



## Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios

*Molecular genetics and animal systematics:  
A brief history, contributions and challenges*

Marlus Bueno-Silva<sup>[a]</sup>

### Resumo

O progresso da genética molecular tem possibilitado o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações. Na última década, o uso crescente de marcadores moleculares de DNA deu origem à taxonomia molecular. O gene COI é considerado o marcador universal para código de barras genético animal, porém sua amplificação é difícil para alguns táxons, e isso tem motivado a proposta de marcadores alternativos. Entretanto, é possível que a combinação de dois ou mais marcadores de DNA e o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos possam resolver esse dilema. Por outro lado, tornou-se cada vez mais difícil publicar descrições de espécies baseadas exclusivamente em morfologia no mundo inteiro. Taxonomistas atribuem esse fato ao fenômeno do “impedimento taxonômico”. Apesar das divergências entre taxonomistas tradicionalistas e moleculares, é muito provável que o uso integrado de dados genéticos e morfológicos possa fornecer subsídios mais consistentes na delimitação de espécies. Recentemente, o uso de marcadores de DNA em sistemática filogenética abriu caminho para a sistemática molecular. Algumas iniciativas têm contribuído para o avanço dessa nova linha de pesquisa, por exemplo: criação de bases de dados filogenéticos e disponibilidade de infraestrutura computacional para inferência filogenética. Dentre os desafios de trabalhar com taxonomia molecular, destacam-se a demanda por infraestrutura adequada e alto investimento financeiro. Apesar disso, a taxonomia no Brasil, sem dúvida, tem potencial para continuar se expandindo como uma das ciências mais promissoras deste século, principalmente nesse momento da história em que fragmentação e degradação ambiental demandam o conhecimento urgente da biodiversidade.

**Palavras-chave:** DNA. Impedimento taxonômico. Marcador molecular. Taxonomia molecular.

### Abstract

*The progress of molecular genetics has enabled the development of methods to characterize individuals and populations genetically. In the last decade, the increasing use of DNA molecular markers led to the molecular taxonomy. The COI gene is a universal marker for DNA barcoding in animals, but its amplification is difficult for some taxa and it has motivated the proposal of other molecular markers. However, it is likely that a combination of two or more DNA markers and the development of species-specific primers can solve this dilemma. On the other hand, it became increasingly difficult to publish descriptions of species based only on morphology worldwide. Taxonomists assign this issue to the “taxonomic impediment”. Despite the differences between traditional and molecular taxonomists, it is highly likely that the integrated use of genetic and morphologic data may provide more reliable information in the delimitation of species. Recently, the use of DNA markers in phylogenetic systematics paved the way for molecular systematics. Some initiatives have contributed to the advancement of this research area, e.g. creation of phylogenetic databases and availability of computational infrastructure for phylogenetic inference. Among the challenges of working with molecular taxonomy are the need for adequate infrastructure and high support investment. Nevertheless, the taxonomy in Brazil certainly has the potential to continue expanding as one of the most promising sciences of this century, especially at this moment in history when fragmentation and environmental degradation require urgent knowledge of biodiversity.*

**Keywords:** DNA. Taxonomic impediment. Molecular marker. Molecular taxonomy.

<sup>[a]</sup> Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Zoologia) pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: marbsilva@gmail.com

Recebido: 24/05/2012

Received: 05/24/2012

Aprovado: 05/09/2012

Approved: 09/05/2012

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, por James Watson e Francis Crick em 1953, o campo da genética tem progredido consideravelmente e contribuído para a compreensão de processos biológicos inerentes à evolução de espécies. Ao longo dos últimos 30 anos, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (Freeland, 2005; Teneva, 2009).

Historicamente, interações entre espécies e ambiente têm sido estudadas por meio de observações de campo e manipulações experimentais. Esses caminhos fornecem dados fenotípicos, que podem ser baseados em um ou mais aspectos da morfologia, fisiologia ou comportamento das espécies. Contudo, o uso de dados fenotípicos para inferir variação genética de populações é bastante questionável. Embora algumas características fenotípicas estejam sob estrito controle genético, fatores ambientais podem influenciar a relação entre o genótipo (i.e. conjunto de genes) e o fenótipo de um indivíduo. Assim, a variação genética poderia ser subestimada (ou superestimada) se fosse baseada unicamente em dados fenotípicos (Freeland, 2005; Pamilo, 1988). Por isso, a complexa interação entre genótipo, fenótipo e ambiente pode ser considerada um dos principais motivos que impulsionaram o desenvolvimento de marcadores moleculares para o estudo genético de espécies.

Os primeiros marcadores moleculares, as alozimas, foram desenvolvidos na década de 1960 e eram baseados em enzimas. Alocimas são múltiplas variantes de uma mesma proteína que ocorrem quando sequências de DNA de dois ou mais alelos, em um mesmo locus, são suficientemente divergentes e, então, o RNA correspondente codifica diferentes aminoácidos, dando origem a múltiplas variantes de uma mesma proteína. No entanto, nem toda mutação na sequência de DNA resulta em mudanças na sequência de aminoácidos, e essa é uma das desvantagens da utilização de alozimas como marcadores moleculares. As limitações e desvantagens do uso de alozimas impulsionaram, anos depois, o desenvolvimento de marcadores genéticos baseados em DNA (Freeland, 2005; Schlötterer, 2004).

Na década de 1980, foram desenvolvidos os primeiros marcadores moleculares de DNA. Basicamente, os marcadores de DNA podem ser classificados em dois grupos: marcadores dominantes e codominantes. Os marcadores dominantes (ex.: RAPD, AFLP) permitem

obter dados de diversos *loci* do genoma, enquanto que os codominantes (ex.: RFLP, sequência de DNA, microssatélites) revelam alelos de um locus específico do genoma. Marcadores codominantes, tais como microssatélites, permitem distinguir indivíduos heterozigotos de homozigotos e calcular frequência de alelos (Freeland, 2005).

Algumas regiões do DNA não codificam para proteínas (ex.: íntrons) e muitas dessas regiões passaram a ser usadas como marcadores moleculares em estudos de genética de populações (*sensu* Jarman, Ward & Elliott, 2002). Essas regiões não codificantes do DNA oferecem a vantagem de serem marcadores neutros, ou seja, não se encontram sob seleção natural. Outros marcadores moleculares oferecem a vantagem de apresentarem elevado número de cópias no DNA (ex.: genes do DNA nuclear ribossomal) e por possuírem alta taxa de mutação (ex.: minissatélites e microssatélites). Microssatélites têm sido considerados marcadores muito informativos para estudos populacionais, em virtude de sua alta taxa de mutação e heterozigosidade (Schlötterer, 2004).

Embora seja comum ocorrerem diferenças genéticas interespecíficas, a estrutura e função dos genes são tipicamente conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Isso não significa, entretanto, que todos os indivíduos de uma mesma espécie são geneticamente idênticos, já que variações genéticas intraespecíficas evitam, por exemplo, que dois indivíduos possuam o mesmo código genético. Essas variações se devem a eventos ocorridos durante a replicação do DNA, tais como recombinação, duplicação e mutação (Freeland, 2005; Lemey, Salemi & Vandamme, 2009). Contudo, nem todo código genético é herdado do mesmo modo e, portanto, o conhecimento dos diferentes tipos de herança genética é fundamental na escolha do marcador molecular mais adequado em um estudo genético, ex.: se o objetivo é avaliar variabilidade genética populacional, diferenciar espécies crípticas ou reconstruir o relacionamento filogenético de diversos táxons.

O modo de herança genética difere entre marcadores moleculares de DNA nuclear (nDNA) e de DNA mitocondrial (mtDNA). Marcadores de nDNA (ex.: ITS, 18S, 28S) possuem herança biparental, são muito utilizados em reconstrução filogenética de diversos táxons e podem, eventualmente, ser usados para detectar hibridização de espécies (*sensu* Freeland, 2005; Gross, Nilsson & Schmitz, 1996). Já os marcadores de mtDNA (ex.: COI, Cytb, ND4) possuem, na maioria dos casos, herança uniparental e são amplamente utilizados em

estudos populacionais, pois apresentam amplo polimorfismo intraespecífico e evoluem mais rápido que o nDNA (Avice, 2000). Dentre os marcadores mitocondriais conhecidos atualmente, dois se destacam em estudos genéticos com animais: o gene citocromo c oxidase I (COI) e a região controle do mtDNA (também conhecida como D-loop). A elevada taxa evolutiva, geralmente apresentada por esses dois marcadores, permite que eles sejam usados em vários tipos de estudos, incluindo filogeografia, código de barras genético (no caso de COI), reconstrução de história demográfica e diversificação adaptativa. A informação genética desses marcadores é obtida por meio do sequenciamento de fragmentos de DNA. Atualmente, o sequenciamento de DNA é o método que oferece maior nível de resolução para caracterizar geneticamente indivíduos e populações, porém é considerado o mais oneroso de todos.

O advento do sequenciamento de DNA proporcionou, nas últimas duas décadas, a criação de bancos de dados genéticos visando reunir e disponibilizar, gratuitamente, informações genéticas de táxons do mundo todo. Essas coleções de sequências de DNA têm contribuído para a realização de pesquisas em diversas áreas, dentre elas taxonomia, sistemática, biologia da conservação e ecologia. Na última década, o uso de ferramentas moleculares para identificação de espécies deu origem a uma nova linha de pesquisa em biologia, a taxonomia molecular. Essa abordagem molecular consiste na identificação de espécies usando um código de barras genético (também conhecido como código de barras de DNA).

O gene mitocondrial COI demonstra ser um importante marcador molecular para código de barras genético de animais, pois oferece a vantagem de ser espécie-específico (Hebert, Ratnasingham & Waard, 2003), i.e. apresenta alta variabilidade interespecífica. Essa característica tornou o COI, desde então, um marcador universal em taxonomia molecular e isso inspirou a criação de um consórcio internacional conhecido como *Código de Barras da Vida* (do inglês, *Barcode of Life* – <http://www.barcodeoflife.org>). Esse projeto é mantido em parceria com três importantes bases de dados moleculares: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), European Molecular Biology Lab (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) e DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>). Apesar da crescente utilização de COI em taxonomia, alguns pesquisadores relatam que a amplificação desse gene é muito difícil para alguns grupos de animais (Bhadury, Austen, Bilton, Lamshead, Rogers & Smerdon, 2006; Hoareau

& Boissin, 2010; Moszczyńska, Locke, McLaughlin, Marcogliese & Crease, 2009), o que poderia comprometer o estabelecimento de COI como marcador universal em taxonomia e, conseqüentemente, a proposta de identificação de espécies baseada nesse gene. Por outro lado, alguns pesquisadores têm sugerido a utilização de marcadores moleculares alternativos (ex.: 16S, ITS2) para identificação de espécies animais (Coleman, 2009; Vences, Thomas, Meijden, Chiari & Vieites, 2005). Diante desses dados, torna-se evidente que ainda são necessários outros estudos para se chegar a um consenso sobre a escolha de um marcador universal (ou marcadores) que auxilie na identificação de espécies por código de barras genético. No entanto, a alta taxa evolutiva de COI para alguns grupos de animais (ex.: parasitos vivíparos de Gyrodactylidae; Meinilä, Kuusela, Zięta & Lumme, 2004) sugere que o uso universal desse marcador para código de barras genético pode se tornar difícil, principalmente em razão da dificuldade de desenhar oligonucleotídeos iniciadores que sejam eficientes na amplificação de COI para diferentes espécies. É bastante provável que a combinação de dois ou mais marcadores de DNA e o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos possam resolver esse impasse sobre o uso de marcadores moleculares para código de barras genético de animais.

No Brasil, em meados da década de 90, a equipe do Laboratório de Genética Animal da Embrapa (Cenargen) criou um banco de amostras de DNA com o objetivo de reunir informações para subsidiar pesquisas em conservação e genética de animais (Egito, Albuquerque, Castro, Paiva, Marques & McManus, 2005). Há aproximadamente oito anos, o Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro criou o Banco de Dados de DNA da Flora Brasileira (The DNA Bank of Brazilian Flora Species), o primeiro banco de dados genético de espécies de plantas brasileiras. Apesar desses recentes avanços, o uso de dados genéticos em taxonomia no Brasil tende a crescer mais, principalmente se levar em conta a estimativa de espécies ainda não descritas no país. De acordo com Marques e Lamas (2006), o número de espécies animais descritas no Brasil corresponde a pouco mais de 6% do total das espécies conhecidas no mundo todo, mas estima-se que esse número seja ainda maior. O Brasil é um país riquíssimo em biodiversidade e, por isso, a criação de bancos de dados genéticos se faz necessária para consolidar o conhecimento gerado por taxonomistas e sistematas do país. Atualmente,

taxonomistas brasileiros contam com o apoio de um programa federal de capacitação em taxonomia, o Protax, lançado em 2005 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em parceria com a Capes e o Ministério da Ciência e Tecnologia. Medidas como essa refletem a importância e, ao mesmo tempo, uma crescente necessidade de apoiar estudos voltados para a taxonomia da biodiversidade brasileira.

O surgimento da taxonomia molecular foi acompanhado de um fenômeno mundialmente conhecido como “impedimento taxonômico”. Pesquisadores argumentam que esse fenômeno é resultante da redução do número de taxonomistas e de publicações em taxonomia nas últimas décadas (ex.: Hopkins & Freckleton, 2002), enquanto outros alegam que os investimentos destinados à taxonomia tradicional estão sendo redirecionados para pesquisas com taxonomia molecular. Apesar de o número de taxonomistas ser satisfatório no Brasil, pelo menos para alguns grupos taxonômicos (*sensu* Carvalho, Bockmann, Amorim, Vivo, Toledo-Piza, et al. 2005), tornou-se cada vez mais difícil publicar descrições de espécies baseadas exclusivamente em dados morfológicos no mundo todo. Essa situação tem ocorrido principalmente por dois motivos: (1) o número de periódicos especializados que aceitam descrições taxonômicas tradicionais tem diminuído nos últimos anos; e (2) a crescente ideia de que descrições de táxons baseadas exclusivamente em dados morfológicos podem gerar incertezas taxonômicas na delimitação de espécies. Apesar desses conflitos entre taxonomistas tradicionalistas e taxonomistas moleculares, parece mais provável que o uso conjunto de dados genéticos e morfológicos pode contribuir muito mais para a taxonomia animal (*sensu* Lemey, et al. 2009; Will, Mishler & Wheeler, 2005) do que simplesmente adotar um ou outro método de forma isolada, já que ambas, morfologia e genética, são complementares e constituem fontes independentes de evidência.

A teoria evolutiva proposta pelo naturalista inglês Charles Darwin é o princípio fundamental que orienta a classificação da biodiversidade. O método taxonômico moderno tem como objetivo organizar a biodiversidade em uma hierarquia de grupos e subgrupos de acordo com o relacionamento evolutivo das espécies, que é definido pelo compartilhamento de caracteres homólogos. O filósofo grego Aristóteles foi o primeiro “taxonomista” de que se tem registro, a propor uma classificação de organismos baseada em

similaridades morfológicas. Centenas de anos depois de Aristóteles, o botânico sueco Carl Linnaeus criou um método de classificação taxonômica que é utilizado até os dias de hoje. Esse método, publicado e intitulado *Systema Naturae*, objetivava organizar a diversidade de espécies de plantas e animais com base na morfologia comparativa dos indivíduos.

O método de Linnaeus, conhecido como *nomenclatura binomial*, consiste em ordenar as espécies em uma série ascendente de grupos, formando um sistema hierárquico de classificação. Embora esse método seja bastante eficiente para nomear e organizar táxons, ainda hoje pode ser difícil, em um sentido taxonômico, delimitar uma espécie, especialmente porque o conceito de espécie vem sofrendo grandes mudanças nos últimos 200 anos. Atualmente, é possível destacar quatro tipos principais de conceito de espécie: (1) conceito tipológico ou morfológico, (2) conceito biológico, (3) conceito evolutivo e (4) conceito filogenético. Apesar da ampla discussão a respeito da validade dos diferentes conceitos de espécie, dados genéticos recentes parecem favorecer o conceito filogenético de espécie. O conceito filogenético de espécie vem conquistando cada vez mais espaço na comunidade científica, principalmente por ser menos restritivo que o conceito biológico de espécie e permitir o teste de hipóteses filogenéticas (*sensu* Wheeler, 1999), contribuindo, dessa forma, para estudos sobre a evolução de espécies.

A introdução da teoria evolutiva em taxonomia animal mudou o papel do taxonomista, que passou a “sistematizar” o conhecimento taxonômico. Segundo os fundamentos da teoria evolutiva, as espécies se encontram em constante mudança e, por essa razão, a natureza estática do método classificatório tornou-se antiquada para a taxonomia de organismos vivos (*sensu* Hennig, 1965). Essa lacuna foi preenchida com o surgimento da sistemática filogenética.

A sistemática filogenética foi proposta pelo entomologista alemão Willi Hennig em meados da década de 1960. De acordo com o método sistemático, uma espécie representa um conjunto de indivíduos que possuem uma descendência evolutiva comum. Essa visão de espécie tem fornecido subsídios para a realização de estudos em diversas áreas da biologia, tais como taxonomia, filogeografia e biogeografia. Assim como observado para a taxonomia, o uso de marcadores moleculares de DNA abriu caminho para outra importante linha de pesquisa em biologia: a sistemática molecular.

O relacionamento filogenético de espécies é, essencialmente, inferido com base na comparação de caracteres morfológicos. No entanto, a crescente viabilidade de informações genéticas tem estimulado o uso de marcadores moleculares de DNA, em conjunto com dados morfológicos, para inferir o relacionamento filogenético de diversos táxons. Basicamente, reconstruções filogenéticas baseadas em dados moleculares são inferidas a partir da análise comparativa de sequências homólogas de DNA ou proteína (Lemey, et al. 2009). O uso de dados moleculares de DNA avançou muito em sistemática, sobretudo nas últimas duas décadas, graças a algumas iniciativas, tais como: (1) criação de bases de dados filogenéticos, ex.: The Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org>), TreeBASE (<http://www.treebase.org>); (2) disponibilidade de programas de informática para inferência filogenética, ex.: PAUP (Swofford, 2001), MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), BEAST (Drummond & Rambaut, 2007); (3) infraestrutura computacional destinada à inferência de árvores filogenéticas, ex.: portal CIPRES (<http://www.phylo.org>); (4) crescente aplicação de métodos estatísticos para análise de sequências de DNA (ex.: máxima verossimilhança, máxima parcimônia, análise Bayesiana); e (5) possibilidade de sequenciar múltiplos *loci* de DNA. Interessantemente, Halanych (2004) demonstrou que o uso de múltiplos marcadores de DNA (ex.: genes mitocondriais, genes Hox, genes nucleares), associado a dados morfológicos, tem fornecido subsídios para teste de hipóteses sobre o relacionamento filogenético de vários filos de metazoários. Esses dados evidenciam como marcadores de DNA representam ferramentas importantes para reconstrução filogenética, sem necessariamente desconsiderar a contribuição de dados morfológicos dos táxons.

Taxonomia e sistemática filogenética representam uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (Lempe) da UFPR (ex.: Boeger & Kritsky, 1993, 1997; Boeger, Kritsky & Pie, 2003; Boeger, Vianna & Thatcher, 2006; Bueno-Silva & Boeger, 2009; Bueno-Silva, Boeger & Pie, 2011; Domingues & Boeger, 2008; Kritsky, Vianna & Boeger, 2006; Pie, Baggio, Boeger, Patella, Ostrensky, Vitule, et al. 2009; Vianna, Boeger & Silva, 2007). Até meados de 2000, os trabalhos de taxonomia e filogenia do Lempe eram exclusivamente baseados em dados morfológicos. Nos últimos dez anos, no entanto, a equipe do Lempe vem incluindo métodos de genética molecular em diversos tipos de pesquisas. O sequenciamento de DNA passou a ser uma ferramenta muito importante para estudos de taxonomia

e filogenia do laboratório. Um dos nossos trabalhos mais recentes (Bueno-Silva, et al. 2011) constitui um exemplo de como é possível (e até mesmo necessário) conciliar dados morfológicos e genéticos para compreender processos evolutivos e subsidiar a delimitação de espécies. Resumidamente, esse estudo usou como modelo um sistema parasito-hospedeiro para testar a hipótese de como uma espécie ectoparasita, *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva e Boeger, 2009 (Gyrodactylidae), compartilha duas espécies hospedeiras sintópicas de peixes, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) e *Corydoras ehrhardti* (Steindachner, 1910) (Callichthyidae). O estudo revelou que supra-populações de *G. corydori* de diferentes espécies hospedeiras eram morfológica e geneticamente distintas entre si. Os resultados desse estudo forneceram evidências importantes sobre a diversificação adaptativa e especiação de *Gyrodactylus*, com implicações, até mesmo, para a taxonomia desse grupo.

Em resumo, o uso de técnicas moleculares vem crescendo no mundo todo, especialmente nos últimos 20 anos, alcançando diversas áreas da biologia, como botânica, zoologia, ecologia, taxonomia, biologia da conservação, biotecnologia e sistemática filogenética. É inegável que a genética molecular tem contribuído imensamente para o desenvolvimento das ciências biológicas, mas acredito que o uso de técnicas moleculares não deve ser considerado a única fonte de evidência para estudos de taxonomia e sistemática filogenética. Alguns taxonomistas moleculares já admitem e defendem o uso integrado de morfologia e genética para caracterizar e delimitar espécies com maior precisão (ex.: taxonomia integrativa). Dados recentes sobre a situação da taxonomia zoológica no Brasil (Marques & Lamas, 2006) fazem refletir sobre a importância da criação e da manutenção permanente de programas de capacitação em taxonomia no país. Dentre os desafios de trabalhar com taxonomia molecular, destacam-se a demanda por infraestrutura adequada e alto investimento financeiro, indispensáveis para a execução e a manutenção de estudos com marcadores de DNA. A maioria dos reagentes químicos usados em procedimentos moleculares, atualmente, é obtida por meio de importação, e esse é um dos motivos que acabam desestimulando e dificultando o uso de métodos moleculares em biologia no Brasil. A disponibilidade de recursos financeiros é fundamental para a execução de estudos em taxonomia e sistemática, mas também é necessário que sejam estabelecidas medidas de redução de impostos para a compra de

reagentes químicos importados e, em longo prazo, incentivar a produção nacional desses reagentes. Apesar desses desafios, a taxonomia no Brasil, sem dúvida, tem potencial para continuar expandindo e se manter como uma das ciências mais promissoras do século XXI, particularmente nesse momento da história em que fragmentação e degradação ambiental demandam o conhecimento urgente da biodiversidade do país.

## Agradecimentos

Ao Dr. Walter Boeger e à equipe do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE-UFPR), ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo (processo n. 562258/2010-8), e à Dra. Marta Fischer (PUCPR) pelo convite para escrever este ensaio.

## Referências

- Awise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D. T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D., & Smerdon, G. R. (2006). Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *MEPS*, 320, 1-9. doi:10.3354/meps320001.
- Boeger, W. A., & Kritsky, D. C. (1993). Phylogeny and a revised classification of the Monogonoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes). *Systematic Parasitology*, 26, 1-32. doi:10.1007/BF00009644.
- Boeger, W. A., & Kritsky, D. C. (1997). Coevolution of the Monogonoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 27(12), 1495-1511. doi:10.1016/S0020-7519(97)00140-9.
- Boeger, W. A., Kritsky, D. C., & Pie, M. R. (2003). Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogonoidea). *Zoologica Scripta*, 32(5), 437-448. doi:10.1046/j.1463-6409.2003.00130.x.
- Boeger, W. A., Vianna, R. T., & Thatcher, V. E. (2006). Monogonoidea. In J. Adis, J. R. Arias, G. Rueda-Delgado & K. M. Wantzen (Ed.). *Aquatic Biodiversity in Latin America. Amazon Fish Parasite*. (2nd ed., pp. 42-116, Vol. 1). Sofia: Pensoft Publishers.
- Bueno-Silva, M., & Boeger, W. A. (2009). Neotropical Monogonoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidae: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. *Folia Parasitologica*, 56(1), 13-20.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W. A., & Pie, M. R. (2011). Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogonoidea: Gyrodactylidae). *International Journal for Parasitology*, 41(6), 657-667. doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.002.
- Carvalho, M. R., Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Vivo, M., Toledo-Piza, M., Menezes, N. A. et al. (2005). Revisiting the taxonomic impediment. *Science*, 307(5708), 353. doi:10.1126/science.307.5708.353b.
- Coleman, A. W. (2009). Is there a molecular key to the level of "biological species"? In eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 197-203. doi:10.1016/j.ympev.2008.10.008.
- Domingues, M. V., & Boeger, W. A. (2008). Phylogeny and revision of Diplectanidae Monticelli, 1903 (Platyhelminthes: Monogonoidea). *Zootaxa*, 1698, 1-40.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214.
- Egito, A. A., Albuquerque, M. S. M., Castro, S. T. R., Paiva, S. R., Marques, J. R. F., McManus, C., et al. (2005). Situação atual do banco de DNA de recursos genéticos animais no Brasil. *Archivos de Zootecnia*, 54, 206-207.
- Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCid:548581.
- Gross, R., Nilsson, J., & Schmitz, M. (1996). A new species-specific nuclear DNA marker for identification of hybrids between Atlantic salmon and brown trout. *Journal of Fish Biology*, 49(3), 537-540. doi:10.1111/j.1095-8649.1996.tb00049.x.
- Halanych, K. M. (2004). The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 229-256. doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130124.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, S96-S99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025.

- Hennig, W. (1965). Phylogenetic Systematics. *Annual Review of Entomology*, 10, 97-116. doi:10.1146/annurev.en.10.010165.000525.
- Hoareau, T. B., & Boissin, E. (2010). Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: Addressing the need for efficient COI amplification in the Echinodermata. *Molecular Ecology Resources*, 10, 960-967. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02848.x.
- Hopkins, G. W., & Freckleton, R. P. (2002). Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: Implications for conservation. *Animal Conservation*, 5, 245-249. doi:org/10.1017/S1367943002002299.
- Jarman, S. N., Ward, R. D., & Elliott, N. G. (2002). Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. *Journal of Marine Biotechnology*, 4(4), 347-355. doi:10.1007/s10126-002-0029-6.
- Kritsky, D. C., Vianna, R. T., & Boeger, W. A. (2006). Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with the proposal of *Phanerothecioides* n. g., *Onychogyrodactylus* n. g. and *Aglaigyrodactylus* n. g. (Polyonchoinea: Gyrodactylidae). *Systematic Parasitology*, 66(1), 1-34. doi:10.1007/s11230-006-9053-7.
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (2009). *The Phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* (2nd ed.). New York: Cambridge University Press.
- Marques, A. C., & Lamas, C. J. E. (2006). Taxonomia zoológica no Brasil: Estado da arte, expectativas e sugestões de ações futuras. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 46, 139-174. doi:10.1590/S0031-10492006001300001.
- Meinilä, M., Kuusela, J., Zięta, M. S., & Lumme, J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *International Journal for Parasitology*, 34(4), 515-526. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.002.
- Moszczyńska, A., Locke, S. A., McLaughlin, J. D., Marcogliese, D. J., & Crease, T. J. (2009). Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1), 75-82. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02634.x.
- Pamilo, P. (1988). Genetic variation in heterogeneous environments. *Annales Zoologici Fennici*, 25(1), 99-106.
- Pie, M. R., Baggio, R. A., Boeger, W. A., Patella, L. A., Ostrensky, A., Vitule, J. R., et al. (2009). Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguazu River. *Journal of Fish Biology*, 75, 2357-2362. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02438.x.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63-69. doi:10.1038/nrg1249.
- Swofford, D. L. (2001). *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and others methods)* (Version 4.0b10). Massachusetts: Sinauer Associates.
- Teneva, A. (2009). Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6), 1267-1284.
- Vences, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(1), 5. doi:10.1186/1742-9994-2-5.
- Vianna, R. T., Boeger, W. A., & Silva-Souza, A. T. (2007). Neotropical Monogenoidea. 52. *Diechodactylus joaberi* n. g., n. sp. from the banded knifefish *Gymnotus carapo* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in southeastern Brazil. *Systematic Parasitology*, 69(1), 45-50. doi:10.1007/s11230-007-9107-5.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738. doi:10.1038/171737a0.
- Wheeler, Q. D. (1999). Why the phylogenetic species concept? - Elementary. *Journal of Nematology*, 31(2), 134-141. PMID:19270883.
- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844-851. doi:10.1080/10635150500354878.