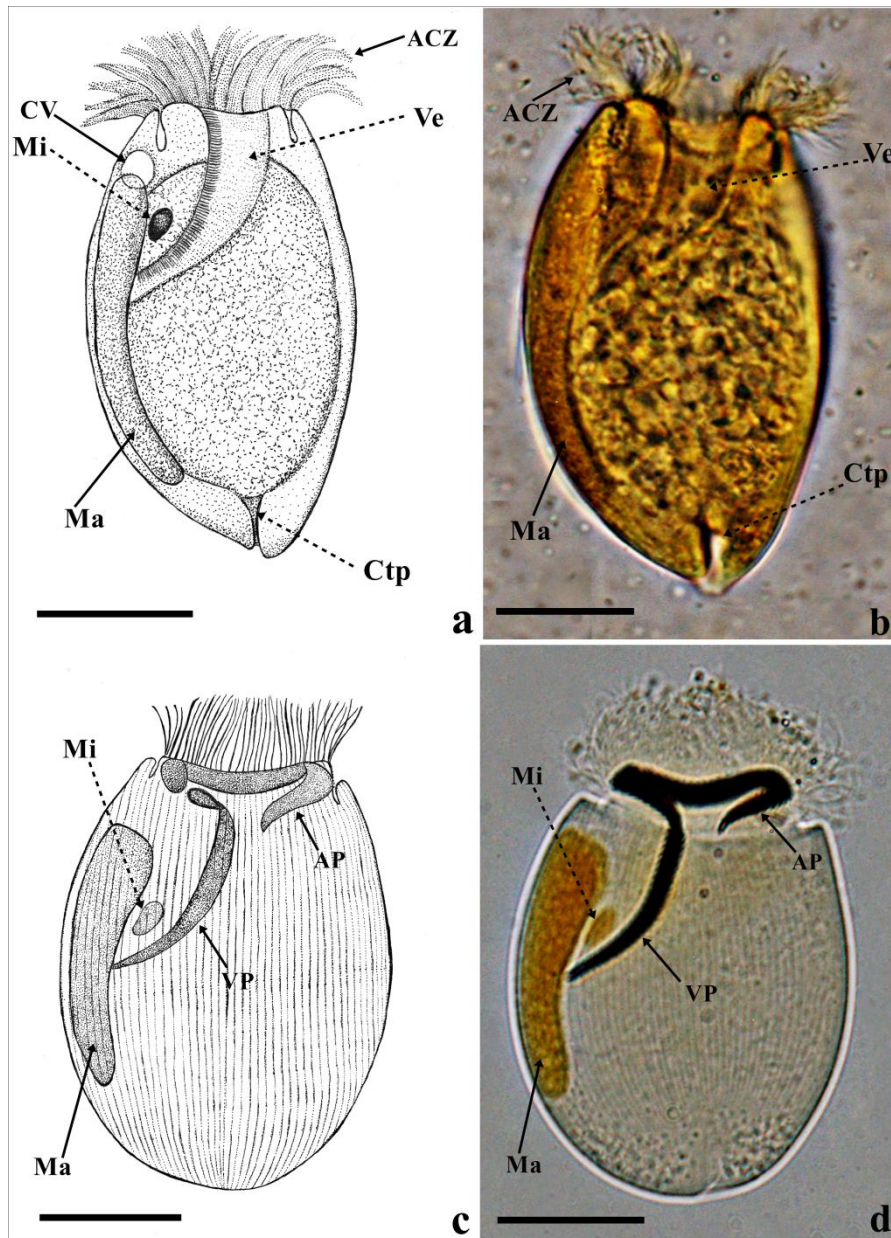


Figura 3. *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson registrado em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil. **A.** Desenho esquemático baseado em observação *in vivo*; **B.** Espécime de *Entodinium contractum* corado pela solução de Lugol; **C.** Desenho esquemático baseado em espécime impregnado pela prata; **D.** Espécime de *Entodinium contractum* impregnado pela prata. ADZ: zona adoral de ciliatura; AP: policinécia adoral; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; Ve: vestíbulo; VP: policinécia vestibular. Barras: 20 μm .

DISCUSSÃO

A composição e riqueza de protozoários ciliados do rúmen são influenciadas por diversos fatores, sendo os mais importantes a dieta (MISHIMA et al., 2009; BOOYSE et al., 2014) e o pH ruminal (FRANZOLIN & DEHORITY, 2010). Dietas contendo alto teor de concentrado energético são rapidamente fermentáveis e os ácidos graxos voláteis, produtos da fermentação, ao serem liberados rapidamente no ambiente ruminal promovem redução no pH (FRANZOLIN & DEHORITY, 2010). Reduções no pH ruminal tem efeito deletério sobre muitas espécies de ciliados ruminais (FRANZOLIN & DEHORITY, 2010), sendo as espécies mais sensíveis as pertencentes à subfamília Diplodiniinae, que comumente não são encontradas em animais alimentados com dietas ricas em concentrado energético. Neste estudo, espécies de ciliados Diplodiniinae foram observadas apenas nos tratamentos contendo 20% e 40% de concentrado (Tabela 1; Figura 2), havendo diminuição da abundância relativa no tratamento com 40% de concentrado. Nos tratamentos com 40, 60 e 80% de concentrado foram registrados praticamente ciliados da subfamília Entodiniinae (Figura 2), corroborando dados da literatura que sugerem hábito alimentar amilolítico, menor sensibilidade a variações de pH e ocorrência em hospedeiros com dietas ricas em concentrado (Williams & Coleman 1992; Dehority 2003).

Estudos com ovinos domésticos e selvagens relatam a ocorrência de 133 espécies de ciliados ruminais nestes hospedeiros (CUNHA, 1914; MARTINELE & D'AGOSTO, 2008; BOOYSE & DEHORITY, 2011; ROSSI, 2013; CEDROLA et al., 2014). Neste estudo, foram realizados três novos registros de ciliados ruminais para ovinos, dentre os quais, *Metadinium esalqum* aparenta ser espécie endêmica do Brasil. A espécie foi descrita por DEHORITY (1979) em búfalos domésticos (*Bubalus bubalis* L.) da região sudeste do Brasil e, posteriormente, registrada pelo mesmo autor em bovinos domésticos também da região sudeste do Brasil (DEHORITY, 1986). Visto que existem casos de transfaunação entre ruminantes relatados na literatura (DEHORITY, 1978; IMAI et al., 1978; IMAI et al., 2002), estudos de levantamento de espécies de ciliados de ruminantes selvagens poderiam confirmar endemismo de *M. esalqum*. *Metadinium rotundatum* descrita no conteúdo ruminal do gauro na Índia (KOFOID & CHRISTENSON, 1933) foi, posteriormente, registrada em bovinos na mesma localidade (BANERJEE, 1955). *Entodinium alces* foi descrito por DEHORITY (1974) como endossimbionte do alce (*Alces americana*) no Alasca tendo sido reportado recentemente em bovino doméstico no Brasil por ROSSI (2013).

O gênero *Parentodinium* foi proposto por THURSTON & NOIROT-TIMOTHÉE (1973) para incluir espécies de ciliados com um cone ciliar retrátil na região anterior do corpo, vestíbulo tubular, macronúcleo sem posição definida e um único vacúolo contrátil localizado na região ventral posterior. Os autores consideraram o novo gênero como sendo pertencente à família Cycloposthiidae Poche. O gênero foi revisado por ITO et al. (2002) com base na morfologia geral e infraciliatura, sendo proposta a nova família Parentodiniidae, visto importantes diferenças morfológicas entre estes ciliados e aqueles da família Cycloposthiidae e demais famílias da ordem Entodiniomorpha. Os morfotipos de ciliados parentodinídeos observados neste estudo apresentam caracteres morfológicos diagnósticos do gênero, entretanto, diferem em alguns aspectos, das espécies descritas para esta família (THURSTON & NOIROT-TIMOTHÉE 1973; ITO et al., 2002), sendo necessários estudos detalhados da morfologia destes ciliados visando descrições mais consistentes. Foi relatada ainda elevada abundância relativa de ciliados parentodinídeos no tratamento contendo 60% de concentrado (31.22%), com destaque para um dos animais deste tratamento que apresentou abundância relativa de 74%, estes dados são inéditos, visto que em estudo prévio, ciliados parentodinídeos possuem abundância relativa menor que ciliados do gênero *Entodinium* em ruminantes domésticos (DEHORITY, 1986).

Os novos registros de espécies de ciliados ruminais em ovinos no Brasil podem ser devido ao maior número de hospedeiros analisados (n=16) neste estudo quando comparado com estudos prévios (CUNHA, 1914; DEHORITY, 1979; 1986; ROSSI 2013) e à área de estudo inédita, Nordeste do Brasil. Os hospedeiros provenientes deste bioma pouco explorado em relação à diversidade de ciliados ruminais no país precisa ser melhor investigado visto dados registrados neste trabalho.

Entodinium contractum foi descrito por KOFOID & CHRISTENSON (1933) no conteúdo ruminal do gauro (*Bos gaurus* Smith), bovino selvagem encontrado na Índia, não tendo sido reportado novamente até o presente estudo. Apresenta o corpo em formato piriforme e o vestíbulo longo e proeminente, sendo estes, os principais caracteres taxonômicos diagnósticos da espécie. A população de *E. contractum* encontrada no Brasil difere da descrita na Índia pelo comprimento (44,47-58,21 μm vs 39-46 μm) e largura corporais (26,71-38,50 vs 27-34 μm) e comprimento do macronúcleo (42,20-50,32 vs 27-36 μm). Estudos prévios ressaltam que registro de espécies de ciliados ruminais em hospedeiros diferentes podem apresentar diferenças na morfometria mesmo apresentando morfologia geral idêntica (KOFOID & MACLENNAN 1932, 1933; ROSSI, 2013).

A infraciliatura oral tem sido investigada em detalhe em protozoários ciliados ruminais (ITO & IMAI, 2006; MISHIMA et al., 2009; ROSSI, 2013; CEDROLA et al., 2014) visando ampliar os caracteres utilizados para diferenciar estes micro-organismos, visto que a organização da ciliatura oral pode ser utilizada como caractere diagnóstico de muitas espécies. A infraciliatura oral de *E. contractum* foi descrita e incluída no padrão-*Entodinium* (ITO & IMAI, 2006), visto que este ciliado apresenta o mesmo padrão de bandas infraciliares de outras espécies de *Entodinium* também classificadas neste padrão (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FERNANDEZ-GALIANO et al., 1985; ITO et al., 2002; ITO & IMAI, 2003; MISHIMA et al., 2009; ROSSI, 2013). Destaca-se em *E. contractum* a proeminente policinécia vestibular (PV), um caractere diagnóstico da espécie.

Este trabalho é o primeiro inventário de espécies de ciliados ruminais de ovinos no Brasil envolvendo número significativo de hospedeiros amostrados (n=16) e utilizando técnicas ciliatólogicas adequadas. Neste estudo foram registrados pela primeira vez em ovinos *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum* e *M. rotundatum*, havendo até o momento 136 espécies de ciliados (Booyse & Dehority 2011) registradas em ovinos domésticos e selvagens ao redor do mundo.

REFERÊNCIAS

BANERJEE, A. K. Studies on parasitic ciliates from Indian ruminants. **Proceeding of the Zoological Society**, v. 8, p. 87–101, 1955.

BOOYSE, D.G. & DEHORITY, B.A. Rumen protozoa in South African sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 78, p. 1–7, 2011

BOOYSE, D.G., DEHORITY, B.A. & REINIGHAUS, B. Rumen ciliates in the African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*) living in the vicinity of the Orpen Gate entrance into Kruger National Park, South Africa. **Zootaxa**, v. 1, p. 138–144, 2014.

BUSH, A.O., LAFFERT, K.D., LOTZ, J.M. & SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575–583, 1997.

CEDROLA, F., MARTINELE, I., ROSSI, M. MEDEIROS, G.R., SANTOS, G.R.A., CARVALHO, F.F.R. & D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados do rúmen de ovinos do nordeste brasileiro e infraciliatura de *Enoploplastron triloricatum* (Dogiel, 1925). **Principia**, v. 17, p. 71–79, 2014.

CEDROLA, F., ROSSI, M., DIAS, R.J.P., MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. **Zoological Science**, v. 32, n. 1, 8–15, 2015.

CUNHA, A.M. Sobre os ciliados do estômago dos ruminantes domésticos no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 7, 139–145, 1914.

D'AGOSTO, M. & CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 85, p. 725–729, 1999.

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**, v. 11, p. 215–225, 1994.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan Moose (*Alces americana*), Musk-ox (*Ovis moschatus*) and Dall Mountain Sheep (*Ovis dalli*). **Journal of Protozoology**, v. 21, p. 509–513, 1974.

DEHORITY, B.A. Specificity of rumen ciliate protozoa in cattle and sheep. **Journal of Protozoology**, v. 25, p. 509–513, 1978.

DEHORITY, B.A. Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. **Journal of Protozoology**, v. 26, p. 536–544, 1979.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures 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 cyclopothid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 416–421, 1986.

DEHORITY, B.A. **Rumen Microbiology**, Nottingham University Press, Nottingham, 2003.

DOGIEL, V.A. Monographie der Familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, v. 59, p. 1–288, 1927.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorpha. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 98, p. 447–454, 1979.

FERNANDEZ-GALIANO, T., SERRANO, S. & FERNANDEZ-GALIANO, D. General morphology and stomatogenesis of two species of the genus *Entodinium* (Ciliophora, Entodiniomorpha). **Acta Protozoologica**, v. 24, p. 181–186, 1965.

FRANZOLIN, R. & DEHORITY, B.A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2262–2267, 2010.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1–9, 2001.

IMAI, S., KATSUNO, M., OGIMOTO, K. Distribution of rumen ciliate protozoa in cattle, sheep and goat and experimental transfaunation of them. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v. 49, p. 494–505, 1978.

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. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 103–110, 2006.

ITO, A., IMAI, S., OGIMOTO, K. Rumen ciliate composition and diversity of Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesian cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 56, p. 707–714, 1994.

ITO, A., MIYAZAKI, Y. & IMAI, S. Description of new *Parentodinium* ciliates in the Family Parentodiniidae n. fam. from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodiniomorphs in horse and cattle. **European Journal of Protistology**, v. 37, p. 405–426, 2002.

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*. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, v. 37, p. 53–152, 1932.

MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (Ciliophora: Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 451–455, 2008.

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 Zootecnia**, v. 9, p. 63–66, 2007.

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 área. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 169–175, 2010.

MARTINELE, I., SIQUEIRA-CASTRO, I.C.V. & D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção e Animal**, v. 9, p. 74–81, 2008.

MEDEIROS, G.R., CARVALHO, F.F.R., BATISTA, A.M.V., DUTRA JÚNIOR, W.M., SANTOS, G.R.A., ANDRADE, K.B. Efeito dos níveis crescentes de concentrado sobre as características de carcaça de ovinos Morada Nova em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 718–727, 2009.

MISHIMA, T., KATAMOTO, H., HORI, 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**, p. 45, v. 77–86, 2009.

NOIROT-TIMOTHÉE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structure et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v. 12, p. 526–718, 1960.

OGIMOTO, K. & IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**, Japan Scientific Societies Press, Japan, 1981.

RÍSPOLI, T.B., LOPES, I.R., NETO, R.G.M., KAZAMA, R., PRADO, O.P.P., ZEOULA, L.M. & ARCURI, P.B. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 44, v. 92–97, 2009.

ROSSI, M. **Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de protistas ciliados (Ciliophora, Litostomatea) encontrados em ruminantes domésticos**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

THURSTON, J.P. & NOIROT-TIMOTHÉE, C. Entodiniomorph ciliates from the stomach of *Hippopotamus amphibius*, with descriptions of two new genera and three new species. **Journal of Protozoology**, v. 20, p. 562–565, 1973.

WILLIAMS, A.G. & COLEMAN, G.S. **The Rumen Protozoa**. Springer, New York, 1992.

SEÇÃO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Diplodinium anisacanthum* DA CUNHA (ENTODINIOMORPHIDA, OPHRYOSCOLECIDAE) E NOTAS TAXONÔMICAS SOBRE O GÊNERO *Diplodinium* SCHUBERG

(artigo aceito para publicação no periódico Zootaxa)

ABSTRACT: The genus *Diplodinium* includes 31 species of ophryoscolecid ciliates with two retractable ciliary zones in the anterior end of the body, with no skeletal plates, inclined macronucleus and two contractile vacuoles. They have a broad geographical distribution and low host specificity. The genus has several taxonomic inconsistencies, mainly due to polymorphism of most species. *Diplodinium anisacanthum* is a case of taxonomic inconsistency in the genus. It presents polymorphism in posterior end of the body, so it is considered a polymorphic species or seven distinct species. This study presents the morphological characterization of six *D. anisacanthum* morphotypes based on general morphology, morphometric analysis and oral infraciliature characterization and taxonomic notes on the genus *Diplodinium*. The morphological and morphometric characterization of *D. anisacanthum* showed great similarities among morphotypes suggesting that these ciliates constitute a single species with polymorphisms. A brief review conducted highlights the inconsistencies in the taxonomy of the genus *Diplodinium* and demonstrates the need for recent studies with representatives of the genus. There is no information whether the polymorphism among *Diplodinium anisacanthum* morphotypes is supported by molecular analysis, being necessary to carry out studies using different molecular markers with *Diplodinium* representatives to better understand polymorphism in *Diplodinium* and other representatives of family Ophryoscolecidae.

Key-words: ophryoscolecid ciliates, polymorphism, rumen, *Diplodinium*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Diplodinium* Schuberg foi estabelecido para incluir espécies de ciliados ofrioscolecídeos com duas zonas ciliares retráteis na região anterior, ausência de placas esqueléticas, macronúcleo em formato de bastão com o terço anterior alargado e inclinado em ângulo de 30° - 90° e dois vacúolos contráteis (KOFOID & MACLENNAN, 1932). A maior parte das espécies pertencentes a este gênero apresenta ampla distribuição geográfica tendo sido registradas em elevada densidade em diversas espécies de hospedeiros ruminantes domésticos e selvagens (WILLIAMS & COLEMAN, 1992). O gênero apresenta diversas incongruências em sua taxonomia, pois os caracteres utilizados na diagnose das espécies não são claros. Isto ressalta a necessidade de estudos taxonômicos com o grupo, visto que revisões taxonômicas recentes com representantes da família Ophryoscolecidae são inexistentes.

O polimorfismo em Ophryoscolecidae foi descrito em algumas espécies (POLJANSKY & STRELKOW, 1938; LATTEUR, 1966; WILLIAMS & COLEMAN, 1992; IMAI et al., 2002; MARTINELE & D'AGOSTO, 2008) e influencia, principalmente, a morfologia da região posterior do corpo dos ciliados. Muitos autores utilizam tais variações como caracteres taxonômicos na diagnose de espécies, o que gera incongruências taxonômicas. *Diplodinium anisacanthum* da Cunha é um caso de incongruência na taxonomia do gênero *Diplodinium*, visto que por apresentar variações morfológicas na região posterior do corpo, ora é considerada como uma espécie polimórfica (IMAI et al., 1981; SHIMIZU et al., 1983; ITO et al., 1994; GUIRONG et al., 2000; GURUNG et al., 2002; BOOYSE & DEHORITY, 2011; BOOYSE et al., 2014), ora como sete espécies distintas (KOFOID & CHRISTENSON, 1933; DEHORITY, 1979; 1986; CLARKE, 1964; BARAKA, 2012).

Em inventário prévio sobre protozoários ciliados ruminais de ovinos (*Ovis aries* L.) no Brasil (CEDROLA et al., 2016) observou-se a presença de seis morfotipos de *Diplodinium anisacanthum*. Assim sendo, o presente estudo faz a caracterização morfológica desses seis morfotipos com base na morfologia geral, análise morfométrica e infraciliatura oral e apresenta notas taxonômicas sobre o gênero *Diplodinium* com base em informações presentes na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de conteúdo ruminal foram obtidas de 16 ovinos (*Ovis aries* L.) mantidos no Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Para detalhes sobre o manejo dos animais, ver CEDROLA et al. (2015 no prelo, Anexo 2). Cada amostra consistiu de 20 cm³ de conteúdo fixado em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984). A identificação da espécie foi baseada em descrições prévias de DOGIEL (1927); KOFOID & MACLENNAN (1932) e KOFOID & CHRISTENSON (1933). A morfometria foi feita com base nos indivíduos corados pela solução de Lugol (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) usando o software Image Pro-Plus 6.0. A orientação dos ciliados para a descrição seguiu o proposto por DOGIEL (1927). A impregnação das bandas infraciliares foi obtida por meio da técnica de impregnação pelo carbonato de prata (CEDROLA et al., 2015). O termo policinécia refere-se às bandas infraciliares compostas por numerosas, pequenas e paralelas cinécias (FERNANDEZ-GALIANO, 1979). O desenho de *Diplodinium anisacanthum* in vivo foi realizado a mão livre durante a observação do espécime em microscópio Olympus BX51 equipado com contraste interferencial diferencial. Os esquemas da infraciliatura oral, aparato nuclear e processos caudais foram elaborados em câmara clara a partir dos espécimes impregnados pela prata. Os desenhos das espécies descritas no gênero *Diplodinium* foram realizados com base nas descrições originais. Todos os desenhos foram orientados com a região anterior para o topo da página.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica de *Diplodinium anisacanthum* (Figura 1)

Os seis morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* (*monacanthum*, *diacanthum*, *triacanthum*, *tetracanthum*, *pentacanthum* e *anisacanthum*) caracterizados neste estudo apresentam o corpo em formato oval, lateralmente comprimido e afunilado na região posterior. Duas zonas ciliares retráteis, uma adoral e outra dorsal, estão localizadas na região anterior do corpo, separadas por uma leve protuberância, o opérculo. O ectoplasma, muito evidente, prolonga-se além da porção final do corpo e dá origem a espinhos caudais que variam em número de um a seis, dependendo do morfotipo. Estes espinhos caudais são os únicos caracteres morfológicos que diferenciam os morfotipos de *Diplodinium anisacanthum*. O *monacanthum* apresenta um espinho caudal, o *diacanthum* dois, o *triacanthum* três, o *tetracanthum* quatro, o *pentacanthum* cinco e o

anisacanthum, seis espinhos caudais. O macronúcleo, em formato de bastão, possui o terço anterior mais largo e inclinado (ângulo de 90°) em direção à região ventral. O micronúcleo elíptico encontra-se alojado em uma depressão na superfície anterior dorsal do macronúcleo. Apresentam dois vacúolos contráteis com poros excretores conspícuos, e estes se localizam dorsalmente ao macronúcleo. O reto é uma estrutura pequena e tubular que se localiza na região posterior do corpo e se abre em um pequeno poro, o citoprocto.

A infraciliatura oral nestes morfotipos é correspondente ao padrão-Diplodinium (ITO & IMAI, 2006). Este padrão é constituído por uma policinécia adoral (PA), uma policinécia vestibular (PV), uma policinécia dorsal (PD) e por cinécias parolabiais (CP). A policinécia adoral envolve a abertura vestibular e a policinécia vestibular é longa e se estende para o interior do vestíbulo, originando-se internamente pelo lado dorsal da policinécia adoral. A policinécia dorsal se estende lateralmente ao longo do lado dorsal do corpo e as cinécias parolabiais, que variam em número de quatro a cinco, estão localizadas próximas à porção ventral da policinécia adoral. Todos os morfotipos de *D. anisacanthum* apresentam o mesmo padrão e organização das bandas infraciliares.

A espécie *Diplodinium anisacanthum* foi descrita por DA CUNHA (1914) em bovinos e ovinos no Brasil. DOGIEL (1927) em monografia sobre a família Ophryoscolecidae renomeou a espécie descrita por da Cunha como *Diplodinium (Anoplodinium) denticulatum* f. *anisacanthum* e descreveu outras seis subespécies que diferiam da primeira no número de espinhos caudais [*D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *anacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *monacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *diacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *triacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *tetracanthum* e *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *pentacanthum*]. Kofoid & MacLennan (1932) em revisão taxonômica do gênero *Diplodinium* elevou à categoria de espécie, as subespécies propostas por Dogiel, sugerindo os seguintes nomes: *D. anisacanthum*, *D. anacanthum*, *D. monacanthum*, *D. diacanthum*, *D. triacanthum*, *D. tetracanthum* e *D. pentacanthum*. LATTEUR (1970) em nova revisão sobre o gênero considera *Diplodinium anisacanthum* como uma espécie dotada de polimorfismos [*D. anisacanthum* f. *anacanthum*, *D. anisacanthum* f. *monacanthum*, *D. anisacanthum* f. *diacanthum*, *D. f. triacanthum*, *D. anisacanthum* f. *tetracanthum*, *D. anisacanthum* f. *pentacanthum* e *D. anisacanthum* f. *anisacanthum*]. Devido às incongruências taxonômicas existentes, os morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* ora são considerados como uma espécie polimórfica e classificados a nível subespecífico (IMAI et al., 1981; SHIMIZU et al., 1983; ITO et al., 1994;

GUIRONG et al., 2000; GURUNG et al., 2002; BOOYSE & DEHORITY, 2011; BOOYSE et al., 2014), ora como sete espécies (KOFOID & CHRISTENSON, 1933; DEHORITY, 1979; 1986; CLARKE, 1964; BARAKA, 2012).

Embora tais ciliados *Diplodinium* tenham sido elevados à categoria de espécie por KOFOID & MACLENNAN (1932) é possível que sejam uma única espécie dotada de polimorfismos, como proposto inicialmente por DOGIEL (1927) e posteriormente por LATTEUR (1970), visto que apresentam morfologia e morfometria semelhantes e infraciliatura oral idêntica, diferindo apenas no número de espinhos caudais (Figura 1; Tabela 1).

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 1999) os diferentes morfotipos de *Diplodinium anisacanthum*, por terem sido descritos antes de 1960 devem ser classificados como subespécies. Dessa forma, no presente estudo propomos chama-los de: *Diplodinium anisacanthum monacanthum*, *Diplodinium anisacanthum diacanthum*, *Diplodinium anisacanthum triacanthum*, *Diplodinium anisacanthum tetracanthum*, *Diplodinium anisacanthum pentacanthum* e *Diplodinium anisacanthum anisacanthum*.

Processos caudais são utilizados como diagnose de espécies na família Ophryoscolecidae por diversos autores que seguem a classificação taxonômica proposta por KOFOID & MACLENNAN (1932) (KOFOID & CHRISTENSON, 1933; DEHORITY, 1979; 1986; CLARKE, 1964; BARAKA, 2012). Entretanto, segundo LATTEUR (1966; 1970) muitas espécies de ciliados ofrioscolecídeos apresentam considerável polimorfismo e este influencia profundamente a morfologia da extremidade posterior. O autor sugere que variações nos processos caudais não sejam utilizadas na diagnose de espécies pertencentes à família Ophryoscolecidae, pois constituem frequentemente variações intraespecíficas.

O polimorfismo em ciliados ofrioscolecídeos foi relatado por alguns autores, sendo este muito influenciado pelas interações entre os ciliados, principalmente as relações de predação e canibalismo (POLJANSKY & STRELKOW, 1938; LATTEUR, 1966; MARTINELE & D'AGOSTO, 2008). WILLIAMS & COLEMAN (1992) relataram que em culturas monoclonais, os espinhos de *Diplodinium pentacanthum* gradualmente tornam-se menores, tendendo a desaparecer, sugerindo que a presença e o número de espinhos caudais possivelmente sejam determinados por fatores ambientais.

Em outra ocasião, WILLIAMS & COLEMAN (1992) observaram que espinhos caudais em *Entodinium caudatum* Stein são perdidos em cultivos monoclonais. Entretanto, a inserção de *Entodinium bursa* Stein no cultivo promove o aparecimento de

espinhos em *E. caudatum*, o que pode estar relacionado ao fato de *E. bursa* ser o principal predador de *E. caudatum*. O autor sugere que a presença do espinho diminui a predação, visto que *E. bursa* engolfa *E. caudatum* pela região posterior, desta forma, o espinho impediria ou dificultaria o processo de engolfamento.

IMAI et al. (2002) estudando processos de transfaunação e estabelecimento da espécie *Diplodinium rangiferi* Dogiel entre ruminantes selvagens (*Cervus nippon centralis* Kishida) e bovinos domésticos (*Bos taurus taurus* L.) perceberam que ao inocular espécimes de *D. rangiferi* sem processos caudais do rúmen de cervídeos para o rúmen de bezerros, após duas semanas da inoculação, percebia-se a presença de *D. rangiferi* dotado de processos caudais nos bezerros.

Não existem informações se as similaridades morfológicas e morfométricas (polimorfismos) existentes entre os morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* são corroboradas por meio de análises moleculares, visto que só existem duas sequências de morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* disponíveis em bancos de dados. Os ciliados do gênero *Diplodinium* constituem interessante modelo de estudo para uso de múltiplos marcadores moleculares na investigação/detecção de polimorfismos e melhor esclarecimento sobre conceito de espécie dentre os ofriscolicídeos, visto acentuada plasticidade na região posterior do corpo (número e morfologia dos espinhos) destes organismos.

Notas taxonômicas sobre o gênero *Diplodinium* Schuberg (Figura 2-28, Tabela 2)

O gênero *Diplodinium* foi estabelecido por SCHUBERG (1888) para incluir espécies de ciliados ofriscolecídeos com uma zona dorsal de ciliatura em adição à zona adoral de ciliatura. O gênero *Entodinium* havia sido estabelecido anteriormente por STEIN (1858) para incluir ciliados ofriscolecídeos que apresentavam uma única zona de ciliatura. CRAWLEY (1923) ampliou a diagnose, propondo que os ciliados pertencentes ao gênero *Diplodinium* deveriam apresentar as zonas ciliares adoral e dorsal em um mesmo plano corporal, visto que na mesma ocasião, o autor estabeleceu o gênero *Epidinium*, para incluir espécies de ciliados ofriscolecídeos com as duas zonas ciliares em planos distintos.

DOGIEL (1927) realizou monografia sobre a família Ophryoscolecidae, e ao revisar o gênero *Diplodinium*, devido ao considerável número de espécies e à ampla diversidade morfológica, o dividiu em quatro subgêneros: *Anoplodinium* (placas esqueléticas ausentes e dois vacúolos contráteis), *Eudiplodinium* (uma ou duas placas

esqueléticas e dois vacúolos contráteis), *Polyplastron* (cinco placas esqueléticas e numerosos vacúolos contráteis) e *Ostracodinium* (placa esquelética ampla e dois a seis vacúolos contráteis). Mais tarde, em revisão taxonômica do gênero *Diplodinium*, KOFOID & MACLENNAN (1932) reformularam a taxonomia proposta por DOGIEL (1927). Os autores elevaram à categoria de gênero alguns dos subgêneros propostos por DOGIEL (1927) e criaram sete novos gêneros.

O subgênero *Anoplodinium* foi dividido em dois gêneros, gênero *Eodinium* KOFOID & MACLENNAN (1932) e gênero *Diplodinium* Schuberg, 1888, diferenciados pelo formato do macronúcleo. O gênero *Eodinium* com macronúcleo em formato de bastão e o gênero *Diplodinium* com macronúcleo inclinado. Devido a essas modificações taxonômicas, os autores propuseram uma nova diagnose para o gênero *Diplodinium*: “Ophryoscolecidae with dorsal membranelle zone on the same level as the adoral zone; no skeletal plates present; macronucleus beneath right surface of the body; the anterior third of the dorsal surface of the macronucleus bent ventrally at an angle of 30-90; two contractile vacuoles present”. Esta é a diagnose atual usada para caracterizar ciliados *Diplodinium*.

Devido ao considerável número de espécies descritas para o gênero *Diplodinium* e ao fato de apresentarem grande similaridade morfológica KOFOID & MACLENNAN (1932) separaram as espécies de *Diplodinium* em cinco “grupos”: *dentatum*-group (ampla extremidade posterior e cinco espinhos caudais); *bubalidis*-group (pequeno sulco longitudinal na superfície dorsal direita estendendo-se da região anterior até a região do citoprocto); *rangiferi*-group (distinta linha longitudinal percorrendo todo o comprimento da borda dorsal da superfície direita); *crista-galli*-group (formato grosseiramente triangular, truncado anteriormente e achatado posteriormente) e *anacanthum*-group (corpo afunilado na região posterior e zero a seis espinhos caudais). Entretanto, esta divisão em grupos não é muito utilizada em estudos taxonômicos atuais e as espécies de *Diplodinium* descritas após o ano de 1932 não foram incluídas nestes agrupamentos (IMAI, 1988; 1992). Estudos moleculares futuros poderão investigar validade desta proposta.

LATTEUR (1970) revisou novamente o gênero *Diplodinium* reconhecendo 20 espécies, dentre elas, as espécies classificadas anteriormente no gênero *Eodinium*: *E. rectangulatum* Kofoid & MacLennan e *E. posterovesiculatum* (Dogiel) (as chamou de *Diplodinium rectangulatum* e *D. posterovesiculatum*). Ainda, desconsiderou algumas espécies anteriormente descritas e classificou outras duas como duvidosas: *Diplodinium polygonale* (Dogiel) e *D. komareki* Kubikova devido à ausência de informações em suas

descrições. Embora LATTEUR (1970) tenha invalidado o gênero *Eodinium*, em estudo recente ITO & IMAI (2003) demonstraram que a espécie *Eodinium posterovesiculatum* apresenta arranjo infraciliar único na família Ophryoscolecidae, o que sugere a validade do gênero.

Em relação às espécies duvidosas, a espécie *Diplodinium polygonale* foi caracterizada morfológicamente em detalhe por ITO & IMAI (2005) que a classificaram no gênero *Diplodinium* destacando, no entanto, peculiaridades na morfologia da espécie designando-a como um “*Diplodinium* atípico”. Já a espécie *Diplodinium komareki* não foi novamente observada após a descrição original (KUBIKOVA, 1935), sendo necessários novos dados sobre a morfologia da espécie de modo a determinar sua posição como um *Diplodinium*, visto que a posição do micronúcleo (ventralmente ao macronúcleo) nesta espécie se enquadra em característica comum de ciliados *Entodinium* (Figura 16).

Atualmente, o gênero *Diplodinium* é representado por 31 espécies identificadas conforme comprimento e largura do corpo, morfologia e biometria do aparato nuclear e número e morfologia dos processos caudais. No presente estudo são apresentados desenhos esquemáticos e dados da morfologia/morfometria das espécies. (Figura 2-28; Tabela 2). A morfologia e número de processos caudais possui importância taxonômica relativa dentre os congêneres de *Diplodinium*. Em alguns casos, a morfologia da região posterior do corpo é caractere diagnóstico de espécie, em outros é diagnóstico de subespécie ou forma e em outros casos é ignorada como caractere diagnóstico, o que promove confusão na taxonomia do gênero. Entretanto, segundo LATTEUR (1966; 1970) processos caudais não devem ser utilizados na diagnose de espécies de ofrioscocídeos, pois estes apresentam considerável polimorfismo que influencia profundamente a morfologia da extremidade posterior. Dessa forma, o autor sugere que variações nos processos caudais constituem variações intraespecíficas.

As espécies *Diplodinium dentatum* Schuberg e *D. quinquecaudatum* Dogiel que apresentam morfologia geral muito semelhante e somente diferem no número de processos caudais (*D. dentatum* possui seis processos caudais e *D. quinquecaudatum* possui cinco) (Figura 2 e 26) são classificadas como duas espécies e não como uma espécie polimórfica.

As espécies *Diplodinium bubalidis* Dogiel, *D. consors* Dogiel, *D. crista-galli* Dogiel, *D. flabellum* Kofoid & MacLennan, *D. mahidoli* Imai & Ogimoto e *D. zambiense* Imai, por sua vez, também apresentam morfologia geral semelhante e variações nos processos caudais, porém são consideradas polimórficas e suas

respectivas variações são classificadas como “formas”. Por exemplo, a espécie *Diplodinium bubalidis* (Figura 7a-b) possui duas “formas”, assim designadas: *Diplodinium bubalidis* forma *bubalidis* e *Diplodinium bubalidis* forma *aspinosum*, de acordo com a presença e ausência de espinho caudal.

Existem ainda, as espécies *Diplodinium africanum* Imai, *D. leche* Imai e *D. rangiferi* Dogiel (Figura 3a-b; 18a-b e 27a-b) que também apresentam, cada uma, variações na morfologia da região posterior do corpo, porém são classificadas como uma única espécie, e seus diferentes morfotipos não são nomeados.

Os problemas na taxonomia do gênero não são observados apenas na análise do polimorfismo da região posterior do corpo dos ciliados. Existem ainda, as espécies de *Diplodinium* que não são contempladas pela diagnose do gênero proposta por KOFOID & MACLENNAN (1932) por não apresentarem o macronúcleo inclinado em um ângulo de 30 - 90°, as espécies: *Diplodinium leche* Imai, *D. nanum* Imai, *D. polygonale* Dogiel e *Diplodinium babici* Wertheim.

As espécies *Diplodinium leche* (Figura 18a-b), *D. nanum* (Figura 23) e *D. polygonale* (Figura 24) são consideradas espécies atípicas do gênero *Diplodinium*, pois apresentam pequenas dimensões corporais (comprimento: < 60 µm), o macronúcleo esférico (*Diplodinium polygonale*) ou em formato de bastão (*Diplodinium leche* e *D. nanum*) e infraciliatura oral distinta não compartilhada com nenhum outro grupo de ciliado ofrioscóico (ITO & IMAI, 2005). Devido a estas características peculiares, é possível que em estudos moleculares futuros estas espécies não agrupem com outros representantes do gênero *Diplodinium*. A espécie *Diplodinium babici* Wertheim (Figura 6) só possui dois registros na literatura (WERTHEIM, 1933; 1935), sendo necessários dados sobre seus aspectos morfológicos e moleculares, de modo a entender sua posição como um *Diplodinium*.

Outro problema taxonômico observado no gênero *Diplodinium* é em relação às espécies que apresentam apenas um vacúolo contrátil e também não são contempladas na diagnose proposta por KOFOID & MACLENNAN (1932), as espécies: *Diplodinium archon* Latteur (Figura 5), *D. flabellum* Kofoid & MacLennan (Figura 14a-d) e *D. polygonale* (Figura 24).

Todos estes problemas taxonômicos demonstram a necessidade de estudos mais detalhados sobre as espécies pertencentes ao gênero *Diplodinium*. Estudos caracterizando as espécies de forma multidisciplinar seria o mais adequado, visto que a maioria das espécies foi descrita com base em apenas uma técnica morfológica, frequentemente por meio de observações in vivo ou com os ciliados fixados em

formaldeído ou em solução MFS (DEHORITY, 1979, 1986; IMAI, 1986, 1988; IMAI & OGIMOTO, 1983, IMAI et al., 1981; ITO et al., 1994; BOOYSE et al., 2014). Entretanto, segundo CEDROLA et al. (2015) descrições detalhadas de ciliados do rúmen usualmente necessitam de, no mínimo, coloração pela solução de Lugol e impregnação pelo carbonato de prata; e observação in vivo, coloração pela solução MFS, impregnação pelo protargol, e microscopia eletrônica de varredura ampliam o número de caracteres morfológicos a serem utilizados na taxonomia do grupo.

Outra importante abordagem necessária no estudo de ciliados *Diplodinium* é o cultivo das espécies deste gênero com objetivo de melhor entender polimorfismos intra e inter-específicos. Estudos moleculares usando diferentes marcadores visando estudos filogenéticos, bem como estudos de genética de populações já realizados para outros grupos de ciliados (GENTEKAKI & LYNN, 2009; ZHAO et al., 2013) serão extremamente úteis para melhor organização da sistemática do gênero *Diplodinium*.

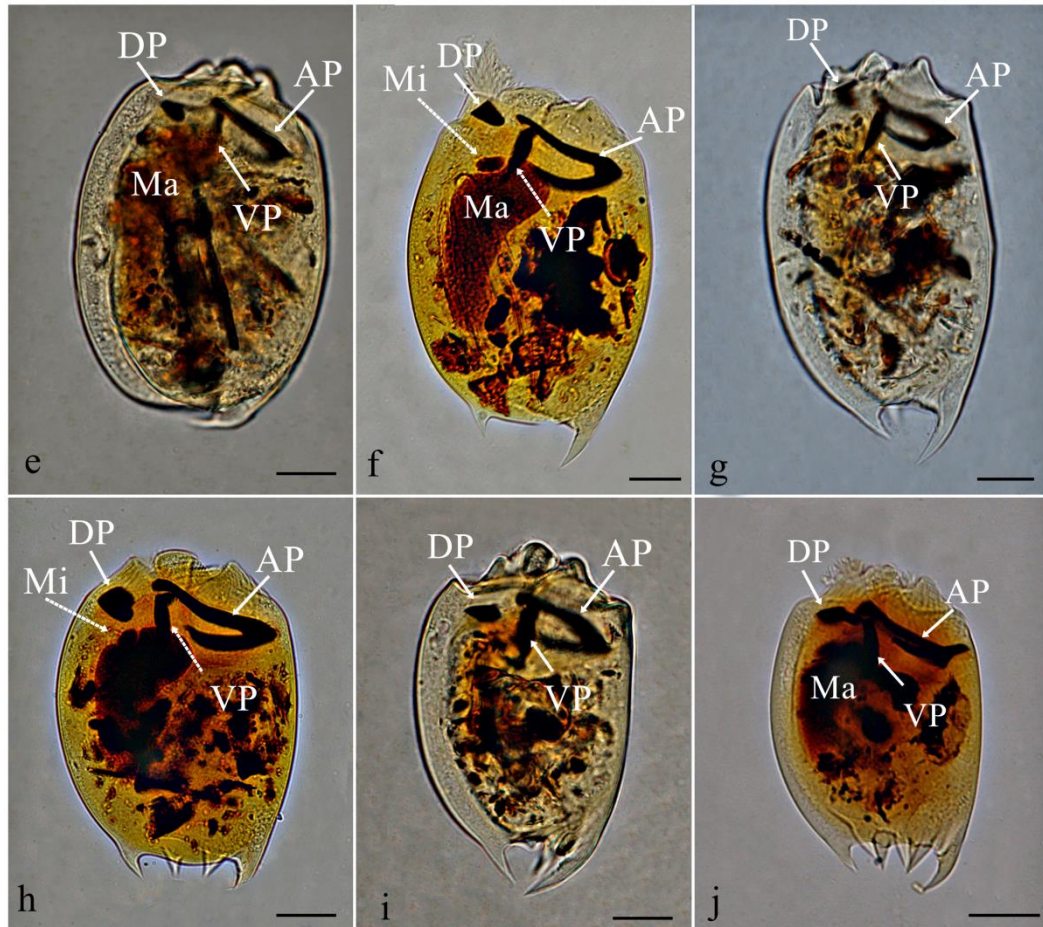
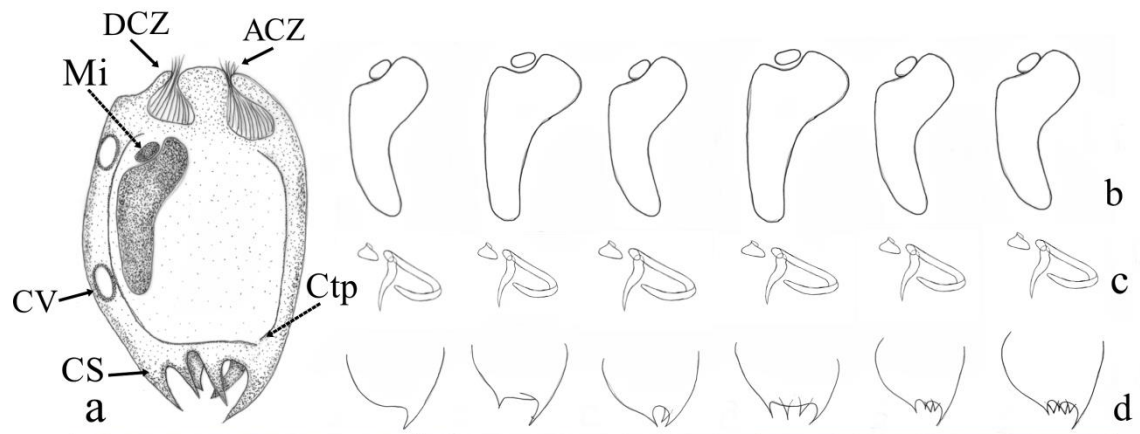


Figura 1. Seis morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* da Cunha registrados em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil. **a.** *Diplodinium anisacanthum anisacanthum*, desenho esquemático baseado em espécime corado pela solução de Lugol; **b-d.** desenho esquemático do aparato nuclear (b); infraciliatura oral (c) e projeções caudais (d). **e-j.** espécimes impregnados pela prata. **e.** *D. anisacanthum monacanthum*; **f.** *D. anisacanthum diacanthum*; **g.** *D. anisacanthum triacanthum*; **h.** *D. anisacanthum tetracanthum*; **i.** *D. anisacanthum pentacanthum*; **j.** *D. anisacanthum anisacanthum*. AP: policinécia adoral; ACZ: zona adoral de ciliatura; CS: espinho caudal; CV: vacúolo contrátil; DCZ: zona de ciliatura dorsal; DP: policinécia dorsal; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; VP: policinécia vestibular. Barras: 20 µm.

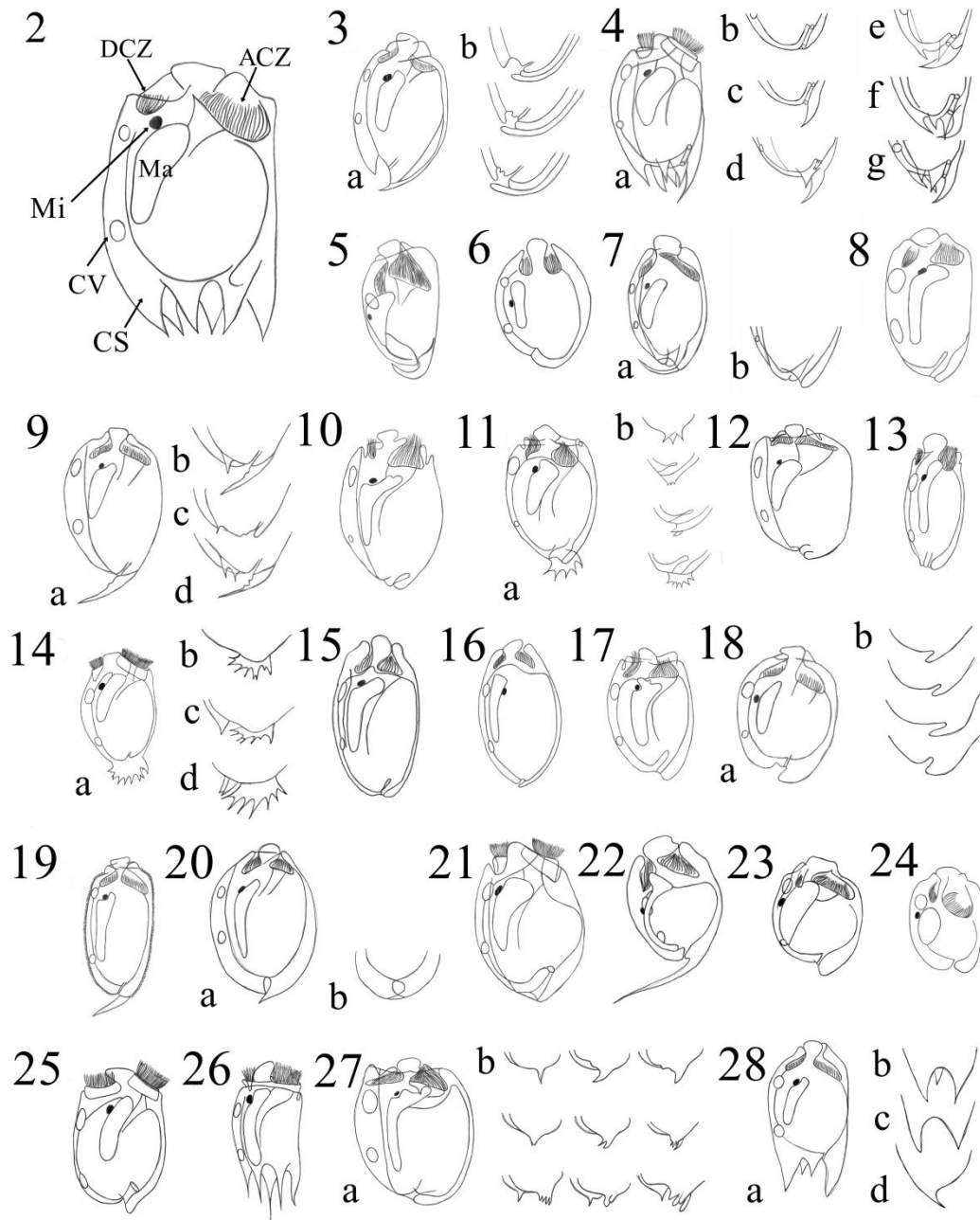


Figura 2-28. Desenhos esquemáticos das espécies descritas no gênero *Diplodinium* Schuberg baseados na descrição original. **2.** *Diplodinium dentatum*, espécie tipo do gênero; **3. a.** *D. africanum*; **b.** polimorfismo na região posterior do corpo; **4.** *Diplodinium anisacanthum*; **a.** tipo-anisacanthum; **b.** tipo-anacanthum. **c.** tipo-monacanthum; **d.** tipo-diacanthum; **e.** tipo-triacanthum; **f.** tipo-tetracanthum; **g.** tipo-pentacanthum; **5.** *D. archon*; **6.** *D. babici*; **7. a.** *D. bubalidis* f. *bubalidis*; **b.** *D. bubalidis* f. *aspinosum*; **8.** *D. cameli*; **9. a.** *D. consors* f. *consors*; **b.** *D. consors* f. *spinulosum*; **c.** *D. consors* f. *hamulosum*; **d.** *D. consors* f. *bispinulosum*; **10.** *D. costatum*; **11.** *D. crista-galli*; **b.** polimorfismo na região posterior do corpo; **12.** *D. dogieli*; **13.** *D. elongatum*; **14. a.** *D. flabellum* f. *flabellum*; **b.** *D. flabellum* f. *aspinatum*; **b.** *D. flabellum* f. *monoaspinatum*; **c.** *D. flabellum* f. *laterospinatum*; **15.** *D. italicum*; **16.** *D. komareki*; **17.** *D. laeve*; **18. a.** *D. leche*; **b.** polimorfismo na região posterior do corpo; **19.** *D. lochinvarense*; **20. a.** *D. mahidoli* f. *mahidoli*; **b.** *D. mahidoli* f. *bispinosum*; **21.** *D. minor*; **22.** *D. moucheti*; **23.** *D. nanum*; **24.** *D. polygonale*; **25.** *D. psittaceum*; **26.** *D. quinquecaudatum*; **27. a.** *D. rangiferi*; **b.** polimorfismo na região posterior do corpo; **28. a.** *D. zambiense* f. *zambiense*; **b.** *D. zambiense* f. *trispinosum*; **c.** *D. zambiense* f. *bispinosum*; **d.** *D. zambiense* f. *monospinosum*. ACZ: zona adoral de ciliatura; DCZ: zona dorsal de ciliatura; Ma: macronúcleo; Mi: micronúcleo; CV: vacúolo contrátil; CS: espinho caudal. Figuras preparadas fora de escala, para dados morfométricos, favor ver Tabela 2.

Tabela1. Medidas [μm ; média \pm desvio padrão (mínimo-máximo); $n = 20$] de seis morfotipos de *Diplodinium anisacanthum* da Cunha registrados em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil

Características	<i>monacanthum</i>	<i>diacanthum</i>	<i>triacanthum</i>	<i>tetracanthum</i>	<i>pentacanthum</i>	<i>anisacanthum</i>
Comprimento do corpo	69.51 \pm 7.17 (58.92-81.54)	69.83 \pm 8.80 (59.38-87.84)	68.72 \pm 9.32 (59.89-92.38)	69.27 \pm 5.81 (58.30-78.02)	66.76 \pm 6.43 (60.97-77.53)	78.02 \pm 6.32 (61.11-78.33)
Largura do corpo	53.13 \pm 5.71 (46.68-67.46)	55.44 \pm 5.47 (47.41-65.39)	54.00 \pm 6.28 (47.32-70.78)	53.39 \pm 4.15 (45.43-61.61)	53.01 \pm 5.76 (45.95-57.59)	59.08 \pm 2.76 (51.29-59.08)
Comprimento do corpo/largura do corpo	1.31 \pm 0.09 (1.16-1.51)	0.70 \pm 0.07 (0.59-0.83)	1.27 \pm 0.04 (1.21-1.37)	1.30 \pm 0.11 (1.12-1.52)	1.26 \pm 0.10 (1.06-1.43)	1.32 \pm 0.11 (1.10-1.42)
Comprimento do macronúcleo	40.48 \pm 6.87 (26.34-58.86)	39.06 \pm 6.28 (29.81-51.61)	39.62 \pm 7.16 (29.16-50.86)	41.42 \pm 4.06 (35.00-49.97)	39.84 \pm 6.61 (30.53-56.26)	51.86 \pm 5.84 (38.55-51.86)
Largura do macronúcleo	18.49 \pm 2.84 (13.27-25.19)	20.32 \pm 2.67 (17.03-23.81)	18.28 \pm 3.21 (14.91-24.61)	17.87 \pm 3.40 (13.11-26.86)	18.90 \pm 2.80 (15.13-23.98)	18.72 \pm 2.71 (17.08-24.32)
Comprimento do macronúcleo/ largura do macronúcleo	2.21 \pm 0.45 (1.77-3.79)	1.92 \pm 0.26 (1.57-2.36)	2.17 \pm 0.24 (1.86-2.79)	2.37 \pm 0.38 (1.86-3.33)	2.13 \pm 0.37 (1.50-2.74)	2.77 \pm 0.51 (1.72-2.99)
Comprimento do macronúcleo/comprimento do corpo	0.76 \pm 0.08 (0.53-0.97)	0.70 \pm 0.07 (0.59-0.83)	0.76 \pm 0.09 (0.58-0.86)	0.77 \pm 0.05 (0.66-0.88)	0.75 \pm 0.12 (0.56-0.98)	0.87 \pm 0.07 (0.72-0.89)
Diâmetro do micronúcleo	6.16 \pm 1.18 (3.94-8.32)	6.18 \pm 1.13 (4.92-8.68)	6.31 \pm 1.32 (4.68-9.35)	5.37 \pm 1.37 (2.17-7.94)	6.03 \pm 0.88 (3.91-7.29)	8.95 \pm 1.14 (5.52-8.95)
Distância da extremidade anterior do macronúcleo até o micronúcleo	6.22 \pm 1.76 (2.61-9.90)	6.76 \pm 1.77 (4.37-10.14)	6.30 \pm 1.54 (3.51-8.62)	6.26 \pm 1.34 (4.12-9.71)	6.22 \pm 1.54 (4.00-10.01)	6.35 \pm 1.17 (6.18-9.07)

Tabela 2. Características das espécies do gênero *Diplodinium* Schuberg

Espécies	Comp. (µm)	Larg. (µm)	Formato corpo	Nº processos caudais	Comp. macronúcleo (µm)	Larg. macronuclear (µm)	Formato Macronúcleo
<i>Diplodinium africanum</i> Imai 1988 (Fig. 3)	150-250	105-155	Oval	1	82	21	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium anisacanthum</i> da Cunha 1914 (Fig. 4)	70-90	40-60	Oval	0-6	37	11	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium archon</i> Latteur 1960 (Fig. 5)	39-49	26-33	Oval	1	18	8	Triangular
<i>Diplodinium babici</i> Wertheim 1933 (Fig. 6)	53-84	40-64	Oval	0	21	6	Bastão
<i>Diplodinium bubalidis</i> Dogiel 1925 (Fig. 7)	104-195	58-98	Oval	1	66	9	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium cameli</i> Dogiel 1925 (Fig. 8)	160-210	92-130	Oval	0	97	15	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium ceylonicum</i> Bhatia 1936	*	*	*	1	*	*	*
<i>Diplodinium consors</i> Dogiel 1925 (Fig. 9)	65-108	35-46	Oval	1	29	9	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium costatum</i> Dogiel 1925 (Fig. 10)	80-180	55-110	Oval	0	53	9	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium crista-galli</i> Dogiel 1927 (Fig. 11)	77-100	52-70	Oval	Leque caudal	38	13	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium dentatum</i> Stein 1858 (Fig. 2)	65-82	52-62	Pequeno	6	43	14	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium dogieli</i> Dogiel 1925 (Fig. 12)	70-100	48-77	Oval	0	51	36	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium elongatum</i> Dogiel 1927 (Fig. 13)	177-205	73-100	Alogado	0	107	16	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium flabellum</i> Kofoid & MacLennan 1932 (Fig. 14)	90-108	58-72	Triangular	Leque caudal	44	11	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium giraffae</i> Noirot-Timothee 1960	*	*	*	*	*	*	*
<i>Diplodinium indicum</i> Banerjee 1955	130-180	85-105	Oval	1	64	16	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium italicum</i> Morigii 1941 (Fig. 15)	120-147	64-74	Oval	0	73	8	Bastão, alargado região anterior

<i>Diplodinium komareki</i> Kubikova 1935 (Fig. 16)	*	*	Oval	*	*	*	Bastão curvado
<i>Diplodinium laeve</i> Dogiel 1927 (Fig. 17)	77-100	52-70	Oval	1	45	12	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium leche</i> Imai et al. 1992 (Fig. 18)	40-55	30-35	Oval	1	30	*	Bastão
<i>Diplodinium lochinvarense</i> Imai et al. 1992 (Fig. 19)	110-150	65-75	Cilíndrico	1	*	*	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium mahidoli</i> Imai & Ogimoto 1983 (Fig. 20)	117-168	77-113	Oval	1-2	70	10	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium minor</i> Dogiel 1925 (Fig. 21)	60-90	45-51	Oval	0	42	33	Bastão
<i>Diplodinium moucheti</i> Noirot-Timothée 1959 (Fig. 22)	74-84	52-59	Oval	1	11	5	Oval
<i>Diplodinium nanum</i> Imai 1988 (Fig. 23)	35-53	28-40	Oval	1	22	8	Oval
<i>Diplodinium psittaceum</i> Dogiel 1927 (Fig. 24)	105-155	59-100	Oval	1	35	16	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium polygonale</i> Dogiel 1925 (Fig. 25)	32-38	20-24	Oval	0	9	4	Esférico
<i>Diplodinium quinquecaudatum</i> Dogiel 1925 (Fig. 26)	57-73	47-65	Retangular	5	48	8	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium rangiferi</i> Dogiel 1925 (Fig. 27)	128-210	100-165	Oval	0-vários	111	18	Bastão, alargado região anterior
<i>Diplodinium sinhalicum</i> Imai 1986	49-59	37-44	Retangular	0-2	24	6	Triangular
<i>Diplodinium zambiense</i> Imai et al. 1992 (Fig. 28)	49-65	35-43	Oval	1-4	*	*	Bastão, alargado região anterior

* Ausência de informação na literatura. Comp.: comprimento do corpo; Larg.: largura do corpo.

REFERÊNCIAS

BANERJEE, A.K. Studies on parasitic ciliates from Indian ruminants. **Proceeding of the Zoological Society**, v. 8, p. 446–452, 1955.

BARAKA, T.A. Comparative studies of rumen pH, total protozoa, generic and species composition of ciliates in Camel, Buffalo, Sheep and Goat in Egypt. **Journal of American Science**, v. 8, p. 655–669, 2012.

BOOYSE, D.G. & DEHORITY, B.A. Rumen protozoa in South African sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 78, p. 1–7, 2011.

BOOYSE, D.G., DEHORITY, B.A. & REINIGHAUS, B. Rumen ciliates in the African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*) living in the vicinity of the Orpen Gate entrance into Kruger National Park, South Africa. **Zootaxa**, v. 1, p. 138–144, 2014.

CEDROLA, F., ROSSI, M., DIAS, R.J.P., MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. *Zoological Science*, v. 32, n. 1, p. 8–15, 2015.

CEDROLA, F., MARTINELE, I., DIAS, R.J.P., FREGULIA, P. & D'AGOSTO, M. Rumen ciliates in Brazilian sheep, with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae). **Zootaxa** (in press), 2015.

CLARKE, R.T.J. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 248–257, 1964.

CRAWLEY, H. Evolution in the family *Ophryoscolecidae*. **Proceedings of the National Academy of Natural Science**, v. 75, p. 393–412, 1923.

CUNHA, A.M. da Sobre os ciliados do estômago dos ruminantes domésticos no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 7, p. 139–145, 1914.

D'AGOSTO, M. & CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 85, p. 725–729, 1999.

DEHORITY, B.A. Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. **Journal of Protozoology**, v. 26, p. 536–544, 1979.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures 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 cyclopothid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 416–421, 1986.

DOGIEL, V.A. Nouveaux infusiores de la famille de *Ophryoscolecidae* parasites d'antilopes africaines. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 3, p. 116–142, 1925.

DOGIEL, V.A. Monographie der Familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, v. 59, p. 1–288, 1927.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorphida. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 98, p. 447–454, 1979.

GENTEKAKI, E. & LYNN, D.H. High-level genetic diversity but not population structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the Peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River Basin (North America). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3187–3195, 2009.

GUIRONG, N-R. S.; HUA, Z.X.; ZHU, S.; IMAI, S. Rumen ciliated fauna of the Yak (*Bos grunniens*) in China with the description of *Entodinium monuo* n. sp. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 178–182, 2000.

GURUNG, Y. B. PARAJULI, N.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S.; KOBAYASHI, K. Rumen ciliate faunae of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) and Goat (*Capra hircus*) in Nepal. **Journal of Veterinary and Medicine Science**, v. 64, p. 265–267, 2002.

IMAI, S. Rumen ciliate protozoal fauna of zebu cattle (*Bos taurus indicus*) in Sri Lanka, with description of a new species, *Diplodinium sinhalicum* sp. nov. **Zoological Science**, v. 3, p. 699–706, 1986.

IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with description of four new species. **Journal of Protozoology**, v. 35, p. 130–136, 1988.

IMAI, S.; TSUTSUMI, Y.; YUMURA, S.; MULENGA, A. Ciliate protozoa in the rumen of Kafue Lechwe, *Kobus Leche kafuensis*, in Zambia, with description of four new species. **Journal of Protozoology**, v. 1, p. 564–572, 1992.

IMAI, S. & OGIMOTO, K. *Parabundleia ruminantium* gen. n. sp. n., *Diplodinium mahidoli* sp. n. with two formae and *Entodinium parvum* forma *monospinosum* forma n. from the zebu cattle (*Bos indicus*, 1758) in Thailand. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 45, p. 585–591, 1983.

LATTEUR, B. *Diplodinium archon* n. sp. Ciliate Ophryoscolecidae du rumen de l'antelope *Tragelaphus scriptus* Pallas. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 46, p. 727–740, 1966.

ICNZ (1999). **International Code of Zoological Nomenclature**. 5th ed. London: The International Trust for Zoological Nomenclature, 306 p.

IMAI, S.; CHANG, C-H; WANG, J-S; OGIMOTO, K; FUJITA, J. Rumen ciliate protozoal fauna of the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) in Taiwan. **Bulletin of Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v. 29, p. 77–81, 1981.

IMAI, S.; MATSUMOTO, M.; WATANABE, A.; SATO, H. Establishment of a spinated type of *Diplodinium rangiferi* by transfaunation of 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. 1–41, 2002.

ITO, A. & IMAI, S. Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*, **The 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. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 44–41, 2005.

ITO, A. & IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 103–110, 2006.

ITO, A., IMAI, S., OGIMOTO, K. Rumen ciliate composition and diversity of Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesian cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 56, p. 707–714, 1994.

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*. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, v. 37, p. 53–152, 1932.

KUBIKOVA, M. Infusorien aus dem Pansen von *Cervus elaphus*. **Zoologischer Anzeiger**, v. 111, p. 175–177, 1935.

LATTEUR, B. Contribution à la systématique de la famille Ophryoscolecidae Stein. **Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique**, v. 96, p. 117–144, 1960.

LATTEUR, B. Révision systématique de la famille des Ophryoscolecidae Stein, 1858. Sous famille des Diplodiniinae Lubinsky, 1957. Genre *Diplodinium* (Schuberg, 1888) sensu novo. **Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique**, v. 100, p. 215–312, 1970.

MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (Ciliophora: Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 451–455, 2008.

MORIGGI, M. Ricerche sugli infusori dei ruminanti italiani. **Archivio Zoologico Italiano**, v. 29, p. 369–412, 1941.

NOIROT-TIMOTHÉE, C. *Diplodinium moucheti* n.sp. Remarques sur l'évolution des *Ophryoscolecidae* en Afrique. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v. 1, p. 331–337, 1959.

NOIROT-TIMOTHÉE, C. Sur les ciliés du rumen de *Giraffa camelopardalis* L. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 256, p. 5400–5401, 1963.

POLJANSKY, G. & STRELKOW, A. Étude expérimentale sur la variabilité de quelques Ophryoscolécidés. **Archives de Zoologie Expérimentale e Générale**, v. 80, p. 1–123, 1938.

OGIMOTO, K. & IMAI, S. 1981. **Atlas of Rumen Microbiology**. Japan Scientific Societies Press, Japan, 231 pp.

SCHUBERG, A. Die Protozoen des Wiederkauermagens. **Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematik Oekologie und Geographie der Tiere**, v. 3, p. 365–418, 1888.

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. **Bulletin of Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v. 32, p. 83–88, 1983.

STEIN, F. Über mehrere neue im Pansen der Wiederkäuer lebende Infusionstiere. **Abhandlungen der k. Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v. 10, p. 69–70, 1858.

WERTHEIM, P. Ein Beitrag zu den Untersuchungen über die Ophryoscolecidenfauna aus dem Magen von *Capra ibex* L. **Zoologischer Anzeiger**, v. 104, p. 15–25, 1933.

WERTHEIM, P. Infusorien aus dem Widerkauermagen von Gebiete Jugoslawiens nebst einer Übersicht dieser Tierchen von Balkanhalbinselbereich und ein kurzer Bericht über die ferdedarminfusorien, zugleich Revision der Familie Ophryoscolecidae. **Veterinarski Archiv**, v. 5, p. 386–536, 1935.

WILLIAMS, A.G. & COLEMAN, G.S. 1992. **The Rumen Protozoa**. Springer, New York, 423 pp.

ZHAO, Y.; GENTEKAKI, E.; YI, Z.; LIN, X. Genetic differentiation of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene in genus *Paramecium* (Protista, Ciliophora). **Plos One**, v. 8, p. 1-8, 2013.

SECÃO 4

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Diploplastron E DESCRIÇÃO DE *Diploplastron dehorityi*
(ENTODINIOMORPHIDA, OPHRYOSCOLECIDAE), UMA NOVA ESPÉCIE
DE CILIADO DO RÚMEN DE OVINOS (*Ovis aries* L.) NO BRASIL**

(artigo aceito para publicação no periódico Zootaxa)

ABSTRACT: The genus *Diploplastron* includes only one species of ophryoscolecid ciliate characterized by having two retractable ciliary zones in the anterior end of the body, and two thin juxtaposed skeletal plates on the right side, macronucleus rod shaped and two contractile vacuoles. During study on the composition of rumen ciliatofauna of Brazilian domestic sheep, we observed ciliates with atypical morphology, but with diagnostic features of the genus *Diploplastron*. This study describes a new species of ophryoscolecid ciliate *Diploplastron dehorityi* and redescribe *Diploplastron affine*. The new species differs in some aspects of the species *D. affine*. The skeletal plates of *D. dehorityi* are not juxtaposed and have curved shape. Still, the new species has the oval body, differing from the elliptical shape of *D. affine*. In addition to the similarities between the new species and congener species, *D. dehorityi* has great morphological similarity to species of the genus *Eremoplastron*, differing only in the number of skeletal plates.

Key-words: *Diploplastron*, *Eremoplastron*, Ophryoscolecidae, rumen ciliates taxonomy.

INTRODUÇÃO

O gênero *Diploplastron* foi estabelecido por KOFOID & MACLENNAN (1932) e inclui uma única espécie de ciliado ofrioscolecídeo: *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa), caracterizada por apresentar duas zonas ciliares retráteis na região anterior do corpo, duas placas esqueléticas delgadas e justapostas no lado direito, macronúcleo em formato de bastão e dois vacúolos contráteis (WILLIAMS & COLEMAN, 1992). Durante estudo sobre a composição da ciliatofauna ruminal de ovinos domésticos no Brasil, foram observados ciliados com morfologia atípica, porém com características diagnósticas do gênero *Diploplastron*. Levando em consideração a escassez de informações sobre a taxonomia e morfologia de ciliados ofrioscolecídeos, o presente estudo tem como objetivos descrever a nova espécie *Diploplastron dehorityi* e redescrever *Diploplastron affine* com base em dados morfológicos, morfométricos e detalhes da infraciliatura oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de conteúdo ruminal foram obtidas de 32 ovinos (*Ovis aries* L.) mantidos no Campo Experimental Pedro Arle, pertencente a Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município Frei Paulo, Sergipe, Brasil e distribuídos em quatro blocos casualizados. Os animais receberam água e sal mineral ad libitum, dieta composta por feno de Tyfton 85 (*Cynodon* sp.), rolão de milho e concentrado (dieta basal) e quatro tratamentos experimentais, compostos por 0, 500, 1000, ou 1500 mL de manipueira (resíduo de mandioca). Cada amostra consistiu de 20 cm³ de conteúdo fixado em formalina 18,5% (DEHORITY, 1984). A identificação das espécies de ciliados foi baseada em descrições prévias de DOGIEL (1927); KOFOID & MACLENNAN (1932); OGIMOTO & IMAI (1981) e WILLIAMS & COLEMAN (1992). A morfometria foi feita com base nos indivíduos corados pela solução de Lugol (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999) usando o software Image Pro-Plus 6.0. A orientação dos ciliados para a descrição seguiu o proposto por DOGIEL (1927); o lado do macronúcleo é denominado lado dorsal, o lado oposto a este é denominado lado ventral, definindo os lados direito e esquerdo. A impregnação das bandas infraciliares foi obtida por meio da técnica de impregnação pelo carbonato de prata (CEDROLA et al. 2015). O termo policinécia refere-se às bandas infraciliares compostas por numerosas, pequenas e paralelas cinécias (FERNANDEZ-GALIANO, 1979). Os

desenhos dos ciliados corados pela solução de Lugol foram realizados a mão livre durante a observação dos espécimes em microscópio Olympus BX51 equipado com contraste interferencial diferencial. Os esquemas da infraciliatura oral e variações das placas esqueléticas foram elaborados em câmara clara a partir dos espécimes impregnados pela prata e corados pela solução de Lugol, respectivamente. Todos os desenhos foram orientados com a região anterior para o topo da página.

RESULTADOS

Diploplastron affine (Dogiel & Fedorowa) (Figura 1; Tabela 1)

Descrição. *Diploplastron affine* apresenta o corpo em formato elíptico (comprimento do corpo $94,06 \mu\text{m} \pm 0,76$ [média \pm DP], largura do corpo $63,19 \mu\text{m} \pm 0,62$ e razão comprimento/largura: $1,48 \pm 0,02$), lateralmente comprimido, com um pequeno lobo na região posterior. A superfície externa apresenta pequenas estriações longitudinais. O vestíbulo é delgado e pouco evidente. Duas zonas ciliares retráteis, uma adoral e outra dorsal, se localizam em um mesmo plano na região anterior do corpo e estão separadas por uma protuberância arredondada e levemente achatada, o opérculo. Duas placas esqueléticas delgadas localizadas no lado direito do corpo partem da região anterior prosseguem até o terço final do corpo. As placas esqueléticas, na região anterior encontram-se afastadas (distância aproximada de $7,11 \mu\text{m}$) e aproximam-se na região mediana, permanecendo unidas até a porção final. Em alguns indivíduos as placas chegam a fundir-se. O macronúcleo possui formato de bastão (comprimento do macronúcleo: $94,91 \mu\text{m} \pm 1,13$) e apresenta uma pequena depressão na superfície dorsal, onde se localiza o micronúcleo, que possui formato elíptico. Dois vacúolos contráteis com poros excretores inconspícuos se localizam dorsalmente ao macronúcleo. O reto é uma estrutura tubular, localizada na região posterior do corpo e se abre por um pequeno poro, o citoprocto.

Ocorrência e ecologia. *Diploplastron affine* foi observado em seis dos ovinos domésticos avaliados (prevalência de 18,75%) e em densidade média de $1,6 \times 10^4$ protozoários/ mL de conteúdo ruminal.

Diploplastron dehorityi n. sp. (Figura 1; Tabela 1)

Descrição. *Diploplastron dehorityi* apresenta o corpo em formato oval (comprimento do corpo: $79,04 \mu\text{m} \pm [\text{média} \pm \text{DP}]$, largura do corpo $57,76 \mu\text{m} \pm 2,96$ e razão comprimento/largura: $1,36 \pm 0,05$), lateralmente comprimido, com um acentuado lobo na região posterior. A superfície externa apresenta pequenas estriações longitudinais. O vestíbulo é delgado e pouco evidente. Duas zonas ciliares retráteis, uma adoral e outra dorsal, se localizam em um mesmo plano na região anterior do corpo e estão separadas por uma protuberância levemente achatada, o opérculo. Duas placas esqueléticas delgadas e recurvadas localizadas no lado direito do corpo partem da base da zona adoral de ciliatura e prosseguem até o terço final do corpo. As placas esqueléticas, na base da zona adoral de ciliatura encontram-se afastadas (distância aproximada de $6,53 \mu\text{m}$) e aproximam-se na região mediana. Após a aproximação mediana, voltam a afastar-se (distância aproximada de $5,78 \mu\text{m}$), voltando a aproximar-se na porção final. O macronúcleo possui formato de bastão, levemente encurvado (comprimento do macronúcleo: $53,90 \mu\text{m} \pm 2,73$) e apresenta uma pequena depressão na superfície dorsal, onde se localiza o micronúcleo, que possui formato elíptico. Dois vacúolos contráteis com poros excretores inconspícuos se localizam dorsalmente ao macronúcleo. O reto é uma estrutura tubular, localizada na região posterior do corpo e se abre por um pequeno poro, o citoprocto.

Observações. *Diploplastron dehorityi* sp. nov. assemelha-se à *Diploplastron affine* no número de vacúolos contráteis e número de placas esqueléticas. Entretanto, difere nas dimensões corporais, no formato do macronúcleo, no formato do corpo e no formato das placas esqueléticas, pois *D. affine* apresenta maior razão comprimento x largura, possui o corpo em formato elíptico e as placas esqueléticas são justapostas. A nova espécie assemelha-se ainda à *E. neglectum* (Dogiel) e *E. rotundum* (Kofoid & MacLennan) nas dimensões e formato corporais, presença de lobo na região posterior, formato do macronúcleo e número de vacúolos contráteis. Entretanto, difere no número de placas esqueléticas, visto que ciliados pertencentes ao gênero *Eremoplastron* apresentam uma única placa esquelética (Tabela 2).

Habitat, hospedeiro tipo e localidade tipo. O rúmen de ovinos domésticos (*Ovis aries* L.) em Sergipe, Brasil.

Etimologia. O nome da nova espécie é uma homenagem ao Dr. Burk A. Dehority (Universidade de Ohio), reconhecido cientista na área de microbiologia ruminal.

Material tipo. Lâminas contendo o holótipo e parátipo serão depositadas na coleção do Laboratório de Protozoologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ocorrência e ecologia. *Diploplastron dehorityi* n. sp. foi observado em apenas um dos ovinos (*Ovis aries*) domésticos avaliados (prevalência de 3,12 %), em densidade de $0,8 \times 10^4$ protozoários/ mL de conteúdo ruminal e sem co-ocorrência com *Diploplastron affine*.

Infraciliatura oral

A infraciliatura oral na espécie *D. affine* e em *D. dehorityi* sp. nov. é correspondente ao padrão-*Diplodinium* (Ito & Imai 2006). Este padrão é constituído por uma policinécia adoral (PA), uma policinécia vestibular (PV), uma policinécia dorsal (PD) e por cinécias paralabiais (CP). A PA, em formato de C, envolve a abertura vestibular e a PV se estende para o interior do vestíbulo, originando-se internamente pelo lado dorsal da PA. A PD se estende lateralmente ao longo do lado dorsal do corpo e as CP, que variam em número de quatro a cinco, estão localizadas próximas à porção ventral da PA.

DISCUSSÃO

DOGIEL (1927) estabeleceu quatro subgêneros para o gênero *Diplodinium*: *Anoplodinium* (placas esqueléticas ausentes e dois vacúolos contráteis), *Eudiplodinium* (uma ou duas placas esqueléticas e dois vacúolos contráteis), *Polyplastron* (cinco placas esqueléticas e numerosos vacúolos contráteis) e *Ostracodinium* (placa esquelética ampla e dois a seis vacúolos contráteis). KOFOID & MACLENNAN (1932) elevaram estes subgêneros à nível de gênero, e propuseram que o subgênero *Eudiplodinium* fosse desmembrado em quatro gêneros: *Eudiplodinium* (uma placa esquelética, macronúcleo em formato de gancho e dois vacúolos contráteis), *Eremoplastron* (uma placa esquelética, macronúcleo em formato de bastão e dois vacúolos contráteis), *Diploplastron* (duas placas esqueléticas delgadas, macronúcleo em formato de bastão e dois vacúolos contráteis) e *Metadinium* (duas placas esqueléticas largas, macronúcleo lobado e dois vacúolos contráteis). Dessa forma, de acordo com a diagnose proposta por estes autores, o gênero *Diploplastron* apresenta uma única espécie: *Diploplastron affine* [anteriormente designada *Diplodinium (Eudiplodinium) affine*].

Diploplastron dehorityi sp. nov., a nova espécie descrita neste estudo apresenta as características diagnósticas do gênero *Diploplastron*, entretanto, difere em alguns aspectos, da espécie *D. affine*. As placas esqueléticas e o macronúcleo em *D. dehorityi* possuem formato recurvado. Em contraste, *D. affine* possui o macronúcleo reto e placas esqueléticas justapostas e levemente inclinadas em direção ao macronúcleo. Ainda, a

nova espécie possui o corpo em formato oval, diferindo do formato elíptico de *D. affine*. Além das semelhanças existentes entre a nova espécie e a espécie congênere, *D. dehorityi* possui grande similaridade morfológica com espécies pertencentes ao gênero *Eremoplastron*, tal como o formato e dimensões corporais, diferindo no número de placas esqueléticas (Tabela 2).

A infraciliatura oral na espécie *D. affine* foi descrita por NOIRTOT-TIMOTHÉE (1960). Segundo a autora a infraciliatura nesta espécie é composta por uma policinécia adoral que se estende para o interior do vestibulo e por uma policinécia dorsal. Entretanto, neste estudo, foi possível observar equívocos na descrição proposta por esta autora. A infraciliatura oral em ciliados *Diploplastron* é composta por uma policinécia adoral, uma policinécia vestibular, uma policinécia dorsal e por quatro a cinco cinécias paralabiais, organizadas de acordo com o padrão-*Diplodinium* proposto por ITO & IMAI (2006). Padrão este, também compartilhado por outras espécies de ciliados pertencentes à subfamília Diplodiniinae (ITO & IMAI 2006). Este padrão de bandas infraciliares também foi observado na nova espécie.

De acordo com dados morfológicos, *Diploplastron dehorityi* pode ser incluído no gênero *Diploplastron* juntamente com a espécie *D. affine* e levanta a discussão sobre taxonomia na família Ophryoscolecidae devido às similaridades morfológicas existentes entre espécies pertencentes ao gênero *Eremoplastron* e *Diploplastron* (Tabela 2). Segundo KOFOID & MACLENNAN (1932), embora a espécie *Diploplastron affine* possua duas placas esqueléticas, é muito relacionada estruturalmente a ciliados *Eremoplastron*. A similaridade morfológica e a proximidade filogenética destes gêneros, tem sido corroboradas em estudos recentes que recuperam a filogenia da família Ophryoscolecidae (KITTELMANN et al. 2015; ROSSI et al. 2015), visto que nestas análises, as espécies que constituem os gêneros *Diploplastron* e *Eremoplastron* se agrupam em clado único com elevados valores de suporte. Dessa forma, a ideia, há muito defendida de que o número de placas esqueléticas tem grande importância taxonômica na família é discutível. Entretanto, novos estudos, com maior número de sequências do gene 18S rDNA para representantes da família Ophryoscolecidae, bem como a utilização de outros marcadores moleculares deverão ser realizados de modo a entender melhor esta questão.

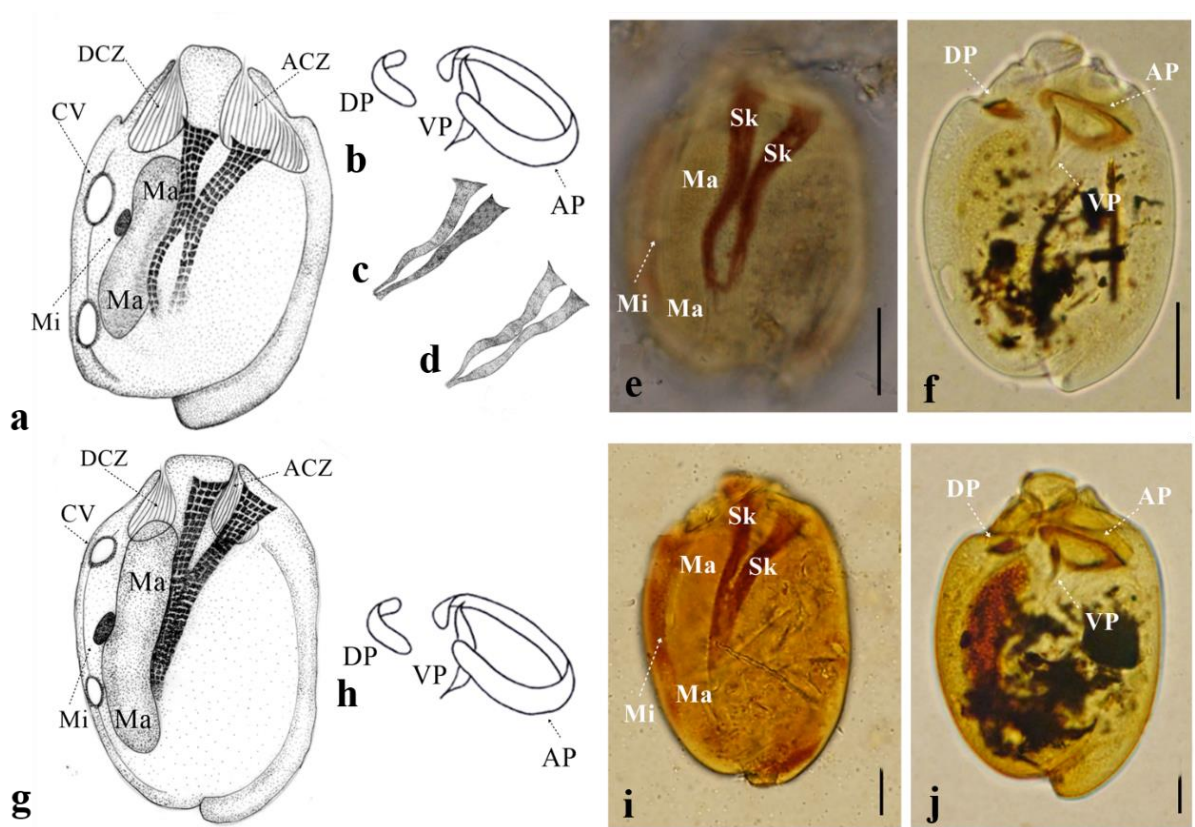


Figura 1. Ciliados do gênero *Diploplastron* registrados em ovinos domésticos no Brasil (*Ovis aries*). **a-f.** *Diploplastron dehorityi* n. sp. **a.** desenho esquemático baseado em espécime corado pela solução de Lugol. **b.** desenho esquemático do padrão de infraciliatura oral. **c-d.** desenho esquemático das variações encontradas na morfologia das placas esqueléticas. **e.** espécime corado pela solução de Lugol. **f.** espécime impregnado pela prata. **g-j.** *Diploplastron affine* (Dogiel and Fedorowa, 1925). **g.** desenho esquemático baseado em espécime corado pela solução de Lugol. **h.** desenho esquemático do padrão de infraciliatura oral. **i.** espécime corado pela solução de Lugol. **j.** espécime impregnado pela prata. **e-j.** ACZ: adoral ciliary zone; AP: adoral polybrachykinety; CV: contractile vacuole; DCZ: dorsal ciliary zone; DP: dorsal polybrachykinety; Ma: macronucleus; Mi: micronucleus; Sk: skeletal plate; VP: vestibular polybrachykinety. Bars (e, f, i, j): 20 μ m.

Tabela 1. Medidas [μm ; média \pm desvio padrão (mínimo – máximo); $n= 20$] de duas espécies pertencentes ao gênero *Diploplastron* Kofoid & MacLennan registradas em ovinos (*Ovis aries*) no Brasil

Caracteres	<i>Diploplastron affine</i>	<i>Diploplastron dehorityi</i> sp. nov.
Comprimento do corpo	94,06 \pm 0,76 (92,37 – 95,57)	79,04 \pm 4,15 (71,23 – 89)
Largura do corpo	63,19 \pm 0,62 (62,21 – 64,35)	57,76 \pm 2,96 (53,27 – 65,15)
Comprimento do corpo/ Largura do corpo	1,48 \pm 0,02 (1,43 – 1,52)	1,36 \pm 0,05 (1,21 – 1,47)
Comprimento do macronúcleo	64,91 \pm 1,13 (66,90 – 66,45)	53,90 \pm 2,73 (50,04 – 59,15)
Largura do macronúcleo	12,62 \pm 0,30 (12,01 – 13,04)	13,63 \pm 1,20 (11,18 – 15,01)
Comprimento do macronúcleo/ Comprimento do corpo	0,69 \pm 0,01 (0,67 – 0,70)	0,68 \pm 0,04 (0,61 – 0,78)
Distância do micronúcleo à extremidade anterior do macronúcleo (D)	28,44 \pm 0,43 (27,79 – 29,05)	26,21 \pm 2,65 (21,71 – 32,76)
D/ comprimento do macronúcleo	0,43 \pm 0,01 (0,42 – 0,45)	0,48 \pm 0,04 (0,38 – 0,58)

REFERÊNCIAS

CEDROLA, F., ROSSI, M., DIAS, R.J.P., MARTINELE, I. & D'AGOSTO, M. Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. **Zoological Science**, v. 32, n. 1, p. 8–15, 2015.

D'AGOSTO, M. & CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 85, p. 725–729, 1999.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures for counting rumen protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, p. 182–185, 1984.

DOGIEL, V.A. Monographie der Familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, v. 59, p. 1–288, 1927.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorphida. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 98, p. 447–454, 1979.

ITO, A. & IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 103–110, 2006.

KITTELMAN, S.; DEVENTE, S.R.; KIRK, R.M.; SEEDORF, H.; DEHORITY, B.; JANSSEN, P.H. Phylogeny of intestinal ciliates, including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 2433–2444, 2015.

KOFOID, C.A. & MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus*. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, v. 37, p. 53–152, 1932.

NOIROT-TIMOTHÉE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structure et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, v. 12, p. 526–718, 1960.

OGIMOTO, K. & IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**. Japan Scientific Societies Press, Japan, 231 pp.

ROSSI, M. F.; DIAS, R.J.P.; SENRA, M.V.X.; MARTINELE, I.; SOARES, C.A.G.; D'AGOSTO, M. Molecular phylogeny of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) inferred from 18S rDNA sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 0, p. 1–7, 2015.

ANEXO

ANEXO 1

(Artigo publicado no periódico Zoological Science)

Methods for taxonomic Studies of rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora): A brief review

Franciane Cedrola, Mariana Rossi, Roberto Júnio Pedroso Dias, Isabel Martinele, Marta D'Agosto

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil*

Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review

Author(s): Franciane Cedrola, Mariana Rossi, Roberto Júnio Pedroso Dias, Isabel Martinele and Marta D'Agosto

Source: Zoological Science, 32(1):8-15. 2015.

Published By: Zoological Society of Japan

DOI: <http://dx.doi.org/10.2108/zs140125>

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.2108/zs140125>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

[REVIEW]

Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review

Franciane Cedrola, Mariana Rossi, Roberto Júnio Pedroso Dias*,
Isabel Martinele, and Marta D'Agosto

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário,
CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil*

This review presents the principal methods used in taxonomic studies of rumen ciliates: live observation, Lugol staining, fixation and staining with methyl-green formalin saline (MFS) solution, protargol staining, silver carbonate impregnation, scanning electron microscopy and molecular techniques. Mastering these techniques is essential for successful research on the taxonomy of rumen ciliates. No single technique reveals all of the characteristics required for a complete description of a rumen ciliate; therefore, it is necessary to combine the use of these techniques as appropriate to the rumen ciliate group under study. Tables are provided to summarize: 1) morphological methods more appropriate for revealing morphological structures of interest, 2) morphological methods indicated for each group of rumen ciliates, and 3) main primers used for PCR amplification of the 18S rDNA of rumen ciliates.

Key words: Lugol's solution, methyl green, molecular techniques, protargol, rumen protozoa, silver carbonate, SEM

INTRODUCTION

Since the first observation of rumen ciliates by Gruby and Delafond (1843), these protists have been recorded in ruminant hosts around the world (D'Agosto and Santa-Rosa, 1994) and have attracted increasing interest due to their hypothesized participation in the digestive physiology of ruminants, especially in relation to enteric methane production and the intrinsic ecological relationships with other organisms that constitute the processes in which ruminal microbiota participate. To better understand these issues, it is necessary to identify the specific populations of rumen protozoa. However, few studies of this group are concerned with the problem of effective morphological characterization.

The rumen ciliates (Litostomatea, Trichostomatia) are a morphologically diverse group with representatives in two orders: Vestibuliferida Puytorac et al., 1974 and Entodiniomorphida Reichenow in Doflein and Reichenow, 1929. The order Vestibuliferida consists of five families of endosymbiotic ciliates associated with placental mammals. In ruminant mammals, vestibuliferid ciliates are mainly represented by the family Isotrichidae Bütschli, 1889, which includes species covered by dense kineties (Lynn, 2008).

The order Entodiniomorphida is commonly found in many groups of herbivorous mammals and is divided into

three suborders. The first two suborders Archistomatina Puytorac et al., 1974 and Blepharocorythina Wolska, 1971 are represented by the families Buetschliidae Poche, 1913 and Blepharocorythidae Hsiung, 1929. The third suborder, Entodiniomorphina Reichenow in Doflein and Reichenow, 1929, comprises 10 families of endosymbiotic ciliates, including the family Ophryoscolecidae. The members of this family are widely found in ruminant mammals and are characterized by having oral retractable ciliary zones and an elongated macronucleus (Lynn, 2008).

According to Foissner (2014), no single method can reveal all of the details necessary for the complete description of a ciliate, and no method is suitable for all ciliate groups. Detailed descriptions of rumen ciliates usually require, at a minimum, staining with Lugol's solution and silver carbonate impregnation (D'Agosto and Carneiro, 1999; Ito and Imai, 2006). However, live observation, staining with methyl green-formalin-saline (MFS) solution, protargol staining, and scanning electron microscopy extend the range of useful morphological characters in the taxonomy of this group of ciliates (Noirot-Timotheé, 1960; Imai and Ogimoto, 1978; Ogimoto and Imai, 1981; D'Agosto and Santa-Rosa, 1994).

Taxonomic studies of rumen ciliates initially involved the use of semipermanent preparations made with essentially fixed organisms (Dogiel, 1927). Papers on rumen ciliates reporting live observations are scarce because of the difficulty of maintaining such organisms in laboratory cultures. Semipermanent preparations with iodine-based dyes

* Corresponding author. Tel. : 55 32 2102.3223;
E-mail: rjuniodias@hotmail.com
doi:10.2108/zs140125

(Kofoid and MacLennan, 1932; Kofoid and Christenson, 1933; D'Agosto and Carneiro, 1999) and methyl green (Clarke, 1964; Dehority, 1984; Imai, 1988) are the most common, for they reveal important taxonomic characters used in the identification of many genera of rumen ciliates (Williams and Coleman, 1992).

The techniques based on permanent preparations have been implemented and are currently part of the requirements for obtaining a complete description of a rumen ciliate (D'Agosto and Santa-Rosa, 1994; Ito and Imai, 1998). Scanning electron and transmission microscopy are widely used in this type of study and show important details of the morphology of rumen ciliates, such as the external surface ornamentation and the arrangements of the kinetosomes forming the oral and somatic infraciliatures (Noirot-Timothee, 1960; Imai and Ogimoto, 1978; Imai and Tashiro, 1982; Imai, 1988; Imai et al., 1992).

Recent studies of the taxonomy of ciliates have used multidisciplinary approaches to characterize each species, including studies of morphology, ecology, and molecular data (Modeo et al., 2006, 2013). Early molecular studies of rumen ciliates started with sequencing the gene coding for the small subunit ribosomal DNA (18S rDNA), aiming to clarify the internal phylogeny of the class Litostomatea (Wright et al., 1997; Wright and Lynn, 1997a, b). Numerous qualitative and quantitative studies that focus on the diversity of ciliates in the rumen have been performed; these studies have used the following techniques: restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Regensbogenova et al., 2004a; Tymensen et al., 2012), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Regensbogenova et al., 2004b; McEwan et al., 2005; de la Fuente et al., 2009; Belanche et al., 2010; Kittelmann and Janssen, 2011), real-time polymerase chain reaction (qPCR) (Sylvester et al., 2004; Skillman et al., 2006; Belanche et al., 2010; Kittelmann and Janssen, 2011), and next-generation sequencing (NGS) (Kittelmann et al., 2013; Ishaq and Wright, 2014). Owing to the difficulties in maintaining ciliates in monoclonal cultures, in addition to their incomplete isolation from the rumen ecosystem, some studies have developed specific primers for the 18S rRNA gene PCR amplification of rumen ciliates (Karnati et al., 2003; Regensbogenova et al., 2004b; Sylvester et al., 2004).

The present study provides a detailed step-by-step guide to optical and scanning electron microscopy, as well as molecular methods, used in the study of the morphology and taxonomy of rumen ciliates. Many protocols have been proposed in the literature. However, we selected those that are most commonly used by our research group. The results obtained with the methods presented are highlighted, with comments, in this study.

METHODS

Observing living rumen ciliates

Live observation is important for taxonomic studies of ciliates as it permits the analysis of characteristics unlikely to be displayed in fixed preparations (Noirot-Timothee, 1960; Foissner, 2014). However, due to the difficulty of maintaining rumen ciliates in laboratory cultures, studies of this nature are rare (Sharp, 1914; Kofoid and MacLennan, 1930, 1932, 1933; Noirot-Timothee, 1960).

Culture systems for rumen ciliates are mainly divided into two types: the batch system and the continuous culture system (also known as the artificial rumen system) (Ogimoto and Imai, 1981). In the batch system, cultures are grown in bottles or centrifuge tubes filled with a basal mineral salts solution containing dried grass, starch, and occasionally fresh rumen fluid, gassed with CO₂ or 5% CO₂ + 95% N₂, and sealed with rubber stoppers (Ogimoto and Imai, 1981; Williams and Coleman, 1992; Hobson and Stewart, 1997; Dehority, 2003). In this type of culture, ciliates cannot be maintained for long periods (one month on average), and it is difficult to maintain properly mixed cultures.

The continuous culture system operates under conditions similar to the surroundings of the rumen. This system represents a perfect model for studies of the function of the rumen environment and keeps the ciliates alive for extended periods. However, because the expenditures for ongoing maintenance of the system are high, their use is rare in studies focused only on rumen ciliates (Ogimoto and Imai, 1981; Williams and Coleman, 1992).

For taxonomic studies, as an alternative to culturing, fresh samples of rumen contents packed in thermal containers may be used. The ciliates from this method survive for approximately 12 hours, which is sufficient time for taxonomic studies. Specifically, ophryoscolecid and isotrichid ciliates can be maintained for periods of approximately nine and 12 hours, respectively.

Ciliates in culture or in fresh samples can be screened individually with micropipettes fabricated by the investigator (Dragesco and Dragesco-Kernéis, 1986), transferred to a slide, then covered with a coverslip containing Vaseline dabs (Foissner, 2014), and observed under a bright-field microscope with/without differential interferential contrast (Nomarski) apparatus. Physical and chemical methods are available for inhibiting the movements of several groups of ciliate species (Foissner, 2014); however, the use of these methods in rumen ciliates has never been reported.

Live observations allow the analysis of various characteristics of rumen ciliates, such as 1) the aspect of ciliary zones, especially in ophryoscolecid ciliates, a group that presents a characteristic adhesion mechanism of cilia that disappears under unfavorable conditions, e.g., the presence of formaldehyde during fixation; 2) body shape; 3) vestibule morphology; 4) the presence, number, and position of contractile vacuoles; 5) the shape and position of the nuclear apparatus; 6) the cytoproct; and 7) body color (Fig. 1A, B).

Semipermanent preparations with iodine-based dyes

The most adequate techniques to visualize the skeletal plates in ophryoscolecid ciliates are preparations containing iodine-based dyes (Kofoid and Christenson, 1933; Clarke, 1964; Dehority, 1974; Van Hoven, 1983; D'Agosto and Carneiro, 1999) because these dyes have an affinity for polysaccharides, the principal constituents of the plates found in most genera of ophryoscolecid ciliates (Noirot-Timothee, 1960). The number, morphology, and biometry of skeletal plates are important characters in the diagnosis of genera and species in the Ophryoscolecidae (Williams and Coleman, 1992).

Lugol's solution staining, first proposed by D'Agosto and Carneiro (1999), is a practical, rapid, and readily reproduc-

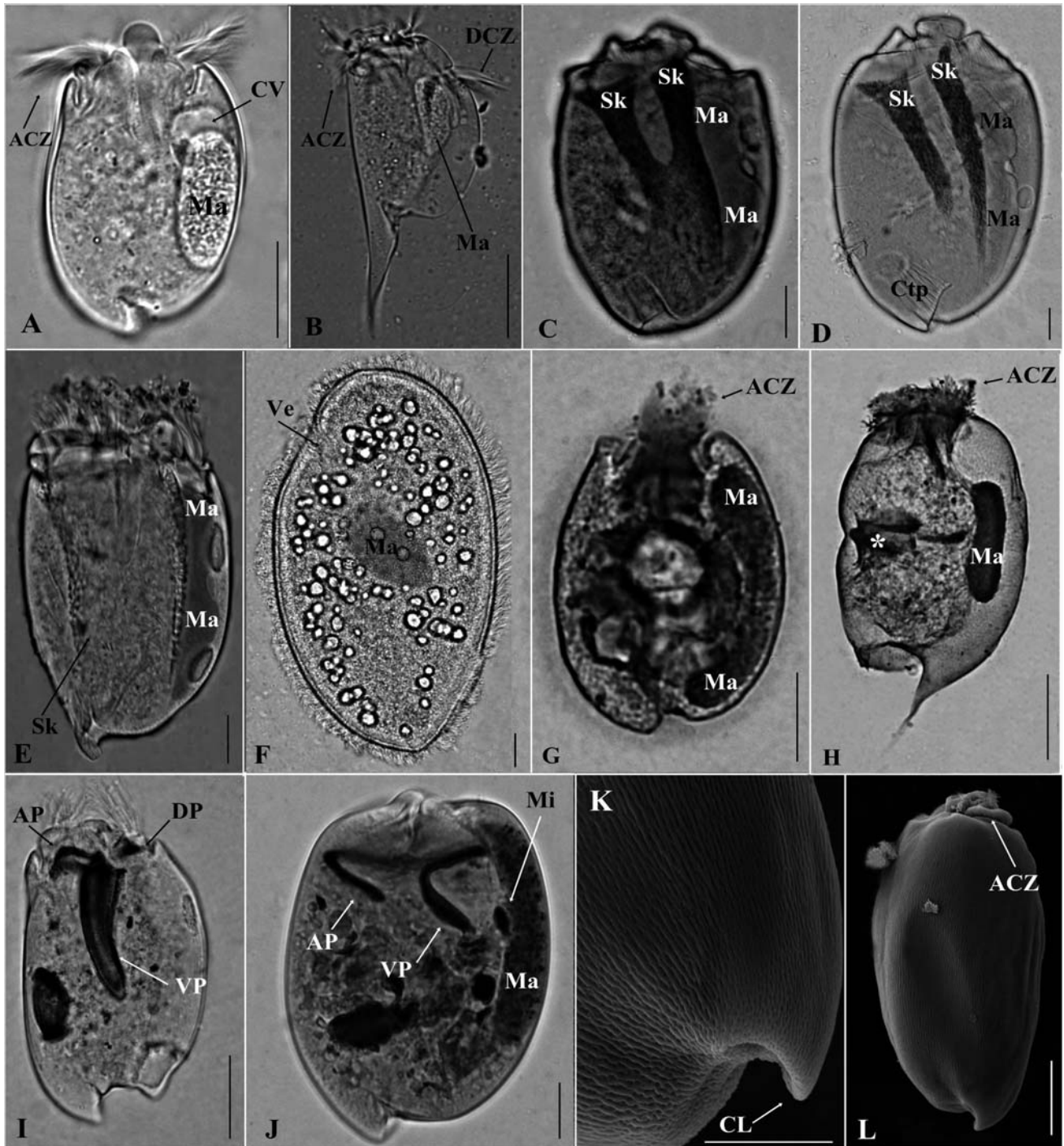


Fig. 1. Rumen ciliates prepared with the methods described in this article. **(A, B)** Live observations, illustrating the body shape, vestibule morphology, contractile vacuoles, and appearance of the ciliary zones; **(C, D)** Semipermanent preparations with Lugol's solution, showing skeletal plates; **(E, F)** Semipermanent preparations with methyl-green–formalin–saline solution, giving detailed views of the macronuclei; **(G, H)** Protargol preparations, showing several morphological features; **(I, J)** Pyridinated silver carbonate preparations; **(K, L)** SEMs, showing in detail the pellicular striations on the external surface and the shape of the lobe in the posterior region of the body. **(A)** *Entodinium ovinum* Dogiel, 1927. **(B)** *Eremoplastron rostratum* (Fiorentini, 1889). **(C)** *Metadinium esalqum* (Dehority, 1979). **(D)** *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel and Fedorowa, 1925). **(E)** *Ostracodinium dogieli* (Dogiel, 1927). **(F)** *Isotricha intestinalis* Stein, 1858. **(G)** *Entodinium longinucleatum* Dogiel, 1925. **(H)** *Entodinium caudatum lobosospinosum* Stein, 1858. **(I)** *Eodinium posterovesiculatum bilobosum* Kofoid and MacLennan, 1932. **(J)** *Entodinium bursa* Stein, 1858. **(K, L)** *Eodinium posterovesiculatum monolobosum* Kofoid and MacLennan, 1932. Abbreviations: ACZ, adoral ciliary zone; AP, adoral polybrachkinety; CL, caudal lobe; Ctp, cytoproct; CV, contractile vacuole; DCZ, dorsal ciliary zone; DP, dorsal polybrachkinety; Ma, macronucleus; Mi, micronucleus; Sk, skeletal plate; Ve, vestibulum; VP, vestibular polybrachkinety. Asterisk (*) indicates oral primordium. Scales: 20 μ m.

ible method in the study of rumen ciliates (Fig. 1C, D).

Procedure (D'Agosto and Carneiro, 1999). Fix rumen containing ciliates in an equal volume of 18.5% formalin (Dehority, 1984). Place 1 ml of the fixed sample in a test tube. Add three drops of Lugol's solution and wait approximately 15 minutes. Analyze the sample under the optical microscope using a glass slide and a coverslip.

Reagents for Lugol's solution. Dissolve 10 g of potassium iodide in 100 ml of distilled water. Slowly add 5 g of iodine crystals while shaking. Filter and store in an amber glass bottle.

Semipermanent preparations with methyl green-based dyes

The most suitable preparations for visualizing the nuclear apparatus are those containing methyl green dye (Clarke, 1964; Ogimoto and Imai, 1981; Dehority, 1984). The protocol proposed by Ogimoto and Imai (1981) is one of the most frequently used methods in the study of rumen ciliates (Fig. 1E, F).

Procedure (Ogimoto and Imai, 1981): Prepare the methyl-green-formalin-saline (MFS) solution. Add 5–10 volumes of MFS solution to the collected sample of rumen contents. After 30 minutes, analyze the sample using an optical microscope.

Reagents for MFS solution. 100 ml 35% formaldehyde solution, 900 ml distilled water, 0.6 g methyl green, and 8 g sodium chloride. After preparation, seal it tightly and store it in a dark place. If the solution is exposed to light, the methyl green dissolves to form methyl violet, and the staining capability of the solution becomes poor.

Protargol methods

The protargol staining described by Bodian (1936, 1937) was modified for the morphological study of ciliate protists by several authors (Dragesco, 1962; Tuffrau, 1967; Wilbert, 1975; Foissner, 1991; Dieckmann, 1995; Silva-Neto, 2000). However, few protocols are adapted for the study of rumen ciliates. An exception is the work of D'Agosto and Santa-Rosa (1994).

The principal structures stained by protargol in rumen ciliates are: 1) ciliary zones, 2) infraciliary bands, and 3) the nuclear apparatus (for taxonomy terms see Ito and Imai, 1998) (Fig. 1G, H). We present a slight modification of the protocol established by Tuffrau (1967) suggested by D'Agosto and Santa-Rosa (1994) and used by our research group. However, due to the lack of effective, commercially available forms of protargol suitable for silver staining ciliated protozoa, our research group synthesized this reagent using the protocol described by Pan et al. (2013).

Procedure (Tuffrau, 1967). Fix the rumen containing ciliates in an equal volume of 18.5% formalin (Dehority, 1984). Isolate ciliates using micropipettes. Place ciliates on glass slides using a drop of Mayer's glycerinated-albumen (1 vol. glycerin to 1 or 2 vol. albumen) and let it dry for at least 24 hours at room temperature. Immerse the slide in alcoholic Bouin for 25 minutes. Immerse the slide in 70% ethanol for one hour and 15 minutes. Wash the slide in running water for 10 minutes. Immerse the slide in distilled water for two minutes (two times). Immerse the slide in distilled water for five minutes. Immerse the slide in 0.5% potassium per-

manganate for two minutes. Wash the slide in running water for 10 minutes. Immerse the slide in distilled water for two minutes (two times). Immerse the slide in 5% oxalic acid for two minutes. Wash the slide in running water for 10 minutes. Immerse the slide in distilled water for two minutes (two times). Immerse the slide in 1% silver proteinate up to 12 hours at room temperature. Immerse the slide in bidistilled water for two minutes (two times). Immerse the slide in 0.1% hydroquinone for two minutes. Immerse the slide in distilled water for one minute. Immerse the slide in distilled water for two minutes (two times). Immerse the slide in a series of alcohol solutions with increasing concentration (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100% ethanol for two minutes each). Mount using a synthetic medium at room temperature. This protocol does not mention the need for sodium thiosulfate in fixing permanent slides. However, we suggest washing the slides for three seconds in 2.5% sodium thiosulfate if the slides are to be deposited in a biological collection.

Reagents. (A) Alcoholic Bouin: 150 ml 80% alcohol, 60 ml 37% formaldehyde 1 g picric acid, 15 ml glacial acetic acid. (B) 0.5% Potassium permanganate solution: 0.5 g potassium permanganate, 100 ml distilled water. (C) 5% Oxalic acid solution: 5 g oxalic acid, 100 ml distilled water. (D) 1% protargol solution: 1 g silver proteinate, 100 ml distilled water (Remarks: Sprinkle the silver proteinate powder onto the surface of the distilled water and let it dissolve overnight. Store in a dark bottle covered with aluminum foil. For the protargol synthesis protocol, see Pan et al. (2013)). (E) Hydroquinone: 10 ml distilled water, 0.5 g sodium sulfite, 2.5 g hydroquinone (Remarks: Store in a bottle covered with aluminum foil in the refrigerator). (F) Sodium thiosulfate: 100 ml distilled water, 2.5 g sodium thiosulfate.

Silver carbonate methods

The pyridinated silver carbonate impregnation technique was described by Fernandez-Galiano (1976) and is used to highlight the oral and somatic infraciliature as well as the nuclear apparatus of various groups of ciliates. This technique is rapid and works well for ciliate groups such as hymenostomes, prorodontids, colpodids, and heterotrichs; however, this technique requires large numbers of organisms (Foissner, 2014).

Rumen ciliates are easily stained by silver carbonate (Fig. 1I, J), and several protocols are appropriate for this type of ciliates (Ito and Imai, 1998, 2006). This method has been used routinely in studies of the taxonomy of rumen ciliates, primarily in studies of ophryoscolecids (Mishima et al., 2009).

Procedure (Ito and Imai, 2006). Fix rumen contents in 3–5 volumes of MFS solution or 10% formalin solution (Remarks: Store in the dark for later study). Concentrate ciliates by centrifuging at 1300 rpm. Add three drops of the concentrated specimen to a test tube containing 4–6 ml of distilled water. Add four drops of pure pyridine, six drops of 4% peptone, and 10 drops of Rio Hortega's ammoniacal silver carbonate solution (Fernandez-Galiano, 1976). Incubate the test tube in a water bath kept at 60 to 70°C for two minutes. Add approximately 4–6 ml of distilled water to the test tube. Concentrate ciliates by centrifuging at 1300 rpm. Remove the supernatant. Add three drops of albumen gela-

Table 1. PCR primers used for amplification of the 18S rDNA gene from rumen ciliates.

Group/Genera/Species	Region amplified	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Anealing temperature	Reference
Eukaryotic cells	18S rDNA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	50°C	Medlin et al. 1988
Rumen protozoa (Vestibuliferid and Entodiniomorphid ciliates)	18S rDNA	CTTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTAC	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	37°C	Kanarti et al. 2003
Rumen protozoa (Vestibuliferid and Entodiniomorphid ciliates)	18S rDNA	GGTGGTGCATGGCCG	AATTGCAAAGATCTATCCC	60°C	Regensbogenova et al. 2004
Rumen protozoa (Vestibuliferid and Entodiniomorphid ciliates)	18S rDNA	CAYGTCTAAGTATAAATAACTAC	CTCTAGGTGATWWGRTTTAC	55°C	Sylvester et al. 2004
Rumen protozoa (<i>Entodinium</i> , <i>Epidinium</i> e <i>Ophryoscolex</i>)	18S rDNA	GAGCTAATACATGCTAAGGC	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	56°C	Skillman et al. 2006
Rumen protozoa (<i>Entodinium</i>)	18S rDNA	GAGCTAATACATGCTAAGGC	CCCTCACTACAATCGAGATTTAAGG	55°C	Skillman et al. 2006
Rumen protozoa (<i>Dasytricha ruminantium</i>)	18S rDNA	CTAGAGCTAATACATGCC	CTACAATCACAATTAATTGC	55°C	Skillman et al. 2006

tin solution. Incubate the test tube at 38°C for three hours. Concentrate ciliates by centrifuging at 1300 rpm for three minutes. Remove the supernatant. Spread the concentrated specimens on a slide. Transfer the slide to a cold moist chamber for 20 minutes. Place the slides successively in the following solutions: hardening solution I, hardening solution II in the freezer, then hardening solution III (for five minutes each). Dehydrate with a graded ethanol series (50%, 70%, 90%, 95% and 100%, five minutes each). Clear for five minutes in xylene. Mount in synthetic neutral mounting medium.

Reagents. (A) MFS solution: 100 ml 35% formaldehyde, 900 ml distilled water, 0.6 g methyl green, 8 g sodium chloride. (B) 10% formalin: 10 ml 37% formaldehyde, 90 ml distilled water. (C) 4% peptone: 96 ml distilled water, 4 g bacteriological proteose peptone, 0.5 ml 37% formaldehyde. (D) Ammoniacal silver carbonate solution (Fernandez-Galiano, 1976): The ratios are important! 50 ml of 10% aqueous silver nitrate solution are placed in a flask; 150 ml of 5% aqueous sodium carbonate are added little by little under constant stirring; add 25% ammonia, drop by drop, until the precipitate dissolves, being careful not to add an excess; finally add distilled water up to a total volume of 750 ml. The solution will remain stable for several years. (E) Albumen gelatin solution: 2 g powdered gelatin, 0.005 g sodium chloride, 20 ml distilled water (with eggs mixed in the proportion of 14:1). (F) Hardening solution I: 26 ml 35% formaldehyde, 0.25 g sodium chloride, 20 ml distilled water. (G) Hardening solution II: 10 g anhydrous sodium sulfate, 100 ml distilled water. Hardening solution III: 80 ml distilled water, 8 g sodium sulfate, 6 ml acetic acid, 2 g trisodium citrate dihydrate 8 g aluminum potassium sulfate 12 H₂O.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy reveals important characteristics of the external morphology of rumen ciliates, such as 1) membrane striations, 2) excretory pores, 3) details of the oral and somatic ciliature, and 4) the morphology of lobes and spines in the posterior region of the body (Imai et al., 1992; Foissner, 2014).

Although most of the characters of taxonomic importance in rumen ciliates are revealed by simple microscopic

Table 2. Principal structures revealed by the morphological methods described in this study of rumen ciliates.

Structures revealed	Live observation	Lugol's solution	MFS solution	Protargol	Silver carbonate	SEM
Nuclear apparatus	+	+/-	++	++	++	-
Ciliary zones	++	+/-	+/-	+	-	+
Cytoproct	+	++	+	+	+	+
Colour	++	-	-	-	-	-
Surface ornamentation	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++
Body shape	++	+	+	+	+	++
Infraciliary bands	-	-	-	+/-	++	-
Skeletal plates	+	++	+/-	+/-	+/-	-
Caudal lobes, spines	++	++	++	++	++	++
Contractile vacuoles	++	+	+/-	+/-	+/-	-
Vestibulum shape	++	+	+	+/-	+/-	-

++: excellent, +: good; +/-: sometimes effective, -: not revealed.

methods, the specific identification of certain ophryoscolecoid ciliates requires the use of scanning electron microscopy. For example, this is the case for *Diplodinium lochinvarense* Imai et al., 1992, in which the body surface is decorated with small and tapered warts (Imai et al., 1992).

In our studies of rumen ciliates, our research group uses the fixatives suggested by Silva-Neto (1994) and the ciliate processing protocol developed by Silva-Neto et al. (2012) (Fig. 1K, L).

Procedure (Silva-Neto et al., 2012). Fix approximately 1 ml of recently collected rumen contents in a mixture of 1 ml of 12% glutaraldehyde + 1 ml of buffer solution of 0.2 M sodium cacodylate (pH 7.2) + 2 ml 2% osmium tetroxide (OsO₄) for 30 minutes. Concentrate ciliates using micropipettes under a stereoscopic microscope and wash in distilled water to remove excess fixative. Dehydrate the material using a graded ethanol series (30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95%, and 100%) for 15 minutes at each step. Dry using the CO₂ critical point method in a specific apparatus using glass tubes sealed with plankton netting (15 µm). Transfer the ciliates to a metallic support fixture equipped with double-sided tape and subject the fixture to metallization. The metallized samples are ready to be analyzed with a scanning electron microscope.

Reagents. (A) Glutaraldehyde (12%) (commercial solution 25%): 48 ml 25% glutaraldehyde, 52 ml distilled water. (B) Buffer solution 0.2 M sodium cacodylate (adjust to pH 7 with HCl): 42.8 g sodium cacodylate, 1000 ml distilled water. (C) 2% osmium tetroxide: 1 g osmium tetroxide, 50 ml distilled water.

Table 3. Methods for studying the morphological characteristics of specific groups of rumen ciliates (systematic after Lynn, 2008).

Taxa	Live observation	Lugol's solution	MFS solution	Protargol	Silver carbonate	SEM
Ordem Vestibuliferida						
Familia Isotrichidae (e.g., <i>Dasytricha</i> , <i>Isotricha</i>)	++	+/-	++	++	+/-	++/-
Familia Paraisotrichidae (e.g., <i>Paraisotricha</i>)	++	+/-	++	++	+/-	++/-
Ordem Entodiniomorphida						
Familia Buetschliidae (e.g., <i>Blepharoconus</i> , <i>Buetschilia</i> , <i>Bundleia</i> , <i>Parabundleia</i> ...)	++	+/-	++	*	++	*
Familia Blepharocorythidae (e.g., <i>Charonina</i>)	++	+/-	++	+/-	++	++/-
Familia Ophryoscolecidae (e.g., <i>Entodinium</i> , <i>Diplodinium</i> , <i>Metadinium</i> , <i>Ophryoscolex</i> ...)	++	++	++	+/-	++	++/-
Familia Parentodiniidae (e.g., <i>Parentodinium</i>)	++	+/-	++	+/-	++	++/-

+, recommended; ++, highly recommended; +/-, sometimes useful, depends on species; *, missing data for better clarification.

Molecular techniques

Molecular studies for the study of rumen ciliates were introduced in the 1990s with sequencing of the small subunit rDNA gene and the aim of understanding the phylogenetic relationships of representatives of class Litostomatea (Wright et al., 1997; Wright and Lynn, 1997a, b). These initial studies were performed using ciliates isolated from monoclonal cultures or directly from the rumen (Baroin-Tourancheau et al., 1992, 1995, 1998; Embley et al., 1995; Wright et al., 1997; Wright and Lynn, 1997a, b). In the latter case, the use of universal eukaryotic primers increased the chance of contamination by amplifying sequences from the flagellates and fungi in the rumen ecosystem in addition to ciliates.

Molecular data, specifically 18S-rDNA gene sequences, have been used to reassess the taxonomy and systematics of various groups of ciliates (Stoeck et al., 1998; Li et al., 2006; Huang et al., 2012; Bachy et al., 2012; Zhang et al., 2014). Although findings from several molecular studies have corroborated proposals for classification based on morphological and/or ontogenetic data, some results have led to radically different conclusions (Strüder-Kypke et al., 2000; Cameron et al., 2001; Chen and Song, 2002; Cameron et al., 2003; Li and Song, 2006). The quantity of 18S-rDNA gene sequences available in GenBank for rumen ciliates is eclipsed by the vast number of sequences for other groups of ciliates. In order to best use this molecular marker in taxonomic decisions, it is necessary to augment the database with more sequences from this neglected group.

Recently, new, more specific primers were designed for amplification of the 18S rRNA gene of rumen ciliates (Kanarti et al., 2003; Regensbogenova et al., 2004b; Sylvester et al., 2004; Skillman et al., 2006) (Table 1). While most molecular studies of rumen ciliates target the 18S rRNA gene, other molecular markers can be used, such as 28S rRNA (Baroin-Tourancheau et al., 1992, 1995), ITS (Wright, 1999), and α -tubulin (Baroin-Tourancheau et al., 1995).

Beyond the focus of systematics and taxonomy, molecular studies applying the techniques of RFLP (Regensbogenova et al., 2004a), DGGE (Regensbogenova et al., 2004b; de la Fuente et al., 2009; Belanche et al., 2010; Kittelman et al., 2011), and NGS of the 18S rDNA gene (Kittelman et al., 2013; Ishaq and Wright, 2014) have been performed to reveal the richness of these ciliates in different hosts, under different diets, and from different geographic regions. Fur-

thermore, qPCR (Sylvester et al., 2004; Skillman et al., 2006; Belanche et al., 2010; Kittelman and Janssen, 2011) and T-RFLP (Tymensen et al., 2012) have been used in the investigation of the structure of the assemblage of ciliates in the rumen ecosystem.

Final considerations

The knowledge of the principal methods of microscopy used in research on the morphology and taxonomy of various groups of rumen ciliates allows the selection of the appropriate methodology for the structure to be studied and the most suitable technique for each distinct group of rumen ciliates (Tables 2 and 3).

Most reviews of appropriate methodologies for the taxonomic study of diverse groups of ciliates (Foissner, 1991, 2014) do not present the detailed procedures and techniques specific to rumen ciliates. The protocols presented in the current review have been very effective in visualizing the relevant morphological characters for the taxonomic characterization of rumen ciliates. These protocols are also simpler than many techniques described in previous studies.

The live observation of rumen ciliates shows characters that are not observable in fixed organisms and that are essential for detailed morphological studies. The ciliature zone in ophryoscolecid ciliates presents a characteristic adhesion mechanism that disappears upon fixation and can be analyzed in detail only through in vivo observations (Noirot-Timothee, 1960). Semipermanent preparations are easy and rapid to perform. They are very useful in ecological surveys that address the role of the ruminant diet in relationship to the structure and composition of the ciliate taxocenosis, as these preparations reveal species-specific characteristics of these microorganisms, e.g., body shape, size and number of skeletal plates and the shape and position of the nuclear apparatus. The silver impregnation methods are essential for taxonomic studies because they stain the oral and somatic ciliature, which are species-specific among rumen ciliates (Ito and Imai, 2003, 2005). Furthermore, they produce permanent slides that can be deposited in reference collections. The fixatives used in the scanning electron microscopy technique preserve body shape, especially the shape of spines and caudal lobes. Molecular data have proven to be very important in taxonomic studies of rumen ciliates, and consequently, it is necessary to increase the number of molecular markers and 18S rDNA gene

sequences for these microorganisms in genetic databases.

This review addresses various areas of knowledge because it relies on methodologies that are simple and straightforward to apply. These methods are needed for research in animal science. The review also addresses more elaborate protocols needed in taxonomic studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by CAPES (PNPD and Programa de Apoio à Parasitologia Básica) and FAPEMIG. We thank Dr. Inácio Domingos da Silva-Neto for assistance with scanning electron microscopy, Luisa Oliveira for help in laboratory work, CNPq for grants to Marta D'Agosto and CAPES for grants to Isabel Martinele; Mariana Rossi and Franciane Cedrola.

REFERENCES

- Bachy C, Gómez F, López-García P, Dolan JR, Moreira D (2012) Molecular phylogeny of tintinnid ciliates (Tintinida, Ciliophora). *Protist* 163: 873–887
- Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R, Adoutte A (1992) A broad molecular phylogeny: identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proc Natl Acad Sci* 89: 9764–9768
- Baroin-Tourancheau A, Tsao N, Klobutcher LA, Pearlman RE, Adoutte A (1995) Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *EMBO J* 14: 3262–3267
- Baroin-Tourancheau A, Villalobo E, Tsao N, Torres A, Pearlman RE (1998) Protein coding gene trees in ciliates: comparison with rRNA-based phylogenies. *Mol Phylogenet Evol* 10: 299–309
- Belanche A, Balcells J, de la Fuente G, Yañez-Ruiz DR, Fondevila M, Calleja L (2010) Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. *J Anim Physiol Anim Nutr* 94: 648–658
- Bodian D (1936) The new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat Rec* 69: 153–162
- Bodian D (1937) The staining of paraffin sections of nervous tissues with activated protargol. The role of fixatives. *Anat Rec* 70: 153–162
- Cameron SL, Adlard RD, O'Donogue PJ (2001) Evidence for an independent radiation of endosymbiotic litostome ciliates within Australian marsupial herbivores. *Mol Phylogenet Evol* 20: 302–310
- Cameron SL, Wright A-DG, O'Donogue PJ (2003) An expanded phylogeny of the Entodiniomorpha (Ciliophora: Litostomatea). *Acta Protozool* 42: 1–6
- Chen Z, Song W (2002) Phylogenetic positions of *Aspidisca steini* and *Euplotes vannus* within the order Euplotida (Hypotrichia: Ciliophora) inferred from complete small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Acta Protozool* 41: 1–9
- Clarke RTJ (1964) Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). *New Zeal J Agr Res* 7: 248–257
- D'Agosto M, Carneiro ME (1999) Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Rev Bras Zool* 16: 725–729
- D'Agosto M, Santa-Rosa MR (1994) Aspectos morfológicos de cilios de rúmen (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. *Rev Bras Zool* 11: 215–225
- De la Fuente G, Belanche A, Abecia L, Dehority BA, Fondevila M (2009) Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). *Eur J Protistol* 45: 112–120
- Dehority BA (1974) Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibus moschattus*) and dall mountain sheep (*Ovis dalli*). *J Protozool* 21: 26–32
- Dehority BA (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. *App Environ Microbiol* 48: 182–185
- Dehority BA (2003) *Rumen Microbiology*. 2nd ed, Nottingham University Press, Nottingham
- Dieckmann J (1995) An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results. *Eur J Protistol* 31: 372–382
- Dogiel VA (1927) Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Arch Protistenkd* 59: 1–288
- Dragesco J (1962) L'orientation actuelle de la systématique des ciliés et la technique d'imprégnation au protéinate d'argent. *Bull Micr Appl* 11: 49–58
- Dragesco J, Dragesco-Kernéis A (1986) Ciliés libres de l'Afrique intertropicale. *Faune Tropicale* 26: 1–559
- Embley TM, Finlay BJ, Dyal PL, Hirt RP, Wilkinson M, Williams AG (1995) Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc Roy Soc B Biol Sci* 262: 97–93
- Fernandez-Galiano D (1976) Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with pyritinated silver carbonate method. *Trans Am Microsc Soc* 95: 557–560
- Foissner W (1991) Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *Eur J Protistol* 27: 313–330
- Foissner W (2014) An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 271–292
- Gruby D, Delafond O (1843) Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestin, pendant la digestion des animaux herbivores e carnivores. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci* 17: 1304–1308
- Hobson PN, Stewart CS (1997) *The rumen microbial ecosystem*. 2nd ed, Balckie Academic & Professional, London
- Huang J, Dunthorn M, Song W (2012) Expanding character sampling for the molecular phylogeny of euplotid ciliates (Protozoa, Ciliophora) using three markers, with a focus on the family Uronychiidae. *Mol Phylogenet Evol* 63: 598–605
- Imai S (1988) Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. *J Protozool* 35: 130–136
- Imai S, Ogimoto K (1978) Scanning electron and fluorescent microscopic studies on the attachment of spherical bacteria to ciliate protozoa in the ovine rumen. *Jpn J Vet Sci* 40: 9–19
- Imai S, Tashiro H (1982) A resin-pulverizing procedure for scanning electron microscopy of rumen ciliates (Protozoa: Ciliophora). *T Am Microsc Soc* 101: 299–302
- Imai S, Tsumitsumi Y, Yumura S, Mulenga A (1992) Ciliate protozoa in the rumen of Kafue Lechwe, *Kobus leche kafuensis*, in Zambia, with the description of four new species. *J Protozool* 39: 564–572
- Ishaq SL, Wright A-DG (2014) Design and validation of four new primers for next-generation sequencing to target the 18S rRNA gene for gastrointestinal ciliate protozoa. *Appl Environ Microbiol* 80: 5515–5521
- Ito A, Imai S (1998) Infraciliary bands in the rumen ophryoscolecid ciliate *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. *J Euk Microbiol* 45: 628–636
- Ito A, Imai S (2003) Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posteroovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. *J Euk Microbiol* 50: 34–42
- Ito A, Imai S (2005) Infraciliature and morphogenesis in three rumen *Diplodinium* ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche* and *Diplodinium nanum*, observed by light microscopy. *J Euk Microbiol* 52: 44–51
- Ito A, Imai S (2006) Infraciliary band pattern of rumen ophryoscole-

- cid ciliates. *Endoc Cell Res* 17: 103–110
- Kanarti SKR, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M, Firkins JL (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J Anim Sci* 81: 812–815
- Kittelmann S, Janssen PH (2011) 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 Microbiol Ecol* 75: 468–481
- Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, et al. (2013) Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One* 8: 1–11
- Kofoid CA, Christenson JF (1933) Ciliates from *Bos gaurus* H. Smith. *Univ Calif Publ Zool* 33: 471–544
- Kofoid CA, MacLennan RF (1930) Ciliates from *Bos indicus* Linn I. The genus *Entodinium* Stein. *Univ Calif Publ Zool* 33: 471–544
- Kofoid CA, MacLennan RF (1932) Ciliates from *Bos indicus* Linn II. The genus *Diplodinium* Schuberg. *Univ Calif Publ Zool* 37: 53–152
- Kofoid CA, MacLennan RF (1933) Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen.nov., and *Ophryoscolex* Stein. *Univ Calif Publ Zool* 39: 1–34
- Li L, Song W (2006) Phylogenetic position of the marine ciliate, *Certesias quadrinucleata* (Ciliophora; Hypotrichia; Hypotrichida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. *Eur J Protistol* 42: 55–61
- Li L, Song W, Warren A, Wang Y, Ma H, Hu Y, et al. (2006) Phylogenetic position of the marine ciliate, *Cardiostomatella vermiforme* (Kahl, 1928) Corliss, 1960 inferred from the complete SSrRNA gene sequence, with establishment of a new order Loxocephalida n. ord. (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Eur J Protistol* 42: 107–114
- Lynn DH (2008) *The Ciliated Protozoa*. 3rd ed, Springer, New York
- McEwan NR, Abecia L, Regensbogenova M, Adam CL, Findlay PA, Newbold CJ (2005) Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Lett Appl Microbiol* 41: 97–71
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491–499
- Mishima T, Katamoto H, Horii Y, Kakengi VAM, Ito A (2009) Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stokyi* (Buisson, 1924). *Eur J Protistol* 45: 77–86
- Modeo L, Rosati G, Andreoli I, Gabrielli S, Verni F, Petroni G (2006) Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). *Proc Jpn Acad* 82: 359–374
- Modeo L, Petroni G, Lobban CS, Verni F, Vannini C (2013) Morphological, ultrastructural and molecular characterization of *Euplotes rosati* n.sp. (Ciliophora, Euplotida) from Guam. *J Euk Microbiol* 60: 25–36
- Noirot-Timothee C (1960) Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. *Ann Sci Nat Zool* 12: 526–718
- Ogimoto K, Imai S (1981) *Atlas of Rumen Microbiology*. 1st ed, Japan Scientific Societies Press, Tokio
- Pan X, Bourland WA, Song W (2013) Protargol synthesis: An in house protocol. *J Euk Microbiol* 60: 609–614
- Regensbogenova M, Kisidayova S, Michalowiski T, Javorsky P, Moon-Van der Staay SY, Moon-Van der Staay GWM, et al. (2004a) Rapid identification of rumen protozoa by Restriction Analysis of Amplified 18S rRNA gene. *Acta Protozool* 43: 219–224
- Regensbogenova M, Pristas P, Javorsky P, Moon-Van der Staay SY, Moon-Van der Staay GWM, Hackstein JHP, et al. (2004b) Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Lett Appl Microbiol* 39: 144–147
- Sharp R (1914) *Diplodinium ecaudatum* with an account of neuro-motor apparatus. *Univ Calif Publ Zool* 13: 43–122
- Silva-Neto ID (1994) Observations sur l'ultrastructure du Cilié Hétérotriche, *Licnophora auerbachii* Cohn, 1866, épibionte de l'étoile de mer. *Ann Sci Nat Zool* 15: 49–62
- Silva-Neto ID (2000) Improvement of silver impregnation technique (protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalinated. *Rev Bras Biol* 60: 451–459
- Silva-Neto ID, Paiva TS, Dias RJP, Campos CJA, Migotto AE (2012) Redescription of *Licnophora chattoni* Villeneuve-Brachon, 1939 (Ciliophora, Spirotrichea) associated with *Zyzyzus warreni* Calder, 1988 (Cnidaria, Hydrozoa). *Eur J Protistol* 48: 48–62
- Skillman LC, Toovey AF, Williams AJ, Wright A-DG (2006) Development and validation of real time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between *Entodinium* populations in sheep offered a hay-based diet. *Appl Environ Microbiol* 72: 200–206
- Stoeck T, Pryzybos E, Schmidt HJ (1998) A combination of genetics with inter- and intra-strain crosses and RAPD-fingerprints reveals different population structures within the *Paramecium aurelia* species complex. *Eur J Protistol* 34: 348–355
- Strüder-Kypke MC, Wright A-DG, Fokin SI, Lynn DH (2000) Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *J Euk Microbiol* 47: 419–429
- Sylvester JT, Kanarti SKR, Yu Z, Morrison M, Firkins JL (2004) Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J Nutr* 134: 3378–3384
- Tuffrau M (1967) Perfectionnements et pratique de la technique d'impregnation au protargol des infusoires ciliés. *Protist* 3: 369–399
- Tymensen L, Barkley C, McAllister TA (2012) Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. *J Microbiol Methods* 88: 1–6
- Van Hoven W (1983) Rumen ciliates with description of two new species from the African reedbuck species. *J Protozool* 30: 127–130
- Wilbert N (1975) Eine verbesserte technik der protargol-impregnation für ciliaten. *Mikrokosmos* 6: 171–179
- Williams AG, Coleman GS (1992) *The Rumen Protozoa*. Springer, New York
- Wright A-DG (1999) Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. *J Euk Microbiol* 46: 445–446
- Wright A-DG, Lynn DH (1997a) Phylogenetic analysis of the rumen ciliate family Ophryoscolecidae based on 18S ribosomal RNA sequences, with new sequences from *Diplodinium*, *Eudiplodinium* and *Ophryoscolex*. *Can J Zool* 75: 963–970
- Wright A-DG, Lynn DH (1997b) Monophyly of tricoelome ciliates (Phylum Ciliophora: Class Litostomatea) tested using new 18S rRNA sequences from the vestibuliferids, *Isotricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium* and the haptorian, *Didinium nasutum*. *Eur J Protistol* 33: 305–315
- Wright A-DG, Dehority BA, Lynn DH (1997) Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorphida) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *J Euk Microbiol* 44: 61–67
- Zhang Q, Yi Z, Fan X, Warren A, Gong J, Song W (2014) Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista, Ciliophora). *Mol Phylogenet Evol* 70: 162–170

ANEXO 2

(Artigo publicado no periódico Zootaxa)

Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Ciliophora, Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae)

Franciane Cedrola, Isabel Martinele, Roberto Júnio Pedroso Dias, Priscila Fregulia,
Marta D'Agosto

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil*



Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae)

FRANCIANE CEDROLA¹, ISABEL MARTINELE¹, ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS^{1,2},
PRISCILA FREGULIA¹ & MARTA D'AGOSTO¹

¹Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. CEP 36036-900

²Corresponding author. E-mail: rjuniodias@hotmail.com

Abstract

The species composition, prevalence, and average relative abundance of rumen ciliates were analyzed in 16 Brazilian sheep. 28 species of ciliates were identified belonging to 3 families: Isotrichidae, Ophryoscolecidae, and Parentodiniidae. Among these ciliates, *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum*, and *M. rotundatum* were found for the first time in sheep, and other 12 species for the first time in Brazilian sheep. Different morphotypes of parentodiniid ciliates were identified in 7 of the 16 sheep analyzed and this is the second report of this family in ruminants. The species *Entodinium contractum* was redescribed based on the new data on the general morphological features; for the first time, we described the oral infraciliature, which in this species is of the *Entodinium*-type. In this species, it is noteworthy that the prominent vestibular polybrachykinety can be used as an important identifying characteristic.

Key words: Brazilian domestic sheep, ciliated protozoa, *Entodinium contractum*, Neotropical zone

Introduction

In most studies on rumen ciliates in Brazil, the microorganisms are identified at the genus level, and the research mainly covers the following topics: the role of ciliates in the host metabolism (Martinele *et al.* 2008; 2010; Rísoli *et al.* 2009), the use of ciliatologic techniques and the morphology (D'Agosto & Santa-Rosa 1994; Cedrola *et al.* 2015), ecology (Martinele *et al.* 2007) and behavior (Martinele & D'Agosto 2008) of the microorganisms. There are few detailed surveys of rumen ciliates in Brazil (Cunha 1914; Dehority 1979; 1986; Rossi 2013). Dehority (1986) pointed out that the diversity of ciliated protozoa in Brazil has peculiarities, which highlight the need for additional survey studies mainly due to the wealth of wild and domesticated hosts in the little explored Neotropical zone. Various studies on rumen ciliates in Brazilian domestic sheep identified a total of only 30 species (Cunha 1924; Martinele & D'Agosto 2008; Rossi 2013; Cedrola *et al.* 2014), and to our knowledge, there are no similar studies in other areas of South America. Therefore, the aim of this study was to document and assess the prevalence and average relative abundance of rumen ciliated protozoan species in Brazilian sheep and to redescribe *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson.

Material and methods

We used 16 sheep (*Ovis aries* L.), males, castrated, with 8.1 ± 1.1 months of age, initial weight of 19.6 ± 2.9 Kg and slaughter weight of 30 Kg. The time of permanence of the animals in the confinement varied according the treatment used (123.37; 86.62; 75.25 and 52.50 days). The animals were housed in individual pens in the Setor de Caprino-ovinocultura, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil and distributed into 4 randomized blocks: each block involved a 20%, 40%, 60%, or 80% level

of a nutritional concentrate in the diet. This concentrate was composed of corn, soybean meal, and vegetable oil. The basal diet consisted of Tifton hay (*Cynodon dactylon*) (for details see Medeiros *et al.* 2009). Before slaughter, the animals were deprived of food for 12 h; during this period, they received water *ad libitum*. Samples were obtained manually, at slaughter of animals, from the rumen mass center, consisting of 20 cm³ of rumen content, which was fixed in 18.5% formalin (Dehority 1984).

Identification of species was based on the descriptions of Dogiel (1927), Kofoid & MacLennan (1930, 1932), Kofoid & Christenson (1933), Dehority (1979), Ogimoto & Imai (1981), and Williams & Coleman (1992). To identify the ciliates, we used a Olympus BX-51 light microscope (600 X and 1000 X magnification) equipped with a Olympus Evolt E-330 digital camera and Image-Pro Plus 6.0 software to perform morphometry on 20 specimens of each species stained with the Lugol's solution (for details see Cedrola *et al.* 2015). The orientation of the ciliates for description was adopted from Dogiel (1927): the side closest to the macronucleus was termed the dorsal side, and the opposite one, the ventral side, thus, defining the right and left sides.

The infraciliary bands were stained using the silver carbonate impregnation technique (Ito & Imai 2006). The term polybrachykinety denotes infraciliary bands composed of numerous, short and parallel kineties (Fernandez-Galiano 1979).

Free hand drawings of *E. contractum in vivo* were created for observation of the specimens under a microscope (Olympus BX51; equipped with differential interferential contrast). The drawings of silver-impregnated specimens were prepared using a light camera. All drawings were oriented so that the anterior side of the body was at the top of the page.

The prevalence of each species was determined according to Bush *et al.* (1997), and the average relative abundance was estimated from a sample of 300 cells from each animal (Ito *et al.* 1994; Mishima *et al.* 2009). The Margalef richness index was calculated using the PAST software, version 3.0 (Hammer *et al.* 2001).

Results

Across all 16 sheep, three families, 9 genera, and 28 species were identified (Table 1). The composition and species richness varied among the 4 experimental treatments (Table 1). The animals that received the diet with 20% of the concentrate showed a greater wealth Margalef index (4.47) compared to the animals fed the 40% (2.19), 60% (2.19), and 80% concentrate (2.17).

The family Ophryoscolecidae Stein dominated the average relative abundance among the groups that received the 20%, 40%, and 80% concentrate, whereas the family Parentodiniidae Ito *et al.* was the most abundant in the group that received the 60% concentrate. Among the 3 families reported in this study, Isotrichidae Bütschli showed lower relative abundance as a result of the treatments involving the 20%, 40%, and 60% concentrate (Table 1 and Figure 1). Among the ophryoscolecid ciliates, species belonging to the subfamily Diplodiniinae Lubinsky were found in greater numbers with the treatment involving the 20% concentrate and in lower numbers with the treatment involving the 40% concentrate (not detected with the 60% and 80% concentrate). The species belonging to the subfamily Entodiniinae Lubinsky were found in large numbers with all experimental treatments (Table 1 and Figure 2).

The majority of the ciliates present in all animals belonging to the genus *Entodinium* Stein, which was responsible for over 90% of the total abundance of protozoa. The species *E. simplex* Dogiel and *E. exiguum* Dogiel exhibited highest prevalence (87.5%), and *E. rectangulatum lobosospinosum* was the species with the highest average relative abundance (25.3%).

Among the species identified, *Entodinium alces*, *Metadinium esalqum*, and *M. rotundatum* were found for the first time in sheep, whereas *E. biconcavum*, *E. dubardi dubardi*, *E. exiguum*, *E. ovinum*, *E. rectangulatum lobosospinosum*, *Diplodinium monacanthum*, *D. diacanthum*, *D. triacanthum*, *D. tetracanthum*, *D. pentacanthum*, *Eremoplastron rostratum*, and *Eudiplodinium maggii* were found for the first time in Brazilian sheep.

Different morphotypes of parentodiniid ciliates were found in 7 of the 16 sheep examined, ours being the second finding of this family in ruminant mammals, having been previously reported in the hippopotamus (Thurston & Noirot-Timothee 1973) and in cattle (Dehority 1986).

E. contractum, which was originally discovered in the rumen contents of the gaur Smith (Kofoid & Christenson 1933) and not found since, was rediscovered in the present study. This species is redescribed here in

detail (Figure 3 and Table 2) using the information obtained from specimens stained with the Lugol's solution and impregnated with silver carbonate.

TABLE 1. Prevalence and average relative abundance \pm SD^a of ciliate species recorded in Brazilian sheep (n = 16).

Order / Family / Species	Average relative abundance				
	Total Prevalence	Concentrate levels			
		20%	40%	60%	80%
Order Vestibuliferida					
Family Isotrichidae					
<i>Dasytricha ruminantium</i>	37.5	5.8 \pm 4.4	1.6 \pm 1.8	0	0
<i>Isotricha intestinalis</i>	18.7	0	0	12.5 \pm 0.9	0
<i>Isotricha prostoma</i>	6.2	2.4 \pm 2.3	0	1.6 \pm 2.8	0
Order Entodiniomorpha					
Family Ophryoscolecidae					
<i>Entodinium alces</i> *	31.2	0	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.8	3.42 \pm 1.8
<i>Entodinium biconcavum</i> **	6.2	0	0	0	11.14 \pm 0.9
<i>Entodinium caudatum</i>	18.7	4.8 \pm 3.7	0	0	0
<i>Entodinium contractum</i> *	25	2.4 \pm 2	0	0	0
<i>Entodinium dubardi dubardi</i> **	37.5	0	12.3 \pm 0.5	3.3 \pm 5.7	13.2 \pm 5.6
<i>Entodinium exiguum</i> **	87.5	20 \pm 8.6	17 \pm 14.7	16.4 \pm 14.2	10.2 \pm 14.6
<i>Entodinium longinucleatum longinucleatum</i>	62.5	0	1 \pm 1	17 \pm 12.9	8 \pm 11.2
<i>Entodinium ovinum</i> **	6.2	0	0	0	14.9 \pm 1
<i>Entodinium nanellum</i>	87.5	16 \pm 6	7.4 \pm 0.9	9.1 \pm 9.9	16.9 \pm 10.9
<i>Entodinium parvum parvum</i>	81.2	7.5 \pm 5.7	7.3 \pm 10.7	5.2 \pm 6.1	13.3 \pm 5.3
<i>Entodinium rectangulatum lobosopinosum</i> **	62.5	9.8 \pm 5	58.8 \pm 18.9	1 \pm 1.7	6.2 \pm 11.8
<i>Entodinium simplex</i>	87.5	13 \pm 11.9	2.6 \pm 3.7	13.6 \pm 11.8	0
<i>Diplodinium monacanthum</i> **	18.7	1.6 \pm 1.3	0	0	0
<i>Diplodinium diacanthum</i> **	25	2 \pm 1.6	0	0	0
<i>Diplodinium triacanthum</i> **	25	1.4 \pm 1.4	0	0	0
<i>Diplodinium tetracanthum</i> **	25	2.4 \pm 3.2	0	0	0
<i>Diplodinium pentacanthum</i> **	18	2 \pm 1.5	0	0	0
<i>Diplodinium anisacanthum</i> **	18	1.4 \pm 1.4	0	0	0
<i>Diplodinium flabellum</i>	18	0.6 \pm 0.7	0	0	0
<i>Eudiplodinium maggii</i> **	12	0.6 \pm 1.2	1.6 \pm 2.8	0	0
<i>Eremoplastron rostratum</i> **	6	0.6 \pm 0.3	0	0	0
<i>Elytroplastron bubali</i>	12	0.8 \pm 1.6	0	0	0
<i>Metadinium esalqum</i> *	18	1.3 \pm 0.9	0	0	0
<i>Metadinium rotundatum</i> *	6	0.1 \pm 0.3	0	0	0
Family Parentodiniidae					
<i>Parentodinium</i> spp. *	43	0	1.8 \pm 3.2	31.2 \pm 38.3	5.92 \pm 7.6
Total of species		21	12	11	10

* First record of the species in sheep; ** First record of the species in Brazilian sheep; ^aSD: standard deviation.

TABLE 2. Morphometric characterization of *Entodinium contractum* recorded in Brazilian sheep.

Characters	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	n
Body length*	52.09	3.14	44.47	58.21	6	20
Body width	32.64	2.76	26.71	38.50	8	20
Body length / width Body	1.60	00.14	1.37	1.92	9	20
Macronuclear length	47.46	7.35	42.20	50.32	15	20
Macronuclear width	5.47	0.66	4.32	6.72	12	20
Macronuclear length / body length	0.91	00.14	00.40	1.05	15	20
Macronuclear length / width Macronuclear	8.83	1.80	3.26	11.65	20	20

*based on specimens stained with Lugol's solution. All dimensions in micrometers. CV: coefficient of variation (in %); Mean: arithmetic mean; SD: Standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum; n: sample size.

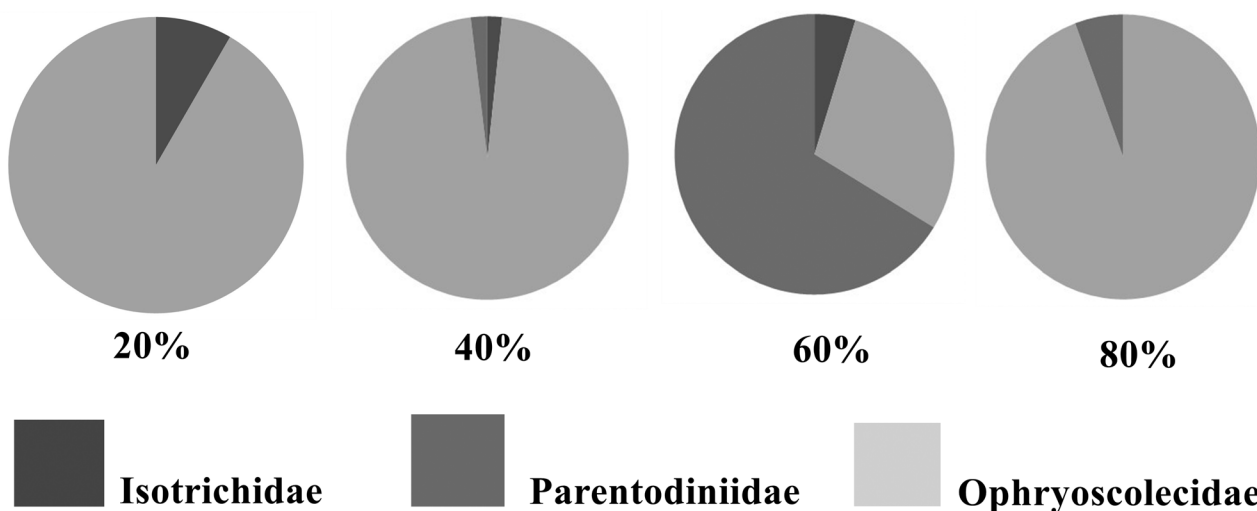


FIGURE 1. Average relative abundance of three families (Isotrichidae, Ophryoscolecidae and Parentodiniidae) of rumen ciliates in Brazilian sheep fed diets containing different concentrate levels (20, 40, 60 and 80%).

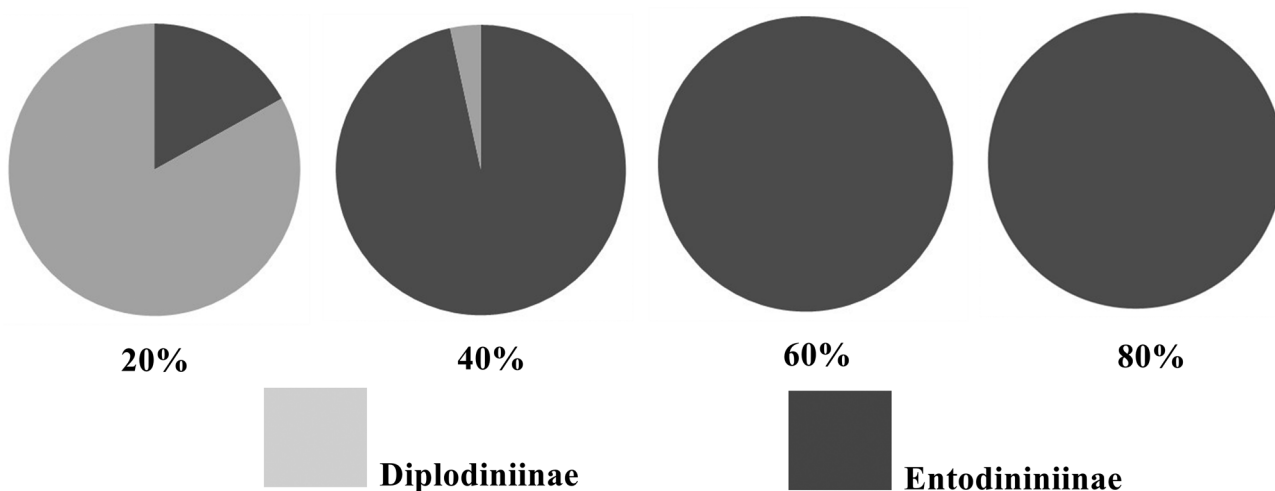


FIGURE 2. Average relative abundance of two subfamilies of Ophryoscolecid ciliates in Brazilian sheep fed diets containing different concentrate levels (20, 40, 60 and 80%).

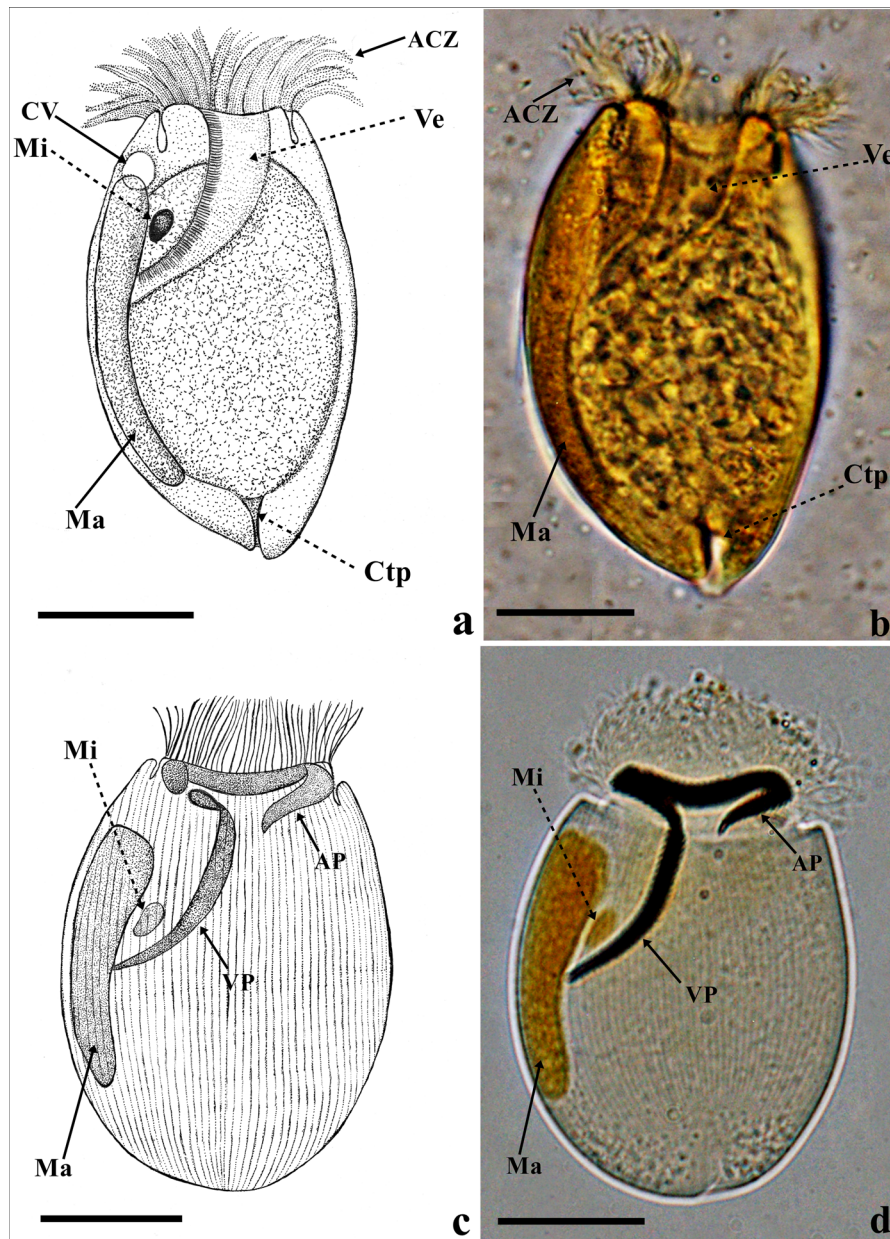


FIGURE 3. *Entodinium contractum* Kofoid & Christenson recorded in Brazilian sheep. **A.** Schematic drawing based on live observation; **B.** Specimen of *Entodinium contractum* after Lugol's solution; **C.** Schematic drawing based on silver carbonate impregnation. **D.** Specimen of *Entodinium contractum* after silver carbonate impregnation. **ACZ:** Adoral ciliary zone; **AP:** Adoral polybrachykinety; **Ma:** Macronucleus; **Mi:** Micronucleus; **Ve:** Vestibulum; **VP:** Vestibular polybrachykinety. Bars: 20 μ m.

The body of *E. contractum* has a pear shape (Figure 3A and 3B) and is laterally compressed and slightly rounded at the posterior end (body length 52.09 μ m \pm 3.14 [mean \pm SD] and body width 32.64 μ m \pm 2.76). There are no caudal processes. The external surface contains small longitudinal striations (Figures 3C and 3D). A single retractable ciliary zone (adoral ciliary zone) is located at the anterior end of the body, surrounding the vestibular opening (Figure 3A and 3B). The vestibulum is long and prominent (occupying $\sim 1/3$ of the body length) and curves dorsally toward the macronucleus (Figures 3C and 3D). The ectoplasm is clear and contains the nuclear apparatus and the contractile vacuole (Figures 3 A-D). The macronucleus, rod shape, is wider in the anterior region than in the back, long and slightly curved (macronuclear length: 47.46 μ m \pm 7.35). The micronucleus is oval and is located ventral to the macronucleus (Figure 3C and 3D). A small contractile vacuole is located on the right surface of the macronucleus. The endoplasm is clear and often contains a considerable number of digestive vacuoles. The rectum is a slender tubular structure at the posterior end of the body and opens through a small pore, the cytoproct (Figures 3A and 3B).

The oral infraciliature of *E. contractum* is composed of an adoral polybrachykinety (AP), vestibular polybrachykinety (VP), and paralabial kineties (PK). The C-shaped AP involves the vestibular opening. The VP has the same width as does the AP and extends into the vestibulum from the dorsal edge of the AP. The PK is composed of more than four short transverse kineties which extend along the right ventral side of the AP (Figure 3C and 3D).

Discussion

The composition and richness of rumen ciliated protozoa are influenced by several factors, the most important being the diet (Mishima *et al.* 2009; Booyse *et al.* 2014) and rumen pH (Franzolin & Dehority 2010). Diets containing high levels of the concentrate are rich in rapidly fermentable carbohydrates and the fermentation products are volatile fatty acids that reduce the rumen pH (Franzolin & Dehority 2010). A reduction in rumen pH has a deleterious effect on many species among rumen ciliates (Franzolin & Dehority 2010), the most sensitive species belonging to the subfamily Diplodiniinae, whose members are not usually found in animals fed diets containing high levels of the concentrate. In the present study, the species of Diplodiniinae ciliates were found only in groups that received the 20% and 40% concentrate (Table 1 and Figure 2), with lower relative abundance with the 40% concentrate. In the groups that received the 40%, 60%, and 80% concentrate, we found ciliates belonging to the subfamily Entodiniinae (Figure 2), corroborating the literature data suggestive of amylolytic feeding habits, lower sensitivity to changes in pH, and the occurrence in hosts with the diet containing high levels of the concentrate (Williams & Coleman 1992; Dehority 2003).

Studies of domestic and wild sheep demonstrated the occurrence of 133 species of rumen ciliates in these hosts (Cunha 1914; Martinele & D'Agosto 2008; Booyse & Dehority 2011; Rossi 2013; Cedrola *et al.* 2014). In the present study, there are 3 new findings of rumen ciliates in sheep; among these ciliates, *M. esalqum* appears to be endemic in Brazil. This species was found by Dehority (1979) in the southeastern Brazilian domestic buffalo (*Bubalus bubalis* L.) and was subsequently identified by the same author in southeastern Brazilian domestic cattle (Dehority 1986). Because in the literature, there are cases of transfaunation among ruminants (Dehority 1978; Imai *et al.* 1978; Imai *et al.* 2002), survey studies of ciliate species in wild ruminants could confirm *M. esalqum* endemism. *M. rotundatum* that was found in the rumen contents of the Indian gaur (Kofoid & Christenson 1933) was subsequently identified in cattle in the same location (Banerjee 1955). *Entodinium alces*, which was described by Dehority (1974) as the endosymbiont of moose (*Alces americana*) in Alaska, was recently found in Brazilian domestic cattle by Rossi (2013).

The genus *Parentodinium* was proposed by Thurston & Noirot-Timothee (1973) to include the species of ciliates that have a retractable ciliary cone at the anterior end of the body, a tubular vestibulum, a macronucleus without a defined position, and a single contractile vacuole located at the ventral posterior end of the body. Those authors assumed that the new genus belongs to the family Cycloposthiidae Poche. This genus was reviewed by Ito *et al.* (2002) based on the general morphological features and infraciliature; those authors proposed a new family Parentodiniidae because of important morphological differences between these ciliates and the family Cycloposthiidae and other families of the order Entodiniomorpha. The morphotypes of the parentodiniid ciliates that were identified in this study represent morphological identifying signs of the genus, but differ in some respects from the species described in this family (Thurston & Noirot-Timothee 1973; Ito *et al.* 2002); thus, detailed studies of the morphology of these ciliates are needed to obtain further consistent descriptions. A high relative abundance of parentodiniid ciliates (74%) was reported in relation to other ciliates in the sample in one of the analysed animal. This is new data, because in a past study, parentodiniid ciliates had less relative abundance in relation to genus *Entodinium* ciliates in domestic ruminants (Dehority 1986).

The new findings of rumen ciliate species in Brazilian sheep may be due to the larger number of hosts analyzed (n = 16) in the present study, compared to previous studies (Cunha 1914; Dehority 1979; 1986; Rossi 2013), and due to the unexplored status of the area in question: Northeast Brazil. The hosts from this geographic region have been poorly studied in relation to the diversity of rumen ciliates in the country; this area needs more attention, and other investigators may expand the data reported here.

E. contractum was described by Kofoid & Christenson (1933) in the rumen contents of the gaur (a species of wild cattle found in India) and has not been reported since until the present study. The rediscovery of this species is

extremely important because it contributes to better understanding of the geographic distribution of populations of endosymbiotic ciliated protozoa of domestic ruminants. *E. contractum* has a pear-shaped body and a long and prominent vestibulum, which are the main taxonomic characteristics for identification of this species. The population of *E. contractum* that is found in Brazil differs from that described in India by length (44.47–58.21 μm versus 39–46 μm), body width (26.71–38.50 μm vs. 27–34 μm), and length of the macronucleus (42.20–50.32 μm vs. 27–36 μm). Other researchers have pointed out that identification of rumen ciliate species in different hosts may uncover differences in morphometry even with the same general morphological features (Kofoid & MacLennan 1932, 1933; Rossi 2013).

The oral infraciliature was characterized in ciliated protozoa in detail for the purpose of expanding the list of characteristics used to differentiate these microorganisms because the organization of oral ciliature can serve as an identifying feature of many species (Ito & Imai 2006; Mishima *et al.* 2009; Rossi 2013; Cedrola *et al.* 2014). Oral infraciliature of *E. contractum* was described and belongs to the *Entodinium*-type (Ito & Imai 2006) because this ciliate has the same pattern of infraciliary bands as do other *Entodinium* species also falling into this pattern (Noirot-Timothee 1960; Fernandez-Galiano *et al.* 1985; Ito *et al.* 2002; Ito & Imai 2003; Mishima *et al.* 2009; Rossi 2013). It is noteworthy that in this species, the prominent vestibular polybrachykinety can serve as an important identifying characteristic of this species.

This work seems to be the first survey of rumen ciliate species in Brazilian sheep that involves a significant number of sampled hosts ($n = 16$) and appropriate ciliatologic techniques. In this study, *E. alces*, *E. contractum*, *M. esalqum*, and *M. rotundatum* were found for the first time in sheep. This means that there are now a total of at least 137 species (Booyse & Dehority 2011) associated with wild and domestic sheep around the world.

Acknowledgments

This work was partially supported by CAPES (PNPD and Programa de Apoio à Parasitologia Básica) and FAPEMIG. CNPq provided research grants to Marta D'Agosto, and CAPES to Franciane Cedrola. We thank Dr. Geovegue Rodrigues de Medeiros and Universidade Federal Rural de Pernambuco for the samples of rumen contents; Dr. Sthefane D'Ávila for the free hand drawings of *Entodinium contractum* and Ricardo Cazetta Menzer for his assistance in editing the English language.

References

- Banerjee, A.K. (1955) Studies on parasitic ciliates from Indian ruminants. *Proceeding of the Zoological Society*, 8, 87–101.
- Booyse, D.G. & Dehority, B.A. (2011) Rumen protozoa in South African sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 78, 1–7.
<http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v78i1.307>
- Booyse, D.G., Dehority, B.A. & Reinighaus, B. (2014) Rumen ciliates in the African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*) living in the vicinity of the Orpen Gate entrance into Kruger National Park, South Africa. *Zootaxa*, 3846 (1), 138–144.
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3846.1.8>
- Bush, A.O., Laffert, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
<http://dx.doi.org/10.2307/3284227>
- Cedrola, F., Martinele, I., Rossi, M., Medeiros, G.R., Santos, G.R.A., Carvalho, F.F.R. & D'Agosto, M. (2014) Protozoários ciliados do rúmen de ovinos do nordeste brasileiro e infraciliatura de *Enoploplastron triloricatum* (Dogiel, 1925). *Principia*, 17, 71–79.
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R.J.P., Martinele, I. & D'Agosto, M. (2015) Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. *Zoological Science*, 32 (1), 8–15.
<http://dx.doi.org/10.2108/zs140125>
- Cunha, A.M. (1914) Sobre os ciliados do estômago dos ruminantes domésticos no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7, 139–145.
- D'Agosto, M. & Carneiro, M.E. (1999) Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 85, 725–729.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>
- D'Agosto, M. & Santa-Rosa, M.R. (1994) Aspectos morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. *Revista Brasileira de Zoologia*, 11, 215–

225.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751994000200005>

- Dehority, B.A. (1974) Rumen ciliate fauna of Alaskan Moose (*Alces americana*), Musk-ox (*Ovisbos moschastus*) and Dall Mountain Sheep (*Ovis dalli*). *Journal of Protozoology*, 21, 509–513.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03612.x>
- Dehority, B.A. (1978) Specificity of rumen ciliate protozoa in cattle and sheep. *Journal of Protozoology*, 25, 509–513.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb04177.x>
- Dehority, B.A. (1979) Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, 26, 536–544.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1979.tb04191.x>
- Dehority, B.A. (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures for counting rumen protozoa. *Applied Environmental Microbiology*, 48, 182–185.
- Dehority, B.A. (1986) Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: Occurrence of several ciliates new to the rumen, including the cyclospthid *Parentodinium africanum*. *Journal of Protozoology*, 33, 416–421.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05633.x>
- Dehority, B.A. (2003) *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, 372 pp.
- Dogiel, V.A. (1927) Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Archiv für Protistenkunde*, 59, 1–288.
- Fernandez-Galiano, D. (1979) Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorphida. *Transactions of the American Microscopical Society*, 98, 447–454.
<http://dx.doi.org/10.2307/3225730>
- Fernandez-Galiano, T., Serrano, S. & Fernandez-Galiano, D. (1985) General morphology and stomatogenesis of two species of the genus *Entodinium* (Ciliophora, Entodiniomorphida). *Acta Protozoologica*, 24, 181–186.
- Franzolin, R. & Dehority, B.A. (2010) The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 2262–2267.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001000023>
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1–9.
- Imai, S., Katsuno, M. & Ogimoto, K. (1978) Distribution of rumen ciliate protozoa in cattle, sheep and goat and experimental transfaunation of them. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 49, 494–505.
<http://dx.doi.org/10.2508/chikusan.49.494>
- Ito, A. & Imai, S. (2003) Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 34–42.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00103.x>
- Ito, A. & Imai, S. (2006) Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecoid ciliates. *Endocytobiosis and Cell Research*, 17, 103–110.
- Ito, A., Imai, S. & Ogimoto, K. (1994) Rumen ciliate composition and diversity of Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesien cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 56, 707–714.
- Ito, A., Miyazaki, Y. & Imai, S. (2002) Description of new *Parentodinium* ciliates in the Family Parentodiniidae n. fam. from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodiniomorphs in horse and cattle. *European Journal of Protistology*, 37, 405–426.
<http://dx.doi.org/10.1078/0932-4739-00828>
- Kofoid, C.A. & Christenson, J.F. (1933) Ciliates from *Bos gaurus* H. Smith. *University of California Publications in Zoology*, 33, 471–544.
- Kofoid, C.A. & MacLennan, R.F. (1930) Ciliates from *Bos indicus* Linn. I. The genus *Entodinium* Stein. *University of California Publications in Zoology*, 33, 471–544.
- Kofoid, C.A. & MacLennan, R.F. (1932) Ciliates from *Bos indicus*. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. *University of California Publications in Zoology*, 37, 53–152.
- Martinele, I. & D’Agosto, M. (2008) Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (Ciliophora: Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 451–455.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752008000300010>
- Martinele, I., Detoni, M.L., Rust, N.M. & D’Agosto, M. (2007) Protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no conteúdo do rúmen e do retículo de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 9, 63–66.
- Martinele, I., Santos, G.R.A., Matos, D.S., Batista, A.M.V. & D’Agosto, M. (2010) Diet botanical composition and rumen protozoa of sheep in brazilian semi-arid área. *Archivos de Zootecnia*, 59, 169–175.
<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922010000200002>
- Martinele, I., Siqueira-Castro, I.C.V. & D’Agosto, M. (2008) Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante com dois níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção e Animal*, 9, 74–81.
- Medeiros, G.R., Carvalho, F.F.R., Batista, A.M.V., Dutra Júnior, W.M., Santos, G.R.A., Andrade, K.B. (2009) Efeito dos níveis crescentes de concentrado sobre as características de carcaça de ovinos Morada Nova em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 718–727.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000400019>

- Mishima, T., Katamoto, H., Hori, Y., Kakengi, V.A.M. & Ito, A. (2009) 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*, 45, 77–86.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.002>
- Noirot-Timothee, C. (1960) Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structure et ultrastructures. *Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale*, 12, 526–718.
- Ogimoto, K. & Imai, S. (1981) *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press, Japan, 231 pp.
- Ríspoli, T.B., Lopes, I.R., Neto, R.G.M., Kazama, R., Prado, O.P.P., Zeoula, L.M. & Arcuri, P.B. (2009) Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 92–97.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000100013>
- Rossi, M. (2013) *Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de protistas ciliados (Ciliophora, Litostomatea) encontrados em ruminantes domésticos*. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 153 pp.
- Thurston, J.P. & Noirot-Timothee, C. (1973) Entodiniomorph ciliates from the stomach of *Hippopotamus amphibius*, with descriptions of two new genera and three new species. *Journal of Protozoology*, 20, 562–565.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1973.tb03574.x>
- Williams, A.G. & Coleman, G.S. (1992) *The Rumen Protozoa*. Springer, New York, 423 pp.

ANEXO 3

(Artigo aceito para publicação no periódico Zootaxa)

**Polymorphism and inconsistencies in the taxonomy of *Diplodinium anisacanthum*
da Cunha, 1914 (Ciliophora, Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) and
taxonomic notes on the genus *Diplodinium* Schuberg, 1888**

Franciane Cedrola, Isabel Martinele, Roberto Júnio Pedroso Dias, Marta D'Agosto

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e
Biologia Animal, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil*

1 **Polymorphism and inconsistencies in the taxonomy of *Diplodinium anisacanthum***
2 **da Cunha, 1914 (Ciliophora, Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae) and**
3 **taxonomic notes on the genus *Diplodinium* Schuberg, 1888**

4

5 FRANCIANE CEDROLA, ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS*, ISABEL
6 MARTINELE, MARTA D'AGOSTO

7

8 *Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e*
9 *Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de*
10 *Fora, Minas Gerais, Brasil. CEP 36036-900.*

11

12 *Corresponding autor. E-mail: rjuniodias@hotmail.com

1 **Abstract**

2 The genus *Diplodinium* includes 31 species of ophryoscolecid ciliates with two
3 retractable ciliary zones in the anterior end of the body, with no skeletal plates, inclined
4 macronucleus and two contractile vacuoles. They have a broad geographical distribution
5 and low host specificity. The genus has several taxonomic inconsistencies, mainly due
6 to polymorphism of most species. *Diplodinium anisacanthum* is a case of taxonomic
7 inconsistency in the genus. It presents polymorphism in posterior end of the body, so it
8 is considered a polymorphic species or seven distinct species. This study presents the
9 morphological characterization of six *D. anisacanthum* morphotypes based on general
10 morphology, morphometric analysis and oral infraciliature characterization and
11 taxonomic notes on the genus *Diplodinium*. The morphological and morphometric
12 characterization of *D. anisacanthum* showed great similarities among morphotypes
13 suggesting that these ciliates constitute a single species with polymorphisms. A brief
14 review conducted highlights the inconsistencies in the taxonomy of the genus
15 *Diplodinium* and demonstrates the need for recent studies with representatives of the
16 genus. There is no information on how polymorphism of *Diplodinium anisacanthum*
17 morphotypes correlates to molecular data, since there are only two sequences of this
18 species available in the GenBank database.

19

20 **Key-words:** ophryoscolecid ciliates, polymorfism, rumen, *Diplodinium*.

1 **Introduction**

2 The genus *Diplodinium* Schuberg, 1888 was established to include species of
3 ophryoscolecid ciliates with two retractable ciliary zones in the anterior end of the body,
4 without skeletal plates; rod-shaped macronucleus, wide anteriorly and inclined about 30
5 – 90°; and two contractile vacuoles (Kofoid & MacLennan 1932). Most species of this
6 genus have wide geographic distributions and have been recorded at high densities in
7 several ruminant host species (Williams & Coleman 1992). Currently, genus
8 *Diplodinium* presents 31 species and exhibits inconsistencies because the character used
9 for species delimitation are somewhat plastic. This highlights the necessity of a
10 taxonomy review of the Ophryoscolecidae.

11 Polymorphism in the family Ophryoscolecidae has been reported in some
12 species (Poljansky & Strelkow 1938; Latteur 1966; Coleman & Williams 1992; Imai *et*
13 *al.* 2002; Martinele & D'Agosto 2008), and related most to the morphology of the
14 posterior end of the body. Previous authors used the number of caudal spines as
15 diagnostic feature, which generates some ambiguity. *Diplodinium anisacanthum* da
16 Cunha, 1914 is a remarkable example of taxonomic inconsistency caused by the use of
17 the variable number of spines at the posterior end of the body. Hitherto, it has been
18 considered either a polymorphic species (Imai *et al.* 1981; Shimizu *et al.* 1983; Ito *et al.*
19 1994; Guirong *et al.* 2000; Gurung *et al.* 2002; Booyse & Dehority 2011; Booyse *et al.*
20 2014), or even seven distinct species (Kofoid & Christenson 1933; Dehority 1979;
21 1986; Clarke 1964; Baraka 2012).

22 In a previous inventory of rumen ciliated protozoa from Brazilian sheep (*Ovis*
23 *aries* L.) (Cedrola *et al.* 2016), we observed the presence of six *Diplodinium*
24 *anisacanthum* morphotypes. In this study, we present the morphological

1 characterization of these six morphotypes and taxonomic notes on the genus

2 *Diplodinium*.

3

4 **Material and Methods**

5 Rumen samples were obtained from 16 domestic sheep (*Ovis aries* L.) kept in

6 Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. For

7 details, see Cedrola *et al.* (2016). Each sample consisted of 20 cm³ of rumen contents

8 fixed in formalin 18.5% (Dehority 1984). The species identification was based on

9 previous descriptions of Dogiel (1927); Kofoid & MacLennan (1932) and Kofoid &

10 Christenson (1933). Morphometry was based on specimens stained with Lugol's

11 solution (D'Agosto & Carneiro 1999), using the software Image-Pro Plus 6.0. The

12 orientation of ciliates for description followed Dogiel (1927). The impregnation of

13 infraciliary bands was made by silver carbonate impregnation (Ito & Imai 2006; Cedrola

14 *et al.* 2015). The term polybrachykinety refers to infraciliary bands composed of

15 numerous, small, and parallel kineties (Fernandez-Galiano 1979). The drawing of

16 *Diplodinium anisacanthum* morphotype *anisacanthum* in vivo was made after free hand

17 sketching during observation of the specimen under an Olympus BX51 microscope

18 equipped with differential interferential contrast. The diagrams of the oral infraciliature,

19 nuclear apparatus and caudal projections are made with aid of a drawing device, and

20 were based on silver impregnated specimens.

21

22 **Results and Discussion**

23 **Morphology of *Diplodinium anisacanthum* (Figure 1; Table 1)**

24 The six *Diplodinium anisacanthum* morphotypes (*monacanthum*, *diacanthum*,

25 *triacanthum*, *tetracanthum*, *pentacanthum* and *anisacanthum*) have an oval body,

1 laterally compressed, and tapered posteriorly. Two retractable ciliary zones (Figure 1a),
2 one adoral and one dorsal, at anterior end of body, separated by an inconspicuous
3 operculum. Ectoplasm extending beyond of the body and forms 1-6 caudal spines,
4 according from morphotype (Figure 1d). *Diplodinium anisacanthum* morphotype
5 *monacanthum* with one caudal spine; *Diplodinium anisacanthum* morphotype
6 *diacanthum* two; *Diplodinium anisacanthum* morphotype *triacanthum* three;
7 *Diplodinium anisacanthum* morphotype *tetracanthum* four; *Diplodinium anisacanthum*
8 morphotype *pentacanthum* five and *Diplodinium anisacanthum* morphotype
9 *anisacanthum* six (Figure 1e-j). Endoplasm with many food particles, essentially plant
10 material. Macronucleus, rod-shaped, wide anteriorly, inclined about 90° towards ventral
11 region (Figure 1b). The elliptical micronucleus is in a depression in the dorsal anterior
12 surface of the macronucleus (Figure 1b). Two contractile vacuoles, each with a dorsally
13 opening excretory pore (Figure 1a). Rectum is a small and tubular structure located in
14 the posterior end of the body, where cytoproct opens (Figure 1a).

15 Oral infraciliature corresponding to the Diplodinium-type (Ito & Imai 2006)
16 (Figure 1e-j). This pattern consists of an adoral polybrachykinety (AP), vestibular
17 polybrachykinety (VP), a dorsal polybrachykinety (DP) and paralabial kineties (PK).
18 AP involves the buccal opening; VP is long and extends into vestibule, if originating
19 internally by the dorsal side of AP. DP extending laterally along dorsal anterior side of
20 the body. Four or five PK close to ventral portion of AP. All *D. anisacanthum*
21 morphotypes show the same pattern and organization of infraciliary bands (Figure 1c).

22 *Diplodinium anisacanthum* was described by da Cunha (1914) from Brazilian
23 cattle and sheep. Dogiel (1927), in his monograph of family Ophryoscolecidae renamed
24 the species described by da Cunha (1914) as *Diplodinium (Anoplodinium) denticulatum*
25 f. *anisacanthum*, and described six other subspecies that differed from the first in the

1 number of caudal spines [*D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *anacanthum*, *D.*
2 (*Anoplodinium) denticulatum* f. *monacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f.
3 *diacanthum*, *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *triacanthum*, *D. (Anoplodinium)*
4 *denticulatum* f. *tetracanthum* and *D. (Anoplodinium) denticulatum* f. *pentacanthum*].
5 Kofoid & MacLennan (1932) in their *Diplodinium* taxonomic review, raised to the
6 species level the subspecies proposed by Dogiel, using the following names: *D.*
7 *anisacanthum*, *D. anacanthum*, *D. monacanthum*, *D. diacanthum*, *D. triacanthum*, *D.*
8 *tetracanthum* and *D. pentacanthum*. Latteur (1970) considered *Diplodinium*
9 *anisacanthum* as a species with polymorphisms [*D. anisacanthum* f. *anacanthum*, *D.*
10 *anisacanthum* f. *monacanthum*, *D. anisacanthum* f. *diacanthum*, *D. anisacanthum* f.
11 *triacanthum*, *D. anisacanthum* f. *tetracanthum*, *D. anisacanthum* f. *pentacanthum* and
12 *D. anisacanthum* f. *anisacanthum*]. Hence, due to the different taxonomic
13 interpretations of the features of the posterior end of the body, *Diplodinium*
14 *anisacanthum* morphotypes are regarded as a polymorphic species and classified as
15 subspecific level (Imai *et al.* 1981; Shimizu *et al.* 1983; Ito *et al.* 1994; Guirong *et al.*
16 2000; Gurung *et al.* 2002; Booyse & Dehority 2011; Booyse *et al.* 2014), or as seven
17 species (Kofoid & Christenson 1933; Dehority 1979; 1986; Clarke 1964; Baraka 2012).

18 Although those *Diplodinium* ciliates have been elevated to the species level by
19 Kofoid & MacLennan (1932), the possibility of being a single, polymorphic species
20 raised by Dogiel (1927) and later by Latteur (1970), is considerable, because the
21 morphotypes are almost identical, differing only in the number of caudal spines (Figure
22 1; Table 1).

23 According to the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999)
24 different *Diplodinium anisacanthum* morphotypes should be classified as subspecies,
25 since they were described before 1960. Thus, in this study we propose to rename them:

1 *Diplodinium anisacanthum monacanthum*, *Diplodinium anisacanthum diacanthum*,
2 *Diplodinium anisacanthum triacanthum*, *Diplodinium anisacanthum tetracanthum*,
3 *Diplodinium anisacanthum pentacanthum* and *Diplodinium anisacanthum*
4 *anisacanthum*.

5 Caudal projections are used as species diagnostic feature in family
6 Ophryoscolecidae by several authors following the taxonomic classification proposed
7 by Kofoid & MacLennan (1932) (Kofoid & Christenson 1933; Dehority 1979; 1986;
8 Clarke 1964; Baraka 2012). However, according Latteur (1966; 1970) many species of
9 ophryoscolecid ciliates present considerable polymorphism and this profoundly
10 influences the morphology of the posterior end of the body. Latteur (1966; 1970)
11 suggests that variations in caudal projections should not be used in the species diagnosis
12 in family Ophryoscolecidae because often constitute intraspecific variation.

13 Polymorphism in ophryoscolecid ciliates was reported by some authors and to be
14 influenced by factors such as interactions between the ciliates, especially those of
15 predation and cannibalism (Poljansky & Strelkow 1938; Latteur 1966; Martinele &
16 D'Agosto 2008). Williams & Coleman (1992) reported that in monoclonal cultures,
17 spines in *Diplodinium pentacanthum* gradually become smaller, tending to disappear,
18 suggesting that environmental factors possibly determine the presence and number of
19 caudal projections.

20 Williams & Coleman (1992) observed that caudal projections in *Entodinium*
21 *caudatum* Stein, 1858 are lost in monoclonal cultures. However, the insertion of
22 *Entodinium bursa* Stein, 1858 in the culture promotes the emergence of caudal
23 projections in *E. caudatum*, which may be related to the fact that *E. bursa* be the main
24 predator of *E. caudatum*. The author suggests that the presence of the spine decreases

1 predation, whereas *E. bursa* engulfs *E. caudatum* by the posterior region, thus the spine
2 difficults the process.

3 Imai *et al.* (2002) studied transfaunation processes and establishment of
4 *Diplodinium rangiferi* Dogiel, 1925 between wild ruminants (*Cervus nippon centralis*
5 Kishida, 1936) and domestic cattle (*Bos taurus* L.). Inoculate specimens of *D. rangiferi*
6 without caudal spines for the rumen of deer for the rumen of calves, after two weeks of
7 inoculation, noticed the presence of *D. rangiferi* with caudal projections in calves.

8 There is no information on how polymorphism of *Diplodinium anisacanthum*
9 correlates to molecular data, since there are only two sequences of this species available
10 in the GenBank database.

11

12 **Taxonomic notes on the genus *Diplodinium* Schuberg (Figure 2-28, Table 2)**

13 The genus *Diplodinium* was established by Schuberg (1888) to include species of
14 ophryoscolecid ciliates with a dorsal ciliary zone in addition to adoral ciliary zone. The
15 genus *Entodinium* had been previously established by Stein (1858) to include
16 ophryoscolecid ciliates presenting a single ciliary zone. Crawley (1923) considering that
17 ciliates belonging to *Diplodinium* should be those with present adoral and dorsal ciliary
18 zones in the same body plan, establishing the genus *Epidinium*, to include species of
19 ophryoscolecid ciliates with ciliary zones in two different planes.

20 Dogiel (1927) divided *Diplodinium* into four subgenera: *Anoplodinium* (without
21 skeletal plates and with two contractile vacuoles), *Eudiplodinium* (one or two skeletal
22 plates and two contractile vacuoles) *Polyplastron* (five skeletal plates and numerous
23 contractile vacuoles) and *Ostracodinium* (broad skeletal plate and two to six contractile
24 vacuoles). Kofoid & MacLennan (1932) reformulated the taxonomy proposed by Dogiel

1 (1927). The authors raised to the genus level some of subgenera proposed by Dogiel
2 (1927) and created seven new genera.

3 The subgenus *Anoplodinium* was divided into two genera, genus *Eodinium*
4 Kofoid & MacLennan, 1932 and genus *Diplodinium* Schuberg, 1888, differing in
5 macronucleus shape. The genus *Eodinium*, with rod-shape macronucleus and
6 *Diplodinium*, with inclined macronucleus. Because of these taxonomic modifications,
7 Kofoid & MacLennan (1932) proposed a new diagnosis for *Diplodinium*:
8 "Ophryoscolecidae with dorsal membranelle zone on the same level of the adoral zone;
9 the skeletal plates no present; macronucleus beneath right surface of the body; the
10 anterior third of the dorsal surface of the macronucleus ventrally bent at an angle of 30 -
11 90°; two contractile vacuoles present". This is the current diagnosis used to characterize
12 *Diplodinium* ciliates.

13 Due to the considerable number of described species for the genus *Diplodinium*,
14 and the fact that they show great morphological similarity, Kofoid & MacLennan
15 (1932) separated the *Diplodinium* species into five "groups": *dentatum*-group (wide
16 posterior end and five to six caudal spines); *bubalidis*-group (small longitudinal groove
17 extending anteriorly, a short distance from the anus); *rangiferi*-group (distinct,
18 longitudinal line running the length of the dorsal edge of the right lateral surface);
19 *crista-galli*-group (roughly triangular outline, truncated anteriorly, and tapered
20 posteriorly) and *anacanthum*-group (posterior end tapered and zero to six caudal
21 spines). However, this division into groups is not widely used in current taxonomic
22 studies and *Diplodinium* species described after the year 1932 have not been included in
23 these groupings (Imai 1988; 1992). Future molecular studies may investigate validity of
24 this proposal.

1 Lateur (1970) revised the genus *Diplodinium* recognizing 20 species, among
2 which the species previously classified in *Eodinium*: *E. rectangulatum* Kofoid &
3 MacLennan, 1932 and *E. posterovesiculatum* (Dogiel, 1925) (the called *Diplodinium*
4 *rectangulatum* and *D. posterovesiculatum*). Also, disconsider some species previously
5 described and classified other two as dubious: *Diplodinium polygonale* (Dogiel, 1925)
6 and *D. komareki* Kubikova, 1935 due to lack of information in their descriptions.
7 Although Lateur (1970) has invalidated the genus *Eodinium*, in a recent study Ito and
8 Imai (2003) demonstrated that *Eodinium posterovesiculatum* has infraciliary
9 arrangement exceptional in family Ophryoscolecidae, suggesting the validity of the
10 genus.

11 Regarding doubtful species, *Diplodinium polygonale* was morphologically
12 characterized in detail by Ito & Imai (2005) and classified in the genus *Diplodinium*.
13 However, the authors highlighted the morphology peculiarities of the species
14 designating it as an "atypical *Diplodinium*". The species *Diplodinium komareki* was not
15 again seen after the original description (Kubikova 1935), requiring new data on the
16 morphology of the species to determine its position as a *Diplodinium*, since the position
17 of the micronucleus (ventral to macronucleus) in this species is a common feature of
18 *Entodinium* ciliates (Figure 16).

19 Currently, genus *Diplodinium* is represented by 31 species identified as length
20 and width of the body, morphology and biometry of the nuclear apparatus and the
21 number and morphology of the caudal projections. In this study, are presented
22 schematic drawings and data from morphology / morphometry of the species (Figure 2-
23 28, Table 2). The morphology and number of caudal projections has relative taxonomic
24 importance among congeners of *Diplodinium*. In some cases, the morphology of the
25 posterior end of the body is species diagnostic character, in other, is subspecies

1 diagnostic character and in other cases is ignored as diagnostic character, which
2 promotes confusion in the taxonomy of the genus. However, according Latteur (1966;
3 1970) caudal projections must not be used in the diagnosis of ophryoscolecoid species,
4 since these are considerable polymorphism that influences profoundly the morphology
5 of the posterior end of the body. Thus, the author suggests that variations in caudal
6 projections are intraspecific variation.

7 *Diplodinium dentatum* Schuberg, 1888 and *D. quinquespinosum* Dogiel, 1927
8 presenting very similar general morphology and only differ in the number of caudal
9 projections (*D. dentatum* has six caudal projections and *D. quinquespinosum* has five)
10 (Figure 2 and 26) and are classified as two species and not as a polymorphic species.

11 *Diplodinium bubalidis* Dogiel, 1925, *D. consors* Dogiel, 1925, *D. crista-galli*
12 Dogiel, 1927, *D. flabellum* Kofoid & MacLennan, 1932, *D. mahidoli* Ogimoto & Imai,
13 1983 and *D. zambiense* Imai et al., 1992 in turn, also have similar general morphology
14 and variations in caudal projections, but are considered polymorphic and their variations
15 are classified as "forms". For example, the species *Diplodinium bubalidis* (Figure 7a-b)
16 has two "forms", designated as: *Diplodinium bubalidis* forma *bubalidis* and
17 *Diplodinium bubalidis* forma *aspinosum* according to presence and absence of caudal
18 projections.

19 There are also *Diplodinium africanum* Imai, 1988, *D. leche* Imai et al., 1992 and
20 *D. rangiferi* Dogiel, 1925 (Figure 3a-b; 18a-b and 27a-b) that show, each one, variations
21 in the morphology of the posterior end of the body, but are classified as a single species,
22 and their different morphotypes are not named.

23 The problems in the taxonomy of the genus are not only observed in the analysis
24 of polymorphism of the posterior end of the body. There are also *Diplodinium* species
25 that are not covered by the diagnosis of the genus proposed by Kofoid & MacLennan

1 (1932) for not having the inclined macronucleus at an angle of 30 – 90°, the species:
2 *Diplodinium nanum* Imai, 1988, *D. leche*, *D. polygonale* Dogiel, 1925 and *Diplodinium*
3 *babici* Wertheim, 1933.

4 *Diplodinium leche* (Figure 18a-b), *D. nanum* (Figure 23) and *D. polygonale*
5 (Figure 24) are considered atypical species of the genus *Diplodinium*, since they have
6 small body dimensions (length < 60 µm), the spherical macronucleus (*Diplodinium*
7 *polygonale*) or rod-shape macronucleus (*Diplodinium leche* and *D. nanum*) and not
8 shared oral infraciliature pattern with any other group of ophryoscolecid ciliates (Ito &
9 Imai 2005). Because of these unique characteristics, it is possible that in future
10 molecular studies, these species do not group together with other representatives of the
11 genus *Diplodinium*. The species *Diplodinium babici* Wertheim (Figure 6) has only two
12 records in the literature (Wertheim 1933; 1935), requiring data on their morphological
13 and molecular aspects to check its position as a *Diplodinium*.

14 Another problem noted in *Diplodinium* taxonomy is in relation to species with
15 only one contractile vacuole and are also not included in the diagnosis proposed by
16 Kofoid & MacLennan (1932), the species: *Diplodinium archon* Latteur, 1960 (Figure
17 5), *D. flabellum* Kofoid & MacLennan, 1932 (Figure 14a-d) and *D. polygonale* (Figure
18 24).

19 All these taxonomic problems demonstrate the need for more detailed studies of
20 the species belonging to the genus *Diplodinium*. Studies characterizing the species
21 multidisciplinary would be most appropriate, since most species has been described
22 based on only a morphological technique, often through observations in vivo or with the
23 ciliated fixed in formaldehyde or MFS solution (Dehority 1979 1986; Imai 1986, 1988;
24 Imai & Ogimoto 1983; Imai et al. 1981; Ito et al. 1994; Booyse et al. 2014). However,
25 according Cedrola et al. (2015) detailed descriptions of rumen ciliates usually require at

1 least staining with Lugol's solution and impregnation by silver carbonate; and live
2 observation, staining with MFS solution, Protargol impregnation, and scanning electron
3 microscopy expand the number of morphological characters to be used in taxonomy of
4 this group.

5 Another important approach needed in *Diplodinium* ciliates is the cultivation of
6 species of this genus to better understand intra and interspecific polymorphisms.

7 Molecular studies using molecular markers for phylogenetic studies and molecular
8 markers consistent with genetic populations studies already done for other groups of
9 ciliates (Gentekaki & Lynn 2009; Zhao et al. 2013) will be extremely useful for better
10 organization of the systematic of the genus *Diplodinium*.

11

12 **Acknowledgments**

13 This work was partially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
14 Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
15 Tecnológico (CNPq, Edital Universal), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
16 de Minas Gerais (FAPEMIG). CNPq provided research grant to Marta D'Agosto and
17 Roberto Júnio Pedroso Dias (Bolsa de Produtividade PQ). We thank Dr. Geovergue
18 Rodrigues de Medeiros and Universidade Federal Rural de Pernambuco for samples of
19 rumen contents, Dr. Burk Dehority for sending the material used in taxonomic review
20 and Ricardo Cazetta Menzer and Dr. Thiago da Silva Paiva for his assistance in editing
21 the English language.

22

23 **References**

24 Banerjee, A.K. (1955). Studies on parasitic ciliates from Indian ruminants. *Proceeding*
25 *of the Zoological Society*, 8, 446–452.

- 1 Baraka, T.A. (2012). Comparative studies of rumen pH, total protozoa, generic and
2 species composition of ciliates in Camel, Buffalo, Sheep and Goat in Egypt.
3 *Journal of American Science*, 8, 655–669.
- 4 Booyse, D.G. & Dehority, B.A. (2011) Rumen protozoa in South African sheep with a
5 summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. *Onderstepoort Journal*
6 *of Veterinary Research*, 78, 1–7.
- 7 Booyse, D.G., Dehority, B.A. & Reinighaus, B. (2014) Rumen ciliates in the African
8 (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*) living in the vicinity of the Orpen Gate
9 entrance into Kruger National Park, South Africa. *Zootaxa*, 1, 138–144.
- 10 Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R.J.P., Martinele, I. & D’Agosto, M. (2015) Methods for
11 taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review.
12 *Zoological Science*, 32 (1), 8–15.
- 13 Cedrola, F., Martinele, I., Dias, R.J.P., Fregulia, P. & D’Agosto, M. (2016) Rumen
14 ciliates in Brazilian sheep, with new records and redescription of *Entodinium*
15 *contractum* (Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae). *Zootaxa*, 4088, 292–300.
- 16 Clarke, R.T.J. (1964). Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). New
17 *Zeland Journal of Agricultural Research*, 7, 248–257.
- 18 Crawley, H. (1923). Evolution in the family Ophryoscolecidae. *Proceedings of the*
19 *National Academy of Natural Science*, 75, 393–412.
- 20 Cunha, A.M. da (1914) Sobre os ciliados do estômago dos ruminantes domésticos no
21 Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7, 139–145.
- 22 D’Agosto, M. & Carneiro, M.E. (1999) Evaluation of lugol solution used for counting
23 rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 85, 725–729.
- 24 Dehority, B.A. (1979) Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus*
25 *bubalis* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, 26, 536–544.

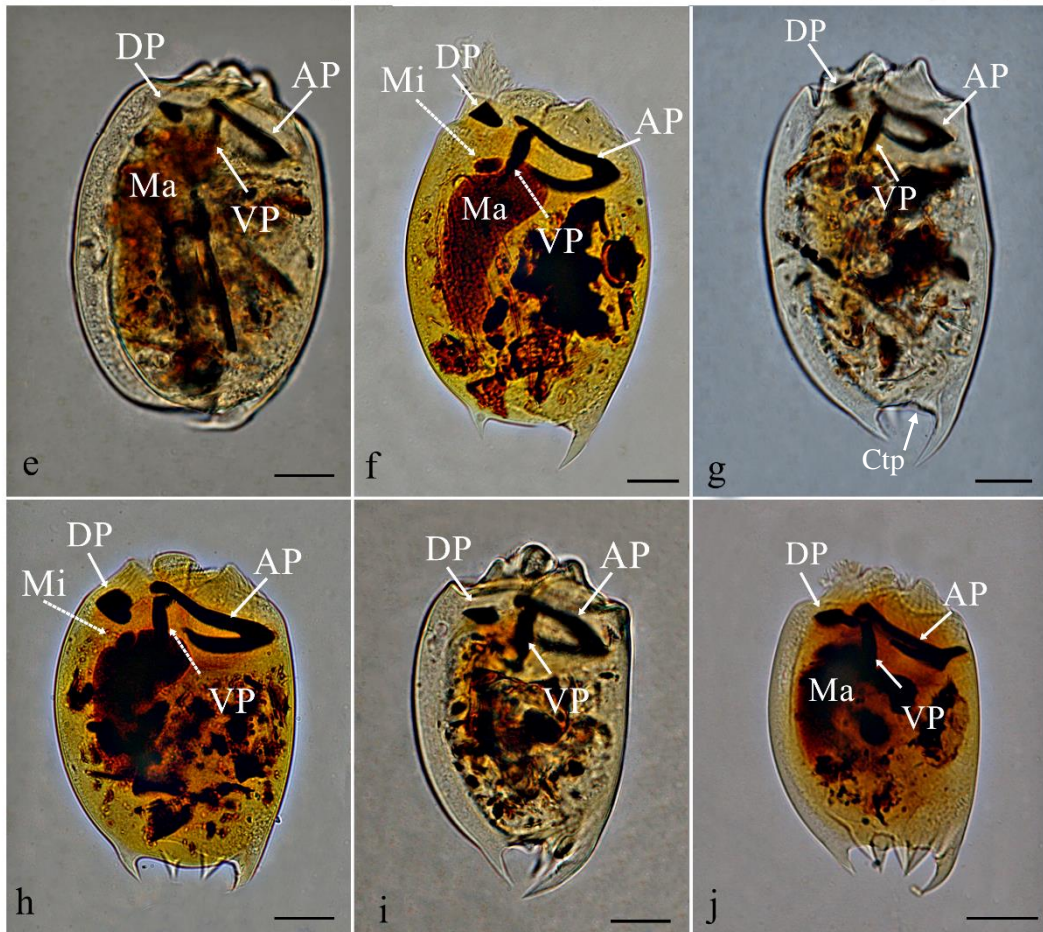
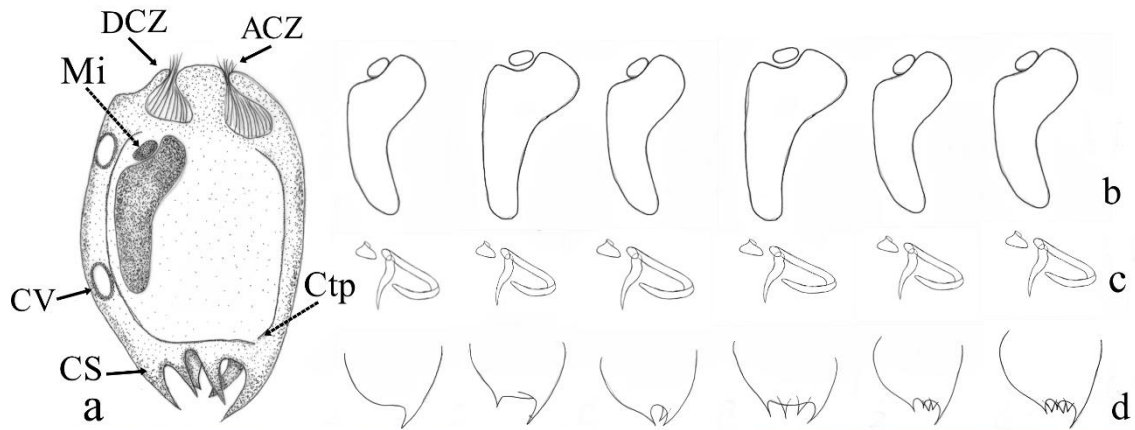
- 1 Dehority, B.A. (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures for counting
2 rumen protozoa. *Applied Environmental Microbiology*, 48, 182–185.
- 3 Dehority, B.A. (1986) Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: Occurrence of
4 several ciliates new to the rumen, including the cyclopothid *Parentodinium*
5 *africanum*. *Journal of Protozoology*, 33, 416–421.
- 6 Dogiel, V.A. (1925). Nouveaux infusiores de la famille de *Ophryoscolecidae* parasites
7 d' antilopes africaines. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 3, 116–
8 142.
- 9 Dogiel, V.A. (1927) Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Archiv für*
10 *Protistenkunde*, 59, 1–288.
- 11 Fernandez-Galiano, D. (1979) Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate
12 *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the
13 Bursariomorphida. *Transactions of the American Microscopical Society*, 98, 447–
14 454.
- 15 Gentekaki, E. & Lynn, D.H. (2009). High-level genetic diversity but not population
16 structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the Peritrichous ciliate
17 *Carchesium polypinum* in the Grand River Basin (North America). *Applied and*
18 *Environmental Microbiology*, 75, 3187-3195.
- 19 Guirong, N-R. S.; Hua, Z.X.; Zhu, S.; Imai, S. (2000). Rumen ciliated fauna of the Yak
20 (*Bos grunniens*) in China with the description of *Entodinium monuo* n. sp. *The*
21 *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 178–182.
- 22 Gurung, Y. B. Parajuli, N.; Miyazaki, Y.; Imai, S.; Kobayashi, K. (2002). Rumen ciliate
23 faunae of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) and Goat (*Capra hircus*) in Nepal.
24 *Journal of Veterinary and Medicine Science*, 64, 265–267.

- 1 Imai, S. (1986). Rumen ciliate protozoal fauna of zebu cattle (*Bos taurus indicus*) in Sri
2 Lanka, with description of a new species, *Diplodinium sinhalicum* sp. nov.
3 *Zoological Science*, 3, 699–706.
- 4 Imai, S. (1988). Ciliate protozoa in the rumen of kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*,
5 with description of four new species. *Journal of Protozoology*, 35, 130–136.
- 6 Imai, S.; Tsutsumi, Y.; Yumura, S.; Mulenga, A. (1992). Ciliate protozoa in the rumen
7 of Kafue Lechwe, *Kobus Leche kafuensis*, in Zambia, with description of four new
8 species. *Journal of Protozoology*, 564–572.
- 9 Imai, S. & Ogimoto, K. (1983). *Parabundleia ruminantium* gen. n. sp. n., *Diplodinium*
10 *mahidoli* sp. n. with two formae and *Entodinium parvum* forma *monospinosum*
11 forma n. from the zebu cattle (*Bos indicus*, 1758) in Thailand. *Japanese Journal of*
12 *Veterinary Science*, 45, 585–591.
- 13 Latteur, B. (1966). *Diplodinium archon* n. sp. Ciliate Ophryoscolecidae du rumen de
14 l'antelope *Tragelaphus scriptus* Pallas. *Annales de la Societé Belge de Médecine*
15 *Tropicale*, 46, 727–740.
- 16 ICNZ (1999). International Code of Zoological Nomenclature. 5th ed. London: The
17 International Trust for Zoological Nomenclature, 306 p.
- 18 Imai, S.; Chang, C-H; Wang, J-S; Ogimoto, K; Fujita, J. (1981). Rumen ciliate
19 protozoal fauna of the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) in Taiwan. *Bulletin of*
20 *Nippon Veterinary and Zootechnical College*, 29, 77–81.
- 21 Imai, S.; Matsumoto, M.; Watanabe, A.; Sato, H. (2002). Establishment of a spinated
22 type of *Diplodinium rangiferi* by transfaunation of rumen ciliates of Japanese Sika
23 Deer (*Cervus nippon centralis*) to the rumen of two Japanese Shorthorn Calves
24 (*Bos taurus taurus*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 1–41.

- 1 Ito, A. & Imai, S. (2003) Light microscopical observation of infraciliary bands of
2 *Eodinium posterovesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and
3 *Diplodinium dentatum*, 50, 34–42.
- 4 Ito, A. & Imai, S. (2005). Infraciliature and morphogenesis in three rumen *Diplodinium*
5 ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche*, and *Diplodinium nanum*
6 observed by light microscopy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 44–41.
- 7 Ito, A. & Imai, S. (2006) Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates.
8 *Endocytobiosis and Cell Research*, 17, 103–110.
- 9 Ito, A., Imai, S., Ogimoto, K. (1994) Rumen ciliate composition and diversity of
10 Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesien cattle. The
11 *Journal of Veterinary Medical Science*, 56, 707–714.
- 12 Kofoid, C.A. & Christenson, J.F. (1933) Ciliates from *Bos gaurus* H. Smith. *University*
13 *of California Publications in Zoology*, 33, 471–544.
- 14 Kofoid, C.A. & MacLennan, R.F. (1932) Ciliates from *Bos indicus*. II. The genus
15 *Diplodinium* Schuberg. *University of California Publications in Zoology*, 37, 53–
16 152.
- 17 Kubikova, M. (1935). Infusorien aus dem Pansen von *Cervus elaphus*. *Zoologischer*
18 *Anzeiger*, 111, 175–177.
- 19 Latteur, B. (1966). Contribution à la systématique de la famille Ophryoscolecidae
20 Stein. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 96, 117–144.
- 21 Latteur, B. (1970). Révision systématique de la famille des Ophryoscolecidae Stein,
22 1858. Sous famille des Diplodiniinae Lubinsky, 1957. Genre *Diplodinium*
23 (Schuberg, 1888) sensu novo. *Annales de la Société Royale Zoologique de*
24 *Belgique*, 100, 215–312.

- 1 Martinele, I. & D'Agosto, M. (2008) Predação e canibalismo entre protozoários ciliados
2 (Ciliophora: Entodiniomorpha: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis*
3 *aries*). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 451–455.
- 4 Moriggi, M. (1941). Ricerche sugli infusori dei ruminanti italiani. *Archivio Zoologico*
5 *Italiano*, 29, 369–412.
- 6 Noirot-Timothee, C. (1959). *Diplodinium moucheti* n.sp. Remarques sur l'evolution des
7 *Ophryoscolecidae* en Afrique. *Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie*
8 *Animale*, 1, 331–337.
- 9 Noirot-Timothee, C. (1963). Sur les ciliés du rumen de *Giraffa camelopardalis* L.
10 *Comptes Rendus de l'Academie des Science*, 256, 5400–5401.
- 11 Poljansky, G. & Strelkow, A. (1938). Étude expérimentale sur la variabilité de quelques
12 Ophryoscolécidés. *Archives de Zoologie Expérimentale e Générale*, 80, 1–123.
- 13 Ogimoto, K. & Imai, S. (1981) *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies
14 Press, Japan, 231 pp.
- 15 Schuberg, A. (1888). Die Protozoen des Wiederkauermagens. *Zoologische Jahrbücher*
16 *Abteilung für Systematik Oekologie und Geographie der Tiere*, 3, 365–418.
- 17 Shimizu, M.; Kinoshita, M; Fujita, J.; Imai, S. (1983). Rumen ciliate protozoal fauna
18 and composition of the Zebu Cattle, *Bos indicus*, and Water Buffalo, *Bubalus*
19 *bubalis*, in Philippines. *Bulletin of Nippon Veterinary and Zootechnical College*,
20 32, 83–88.
- 21 Stein, F. (1858). Über mehrere neue im Pansen der Widerkiiuer lebende Infusionstiere.
22 *Abhandlungen der k. Bohmischen Gesellschaft der Wissenschaften*, 10, 69–70.
- 23 Wertheim, P. (1933). Ein Beitrag zu den Untersuchungen tiber die
24 Ophryoscolescidenfauna aus dem Magen von *Capra ibex* L. *Zoologischer Anzeiger*,
25 104, 15–25.

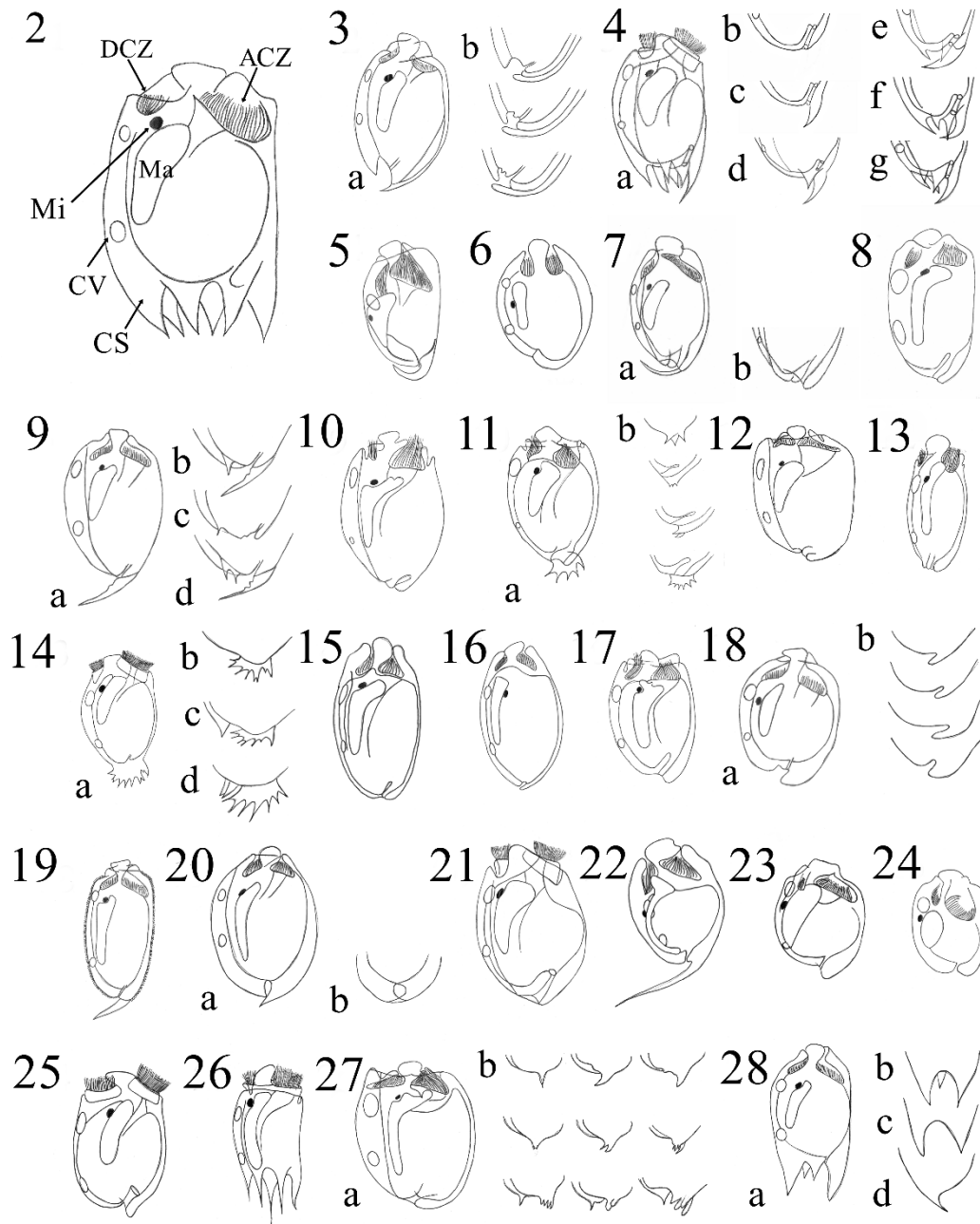
- 1 Wertheim, P. (1935). Infusorien aus dem Widerkauermagen von Gebiete Jugoslawiens
2 nebst einer Übersicht dieser Tierchen von BalkanhalbinselBereich und ein kurzer
3 Bericht tiber die ferdedarminfusorien, zugleich Revision der Familie
4 Ophryoscolecidae. *Veterinarski Archiv*, 5, 386–536.
- 5 Williams, A.G. & Coleman, G.S. (1992) *The Rumen Protozoa*. Springer, New York,
6 423 pp.
- 7 Zhao, Y.; Gentekaki, E.; Yi, Z.; Lin, X. (2013). Genetic differentiation of the
8 mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene in genus *Paramecium* (Protista,
9 Ciliophora). *Plos One*, 8, 1-8.



1

2 **Figure 1.** Six morphotypes of *Diplodinium anisacanthum* da Cunha, 1914 reported in
 3 Brazilian sheep (*Ovis aries* L.) **a.** *D. anisacanthum anisacanthum*, schematic drawing
 4 based on specimen stained with Lugol's solution; **b-d:** schematic drawings of nuclear
 5 apparatus (b), infraciliary bands (c) and caudal projections (d). **e-j.** specimens after
 6 silver carbonate impregnation. **e.** *D. anisacanthum monacanthum*; **f.** *D. anisacanthum*
 7 *diacanthum*; **g.** *D. anisacanthum triacanthum*; **h.** *D. anisacanthum tetraacanthum*; **i.** *D.*

- 1 *anisacanthum pentacanthum*; **j.** *D. anisacanthum anisacanthum*. AP: adoral
- 2 polybrachykynety; ACZ: adoral ciliary zone; CS: caudal spine; Ctp: cytoproct; CV:
- 3 contractile vacuole; DCZ: dorsal ciliary zone; DP: dorsal polybrachykynety; Ma:
- 4 macronucleus; Mi: micronucleus; VP: vestibular polybrachykynety. Bars: 20 μm .



1

2 **Figure 2-28.** Schematic drawings of the species described in genus *Diplodinium*
 3 Schuberg based on the original description. **2.** *Diplodinium dentatum*, type species of
 4 the genus; **3.** *D. africanum* **a-b.** polymorphism in the posterior end of the body; **4.**
 5 *Diplodinium anisacanthum*; **a.** *anisacanthum*; **b.** *anacanthum*; **c.** *monacanthum*; **d.**
 6 *diacanthum*; **e.** *triacanthum*; **f.** *tetracanthum*; **g.** *pentacanthum*; **5.** *D. archon*; **6.** *D.*
 7 *babici*; **7. a.** *D. bubalidis* f. *bubalidis*; **b.** *D. bubalidis* f. *aspinosum*; **8.** *D. cameli*; **9. a.**

1 *D. consors* f. *consors*; **b.** *D. consors* f. *spinulosum*; **c.** *D. consors* f. *hamulosum*; **d.** *D.*
2 *consors* f. *bispinulosum*; **10.** *D. costatum*; **11.** *D. crista-galli* **a-b.** polymorphism in the
3 posterior end of the body; **12.** *D. dogieli*; **13.** *D. elongatum*; **14.** **a.** *D. flabellum* f.
4 *flabellum*; **b.** *D. flabellum* f. *aspinatum*; **b.** *D. flabellum* f. *monospinatum*; **c.** *D.*
5 *flabellum* f. *laterospinatum*; **15.** *D. italicum*; **16.** *D. komareki*; **17.** *D. laeve*; **18.** *D. leche*
6 **a-b.** polymorphism in the posterior end of the body; **19.** *D. lochinvarense*; **20.** **a.** *D.*
7 *mahidoli* f. *mahidoli* **b.** *D. mahidoli* f. *bispinosum*; **21.** *D. minor*; **22.** *D. moucheti*; **23.**
8 *D. nanum*; **24.** *D. polygonale*; **25.** *D. psittaceum*; **26.** *D. quinquespinosum*; **27.** *D.*
9 *rangiferi* **a-b.** polymorphism in the posterior end of the body; **28.** **a.** *D. zambiense* f.
10 *zambiense*; **b.** *D. zambiense* f. *trispinosum*; **c.** *D. zambiense* f. *bispinosum*; **d.** *D.*
11 *zambiense* f. *monospinosum*. ACZ: adoral ciliary zone; DCZ: dorsal ciliary zone; Ma:
12 macronucleus; Mi: micronucleus; CV: contractile vacuole; CS: caudal spines. Figures
13 prepared out of scale. For morphometric data, please see Table 2.

1 **Table 1.** Measurements [μm ; mean \pm SD (minimum-maximum); $n = 20$] of six morphotypes of *Diplodinium anisacanthum* da Cunha record in
 2 Brazilian sheep (*Ovis aries*)

Characters	<i>monacanthum</i>	<i>diacanthum</i>	<i>triacanthum</i>	<i>tetracanthum</i>	<i>pentacanthum</i>	<i>anisacanthum</i>
Body length	69.51 \pm 7.17 (58.92-81.54)	69.83 \pm 8.80 (59.38-87.84)	68.72 \pm 9.32 (59.89-92.38)	69.27 \pm 5.81 (58.30-78.02)	66.76 \pm 6.43 (60.97-77.53)	78.02 \pm 6.32 (61.11-78.33)
Body width	53.13 \pm 5.71 (46.68-67.46)	55.44 \pm 5.47 (47.41-65.39)	54.00 \pm 6.28 (47.32-70.78)	53.39 \pm 4.15 (45.43-61.61)	53.01 \pm 5.76 (45.95-57.59)	56.24 \pm 2.76 (51.29-59.08)
Body length/body width	1.31 \pm 0.09 (1.16-1.51)	0.70 \pm 0.07 (0.59-0.83)	1.27 \pm 0.04 (1.21-1.37)	1.30 \pm 0.11 (1.12-1.52)	1.26 \pm 0.10 (1.06-1.43)	1.32 \pm 0.11 (1.10-1.42)
Macronuclear length	40.48 \pm 6.87 (26.34-58.86)	39.06 \pm 6.28 (29.81-51.61)	39.62 \pm 7.16 (29.16-50.86)	41.42 \pm 4.06 (35.00-49.97)	39.84 \pm 6.61 (30.53-56.26)	46.13 \pm 5.84 (38.55-51.86)
Macronuclear width	18.49 \pm 2.84 (13.27-25.19)	20.32 \pm 2.67 (17.03-23.81)	18.28 \pm 3.21 (14.91-24.61)	17.87 \pm 3.40 (13.11-26.86)	18.90 \pm 2.80 (15.13-23.98)	18.72 \pm 2.71 (17.08-24.32)
Macronuclear length/macronuclear width	2.21 \pm 0.45 (1.77-3.79)	1.92 \pm 0.26 (1.57-2.36)	2.17 \pm 0.24 (1.86-2.79)	2.37 \pm 0.38 (1.86-3.33)	2.13 \pm 0.37 (1.50-2.74)	2.77 \pm 0.51 (1.72-2.99)
Macronuclear length/body length	0.76 \pm 0.08 (0.53-0.97)	0.70 \pm 0.07 (0.59-0.83)	0.76 \pm 0.09 (0.58-0.86)	0.77 \pm 0.05 (0.66-0.88)	0.75 \pm 0.12 (0.56-0.98)	0.87 \pm 0.07 (0.72-0.89)
Micronuclear diameter	6.16 \pm 1.18 (3.94-8.32)	6.18 \pm 1.13 (4.92-8.68)	6.31 \pm 1.32 (4.68-9.35)	5.37 \pm 1.37 (2.17-7.94)	6.03 \pm 0.88 (3.91-7.29)	7.68 \pm 1.14 (5.52-8.95)
Distance from anterior end of the macronucleus to the micronucleus	6.22 \pm 1.76 (2.61-9.90)	6.76 \pm 1.77 (4.37-10.14)	6.30 \pm 1.54 (3.51-8.62)	6.26 \pm 1.34 (4.12-9.71)	6.22 \pm 1.54 (4.00-10.01)	6.35 \pm 1.17 (6.18-9.07)

3

4

5

6

7

1 **Table 2.** Characteristics of the *Diplodinium* Schuberg species

Species	Length (μm)	Width (μm)	Body shape	Number of caudal appendages	Macronuclear length (μm)	Macronuclear width (μm)	Macronuclear shape	References **
<i>Diplodinium africanum</i> Imai 1988 (Fig. 3)	150- 250	105-155	Ovoid	1	82	21	Rod, bent anterior end	1
<i>Diplodinium anisacanthum</i> da Cunha 1914 (Fig. 4)	70-90	40-60	Ovoid	0-6	37	11	Rod, bent anterior end	2
<i>Diplodinium archon</i> Latteur 1960 (Fig. 5)	39-49	26-33	Ovoid	1	18	8	Triangular	3
<i>Diplodinium babici</i> Wertheim 1933 (Fig. 6)	53-84	40-64	Ovoid	0	21	6	Rod	4
<i>Diplodinium bubalidis</i> Dogiel 1925 (Fig. 7)	104- 195	58-98	Ovoid	1	66	9	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium cameli</i> Dogiel 1925 (Fig. 8)	160- 210	92-130	Ovoid	0	97	15	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium ceylonicum</i> Bhatia 1936	*	*	*	1	*	*	*	4
<i>Diplodinium consors</i> Dogiel 1925 (Fig. 9)	65-108	35-46	Ovoid	1	29	9	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium costatum</i> Dogiel 1925 (Fig. 10)	80-180	55-110	Ovoid	0	53	9	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium crista-galli</i> Dogiel 1927 (Fig. 11)	77-100	52-70	Ovoid	caudal fan	38	13	Rod, bent anterior end	6
<i>Diplodinium dentatum</i> Stein 1858 (Fig. 2)	65-82	52-62	Short, heavy	6	43	14	Rod, bent anterior end	4
<i>Diplodinium dogieli</i> Dogiel 1925 (Fig. 12)	70-100	48-77	Ovoid	0	51	36	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium elongatum</i> Dogiel 1927 (Fig. 13)	177- 205	73-100	Elongated	0	107	16	Rod, bent anterior end	6
<i>Diplodinium flabellum</i> Kofoid & MacLennan 1932 (Fig. 14)	90-108	58-72	Triangular	caudal fan	44	11	Rod, bent anterior end	7
<i>Diplodinium giraffae</i> Noirot-Timothee 1960	*	*	*	*	*	*	*	4
<i>Diplodinium indicum</i> Banerjee 1955	130- 180	85-105	Ovoid	1	64	16	Rod, bent anterior end	4
<i>Diplodinium italicum</i> Morigii 1941 (Fig. 15)	120- 147	64-74	Ovoid	0	73	8	Rod, bent anterior end	4
<i>Diplodinium komareki</i> Kubikova 1935 (Fig. 16)	*	*	Ovoid	*	*	*	Curved Rod	4
<i>Diplodinium laeve</i> Dogiel 1927 (Fig. 17)	77-100	52-70	Ovoid	1	45	12	Rod, bent anterior end	6
<i>Diplodinium leche</i> Imai et al. 1992 (Fig. 18)	40-55	30-35	Ovoid	1	30	*	Rod	8
<i>Diplodinium lochinvarense</i> Imai et al. 1992 (Fig. 19)	110- 150	65-75	Cylindrical	1	*	*	Rod, bent anterior end	8

<i>Diplodinium mahidoli</i> Imai & Ogimoto 1983 (Fig. 20)	117-168	77-113	Ovoid	1-2	70	10	Rod, bent anterior end	9
<i>Diplodinium minor</i> Dogiel 1925 (Fig. 21)	60-90	45-51	Ovoid	0	42	33	Rod	5
<i>Diplodinium moucheti</i> Noirot-Timothee 1959 (Fig. 22)	74-84	52-59	Ovoid	1	11	5	Ovoid	4
<i>Diplodinium nanum</i> Imai 1988 (Fig. 23)	35-53 105-	28-40	Ovoid	1	22	8	Ovoid	1
<i>Diplodinium psittaceum</i> Dogiel 1927 (Fig. 24)	155	59-100	Ovoid	1	35	16	Rod, bent anterior end	6
<i>Diplodinium polygonale</i> Dogiel 1925 (Fig. 25)	32-38	20-24	Ovoid	0	9	4	Spherical	5
<i>Diplodinium quinquecaudatum</i> Dogiel 1925 (Fig. 26)	57-73 128-	47-65	Rectangular	5	48	8	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium rangiferi</i> Dogiel 1925 (Fig. 27)	210	100-165	Ovoid	0-various	111	18	Rod, bent anterior end	5
<i>Diplodinium sinhalicum</i> Imai 1986	49-59	37-44	Rectangular	0-2	24	6	Triangular	4
<i>Diplodinium zambiense</i> Imai et al. 1992 (Fig. 28)	49-65	35-43	Ovoid	1-4	*	*	Rod, bent anterior end	8

1 *: Data not informed; **: [1]: Imai (1988); [2]: da Cunha (1914); [3]: Latteur (1960); [4]: Williams & Coleman (1992); [5]: Dogiel (1925); [6]: Dogiel (1927);

2 [7]: Kofoid & MacLennan (1932); [8]: Imai et al. (1992); [9]: Imai & Ogimoto (1983); [10]: Imai (1986).

ANEXO 4

(Artigo aceito para publicação no periódico Zootaxa)

**Description of *Diploplastron dehorityi* sp. nov. (Entodiniomorphida,
Ophryoscolecidae), a new rumen ciliate from Brazilian sheep (*Ovis aries*)**

Franciane Cedrola, Roberto Júnio Pedroso Dias, Isabel Martinele, Marta D'Agosto

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e
Biologia Animal, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil*

**Description of *Diploplastron dehorityi* sp. nov. (Entodiniomorphida,
Ophryoscolecidae), a new rumen ciliate from Brazilian sheep (*Ovis aries*)**

FRANCIANE CEDROLA*, ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS, ISABEL MARTINELE
& MARTA D'AGOSTO

*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Comportamento e
Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora,
Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: francedrola@gmail.com

Abstract

To date the genus *Diploplastron* comprised only one species of ophryoscolecid ciliate, *Diploplastron affine*, which is characterized by having two retractable ciliary zones in the anterior end of the body, two slender and juxtaposed skeletal plates on the right side, a rod shape macronucleus, and two contractile vacuoles. During study on the characterization of rumen ciliate community composition in Brazilian domestic sheep, we observed ciliates with atypical morphology but with diagnostic features of genus *Diploplastron*. This study describes *Diploplastron dehorityi*, a new species of ophryoscolecid ciliate, that differs from *D. affine*, primarily, in the morphology of skeletal plates, morphology of nuclear apparatus and body shape. In addition to the similarities between the new species and congener species, *D. dehorityi* has some morphological similarities to species of genus *Eremoplastron*.

Keywords: Brazil; *Diploplastron*; ophryoscolecid ciliates; sheep; rumen

Introduction

The genus *Diploplastron* was established by Kofoid & MacLennan (1932) and includes a single species of ophryoscolecoid ciliate: *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa 1925), characterized by having two retractable ciliary zones in the anterior end of the body, two slender and juxtaposed skeletal plates on the right side, a rod-shaped macronucleus, and two contractile vacuoles (Williams & Coleman 1992). This species has a broad geographic distribution, low host specificity and recognized cellulolytic and amylolytic activity (Wereszka & Michałowski 2012; Williams & Coleman 1992). During study on the composition of rumen ciliate fauna of domestic sheep in Brazil, we observed ciliates with atypical morphology, but with diagnostic features of genus *Diploplastron*. Considering the scarcity of information on the taxonomy and morphology of ophryoscolecoid ciliates, this study aims to describe *Diploplastron dehorityi*, a new rumen ciliate species, based on morphological and morphometric characterization and details of the oral infraciliature.

Materials and Methods

Rumen samples were obtained from 32 domestic sheep (*Ovis aries* L.) housed in individual stalls and distributed in a completely randomized design with four treatments and eight replicates. The animals received water and mineral salts ad libitum, a diet of Tifton 85 hay (*Cynodon* sp.), cob corn, and concentrate (basal diet), and four cassava wastewater levels (0; 500; 1,000; or 1500 ml). Each sample consisted of 20 cm³ fixed in formalin 18.5% (Dehority 1984). Species identification was based on the descriptions of Dogiel (1927), Kofoid & MacLennan (1932), Ogimoto & Imai (1981), and Williams & Coleman (1992). To identify the ciliates, we used an Olympus BX-51 light microscope (600 × and 1000 × magnification) equipped with an Olympus Evolt E-330 digital camera and Image-Pro Plus

6.0 software to perform morphometry on 20 specimens stained with the Lugol's solution (Cedrola *et al.* 2015). The orientation of the ciliates for description was adopted from Dogiel (1927): the side closest to the macronucleus was termed the dorsal side, and the opposite one, the ventral side, thus, defined the right and left sides. The infraciliary bands were stained using the silver carbonate impregnation technique (Ito & Imai 2006). The term polybrachykinety denotes infraciliary bands composed of numerous, short and parallel kineties (Fernandez-Galiano 1979). Free-hand drawings were created for observation of the specimens stained with Lugol's solution, under a microscope (Olympus BX-51). The drawing of silver-impregnated specimen was prepared using a light camera. All drawings were oriented so that the anterior side of the body was at the top of the page. The species prevalence was determined according to Bush *et al.* (1997), and the species density was estimated with a Sedgewick-Rafter chamber according to Dehority (1984) with modifications from D'Agosto & Carneiro (1999). A population belonging to the species *D. affine* was characterized morphologically for comparison with the *D. dehorityi* sp. nov.

Results

Diploplastron dehorityi sp. nov. (Fig. 1a-f; Table 1)

Description. *Diploplastron dehorityi* presents an oval body (body length: 79.0 ± 4.1 μm [mean \pm SD] body width 57.7 ± 2.9 μm and length / width: 1.3 ± 0.05 μm) laterally compressed with a prominent lobe in the posterior end (Fig. 1a). The external surface has small longitudinal striations. The vestibule is small and only slightly evident (Fig. 1a and f). Two retractable ciliary zones, one adoral and other dorsal, are in the same plane in the anterior end of the body and are separated by a slightly flattened protuberance, the operculum (Fig. 1a, d and f). Two slender and curved skeletal plates on the right side of the

body depart from the base of the adoral ciliary zone and continue up to the final third of the body (Fig. 1a and f), juxtaposed to the ventral surface of the macronucleus. The skeletal plate in the base of the adoral ciliary zone is spaced (distance of approximately 6.5 μm), and in the middle region of the body, it is close. After the median approximation, they separate (distance of approximately 5.7 μm), returning to approximate the final portion. The macronucleus is rod-shaped, slightly curved (macronucleus length: $53.9 \pm 2.7 \mu\text{m}$), and has a small depression on the dorsal surface, whereas the micronucleus has an elliptical shape (Fig. 1a). Two contractile vacuoles, with inconspicuous excretory pores, are located dorsally to the macronucleus. The rectum is a tubular structure located in the posterior end of the body and opens by a small pore, the citoproct (Fig. 1a).

The oral infraciliature in *D. dehorityi* corresponds to the Diplodinium-type (Ito & Imai 2006) (Fig. 1b and f). This pattern consists of an adoral polybrachykinety (AP), vestibular polybrachykinety (VP), dorsal polybrachykinety (DP), and paralabial kineties (PK). AP involves the buccal opening, and VP is long and extends into the vestibule, if originating internally by the dorsal side of AP. DP extends laterally along the dorsal side of the body and PK, ranging in number from four to five, and is located close to the ventral portion of AP.

Remarks. *Diploplastron dehorityi* sp. nov. resembles *Diploplastron affine* (Fig. 1 g-j) in number of contractile vacuoles and number of skeletal plates. However, they differ in body and macronuclear size [body length: 79.0 ± 4.1 (*D. dehorityi*) versus 94.0 ± 0.7 (*D. affine*); body width: 57.7 ± 2.9 (*D. dehorityi*) versus 63.1 ± 0.6 (*D. affine*); macronuclear length: 53.9 ± 2.7 (*D. dehorityi*) versus 64.9 ± 1.1 (*D. affine*)] body shape, macronuclear shape and shape of skeletal plates. In addition, *D. dehorityi* presents less length : width ratio than *D. affine* [1.4 ± 0.05 (*D. dehorityi*) versus 1.4 ± 0.02 (*D. affine*)] (Table 1). The new species

resembles, also, the species *Eremoplastron neglectum* (Dogiel 1925) and the species *E. rotundum* (Kofoid & MacLennan 1932) in size and body shape, presence of a lobe in the posterior end, macronucleus shape, and number of contractile vacuoles. However, it differs in the number of skeletal plates, as ciliates belonging to the genus *Eremoplastron* possess only a single skeletal plate.

Habitat, type host, and type locality. The rumen of Brazilian domestic sheep (*Ovis aries* L.) in Frei Paulo, Sergipe, Brazil (10.518317 S, 37.651118 W).

Etymology. The name of the new species was selected in honor of the late Dr. Burk A. Dehority, The Ohio State University, a leading rumen microbiologist and rumen ciliate taxonomist.

Type material. Slides of the holotype (C_Dd_0001_01) and paratype (C_Dd_0001_02 and 03) will be deposited in the collection of the Laboratório de Protozoologia (LabProto), Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Occurrence and ecology. *Diploplastron dehorityi* sp. nov. were observed in one of the 32 sheep analyzed (prevalence of 3.1%) and in a density of 0.8×10^4 protozoa/ml of rumen contents and without co-occurring with *Diploplastron affine*. In this animal host, we observed also species belonging to the genera: *Dasytricha* Schuberg, *Diplodinium* Schuberg, *Charonina* Strand, *Enoploplastron* Kofoid & MacLennan, *Entodinium* Stein, *Isotricha* Stein, *Metadinium* Awerinzew & Mutafova, *Ophryoscolex* Stein and *Polyplastron* (Dogiel). *D. affine* was observed in 17 of the 32 sheep analyzed (prevalence of 53.12%) and in average density of 1.3×10^4 (range of: 0.4-2.4) protozoa/ml of rumen contents.

Discussion

Dogiel (1927) established four subgenera to genus *Diplodinium*: *Anoplodinium* (no skeletal plates and two contractile vacuoles); *Eudiplodinium* (one or two skeletal plates and two contractile vacuoles); *Polyplastron* (five skeletal plates and numerous contractile vacuoles) and *Ostracodinium* (one broad skeletal plate and two to six contractile vacuoles). Kofoid & MacLennan (1932) raised these subgenera to the genus level and proposed that the species belonging to the subgenus *Eudiplodinium* was classified into four new genera:

Eudiplodinium (one skeletal plate, a hook-shaped macronucleus, and two contractile vacuoles); *Eremoplastron* (one skeletal plate, a rod-shaped macronucleus and two contractile vacuoles); *Diploplastron* (two slender skeletal plates, a rod-shaped macronucleus and two contractile vacuoles) and *Metadinium* (two large skeletal plates, a lobed macronucleus, and two contractile vacuoles). Thus, according to the diagnosis proposed by Kofoid & MacLennan (1932), the genus *Diploplastron* contains a single species:

Diploplastron affine [anteriorly *Diplodinium* (*Eudiplodinium*) *affine*].

Diploplastron dehorityi, the new species described in this study, shows the diagnostic features of genus *Diploplastron*, which differ in some respects to the species *D. affine*. The skeletal plates and macronucleus in *D. dehorityi* have a curved shape. In contrast, *D. affine* has a rod-shaped macronucleus and juxtaposed skeletal plates gently sloping toward the macronucleus. Furthermore, the new species has an oval body, differing from the elliptical body shape of *D. affine* (Fig. 1)

It is interesting that the new species has not been registered, even though it has considerable morphological differences in relation to *D. affine*, not yet observed in previous studies (Göçmen *et al.* 1999; Ogimoto & Imai 1981; Williams & Coleman 1992). This may be due to the fact that *D. dehorityi* is a rare species, as it was observed in only one of the 32 animals analyzed (prevalence of 3.41%) and in low density (0.8×10^4 protozoa / ml of

rumen contents). On the other hand, *D. affine* was observed in more than 50% of the evaluated animals (prevalence of 53.12%) and in high average density [1.3×10^4 (range of: 0.4-2.4)]. These observations emphasize the importance of studies being carried out in geographically poorly explored locations, e.g. Northeast Brazil, and with a larger number of hosts, as emphasized by Cedrola *et al.* (2016a).

Besides the morphological differences, the new species differs also in several body dimensions from the species *D. affine*, such as: body size, macronuclear size and length : width ratio. In addition to the similarities between the new species and congener species, *D. dehorityi* has great morphological similarity to species of the genus *Eremoplastron*, such as shape and body size, but differs in the number of skeletal plates.

Oral infraciliature in *D. affine* was described by Noiro-Timothee (1960) and according to the author, the infraciliature in this species comprises an adoral polybrachykinety which involves the oral opening and extends into the vestibule, and a dorsal polybrachykinety. However, in this study, we observed differences to the description proposed by this author. The oral infraciliature in *Diploplastron* ciliates comprises a adoral polybrachykinety, a vestibular polybrachykinety, a dorsal polybrachykinety, and four to five parabial kineties, organized according to Diplodinium-type proposed by Ito & Imai (2006). This type of infraciliary band is also shared by other ciliate species belonging to the subfamily Diplodiniinae (Ito & Imai 2006). This pattern was also observed in the new species (Fig. 1).

According to morphological data, *D. dehorityi* can be included in the genus *Diploplastron* together with the species *D. affine*. However, the morphological similarities observed among species belonging to the genera *Diploplastron* and *Eremoplastron* allows discussions about the taxonomy of the family Ophryoscolecidae and highlight the

possibility of these genera to be synonyms. According to Kofoid and MacLennan (1932), although *D. affine* has two skeletal plates, this ciliate is structurally very closely related to *Eremoplastron* ciliates. The morphological similarity and the phylogenetic proximity of species belonging to these genera have been supported by recent studies that recover the molecular phylogeny of the family Ophryoscolecidae (Kittelmann *et al.* 2015; Rossi *et al.* 2015); in such analyses, these species emerge in a monophyletic clade with high support values. According to Cedrola *et al.* (2016b), the number of skeletal plates is not a very important taxonomic character in the family Ophryoscolecidae, because genera with the same number of skeletal plates are not phylogenetically close. Thus, further studies with a larger number of sequences of the 18S rRNA gene for representatives of the family Ophryoscolecidae as well as the use of other molecular markers should be conducted to better understand this issue.

Acknowledgements

This work was partially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – APQ 403336/2016-3) provided a research grant to Marta D’Agosto and Roberto Júnio P. Dias (Bolsa de Produtividade PQ) and CAPES to Franciane Cedrola. We thank Prof. Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos, MSc. José Adelson Santana Neto, and Embrapa Tabuleiros Costeiros: Campus Pedro Arle for the samples of rumen contents; Prof. Dr. Sthefane D’ávila for the free-hand drawings of *Diploplastron* ciliates; and Ricardo Cazetta Menzer for his assistance in English editing.

References

- Bush, A.O., Laffert, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R.J.P., Martinele, I. & D’Agosto, M. (2015) Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata: Ciliophora): A brief review. *Zoological Science*, 32 (1), 8–15.
- Cedrola, F., Martinele, I., Dias, R.J.P., Fregulia, P. & D’Agosto, M. (2016a) Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). *Zootaxa*, 4088, 292–300.
- Cedrola, F., Senra, M.V.X.; D’Agosto, M. & Dias, R.J.P (2016b) Phylogenetic analyses support validity of genus *Eodinium*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, in press, DOI: 10.1111/jeu.12355.
- D’Agosto, M. & Carneiro, M.E. (1999) Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 85, 725–729.
- Dehority, B.A. (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 182–185.
- Dogiel, V.A. (1927) Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Archiv für Protistenkunde*, 59, 1–288.
- Fernandez-Galiano, D. (1979) Transfer of the widely known “spirotrich” ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorpha. *Transactions of the American Microscopic Society*, 98, 447–454.
- Göçmen, B., Torun, S. & Öktem, N. (1999) Türkiye Evcil Koyun (*Ovis ammon aries*)’ların florası (Protozoa: Ciliophora) Faunası Hakkında Bir Ön

- Çabflma: II- Familya Ophryoscolecidae (Entodiniomorphida). *Turkish Journal of Zoology*, 23 (2), 473–490.
- Ito, A. & Imai, S. (2006) Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates. *Endocytobiosis Cell Research*, 17: 103–110.
- Kittelman, S., Devente, S.R., Kirk, R.M., Seedorf, H., Dehority, B. & Janssen, P.H. (2015) Phylogeny of intestinal ciliates, including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 2433–2444.
- Kofoid, C.A. & MacLennan, R.F. (1932) Ciliates from *Bos indicus*. II. The genus *Diplodinium* Schuberg. *University of California Publications in Zoology*, 37: 53–152.
- Noirot-Timotheé, C. 1960. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structure et ultrastructures. *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animal*, 12, 526–718.
- Ogimoto, K. & Imai, S. (1981) *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press, Japan, 231 pp.
- Rossi, M. F., Dias, R.J.P., Senra, M.V.X., Martinele, I., Soares, C.A.G. & D'Agosto, M. (2015) Molecular phylogeny of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) inferred from 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62: 584–590.
- Wereskka, K. & Michalowski, T. (2012) The ability of the rumen ciliate protozoan *Diploplastron affine* to digest and ferment starch. *Folia Microbiologica*, 57: 375–377.
- Williams, A.G. & Coleman, G.S. (1992) *The rumen protozoa*. Springer Verlag, New York, 450 pp.

Table 1. Measurements [μm ; mean \pm SD (minimum-maximum); $n = 20$] of the two species of *Diploplastron* ciliates recorded in Brazilian sheep (*Ovis aries*)

Characters	<i>Diploplastron</i>	<i>Diploplastron</i>
	<i>dehorityi</i>	<i>affine</i>
	79.0 \pm 4.1	94.0 \pm 0.7
Body length	(71.2–89.0)	(92.3–95.5)
	57.7 \pm 2.9	63.1 \pm 0.6
Body width	(53.2–65.1)	(62.2–64.3)
	1.3 \pm 0.05	1.48 \pm 0.02
Body length/body width	(1.2–1.4)	(1.4–1.5)
	53.9 \pm 2.7	64.9 \pm 1.1
Macronuclear length	(50.0–59.1)	(56.9–66.4)
	13.6 \pm 1.2	12.6 \pm 0.3
Macronuclear width	(11.1–15.0)	(12.0–13.0)
	0.6 \pm 0.04	0.6 \pm 0.01
Macronuclear length/body length	(0.6–0.7)	(0.6–0.7)
Distance from anterior end of the macronucleus to the micronucleus (D)	26.2 \pm 2.6	28.4 \pm 0.4
	(21.7–32.7)	(27.7–29.0)
	0.4 \pm 0.04	0.4 \pm 0.01
D/macronuclear length	(0.3–0.5)	(0.4–0.45)

Figure 1. *Diploplastron* ciliates recorded in Brazilian domestic sheep (*Ovis aries* L.). **a-f.** *Diploplastron dehorityi* sp. nov. **a.** Schematic drawing based on specimen stained with Lugol's solution. **b.** Schematic drawing of the oral infraciliary bands pattern. **c-d.** Schematic drawing of variations in the morphology of skeletal plates. **e.** Specimen stained with Lugol's solution. **f.** Specimen impregnated with silver carbonate. **g-j.** *Diploplastron affine* (Dogiel and Fedorowa, 1925). **g.** Schematic drawing based on specimen stained with Lugol's solution. **h.** Schematic drawing of the oral infraciliary bands pattern. **i.** Specimen stained with Lugol's solution. **j.** Specimen impregnated with silver carbonate. **e-j.** ACZ: adoral ciliary zone; AP: adoral polybrachykinety; CV: contractile vacuole; DCZ: dorsal ciliary zone; DP: dorsal polybrachykinety; Ma: macronucleus; Mi: micronucleus; Sk: skeletal plate; VP: vestibular polybrachykinety. Bars (e, f, i, j): 20 μ m.