

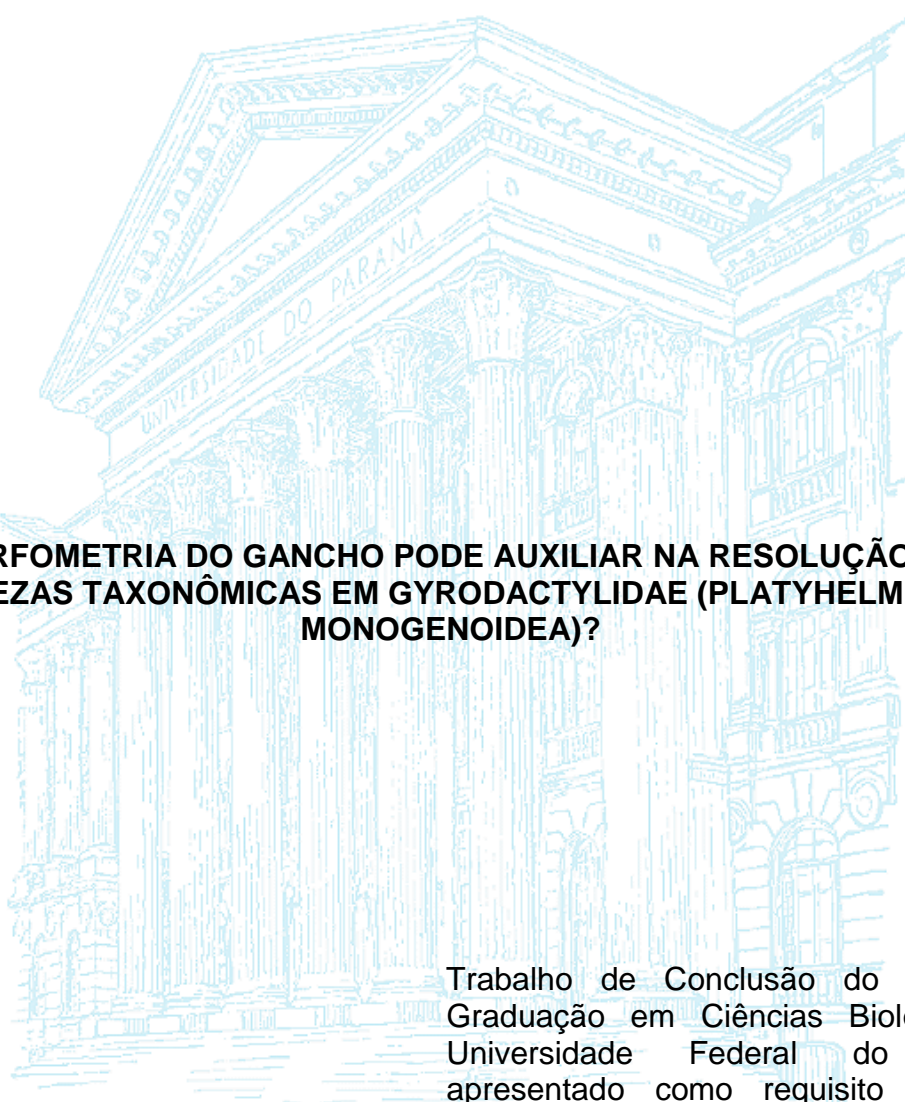
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALÍNI VIEIRA

**MORFOMETRIA DO GANCHO PODE AUXILIAR NA RESOLUÇÃO DE
INCERTEZAS TAXONÔMICAS EM GYRODACTYLIDAE (PLATYHELMINTHES:
MONOGENOIDEA)?**

CURITIBA
2015

ALINI VIEIRA



**MORFOMETRIA DO GANCHO PODE AUXILIAR NA RESOLUÇÃO DE
INCERTEZAS TAXONÔMICAS EM GYRODACTYLIDAE (PLATYHELMINTHES:
MONOGENOIDEA)?**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Walter A. Boeger.

**CURITIBA
2015**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada mãe e querida irmã.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a meu Professor e Orientador Walter Antônio Boeger, pois sem ele este trabalho não existiria. Obrigada a todos os ensinamentos, a sua dedicação, e até pelos necessários puxões de orelhas. Obrigada por participar de minha formação como bióloga.

Aos meus colegas de laboratório, desde o início vocês me ensinaram tudo o que puderam, desde a triar, até as práticas na molecular, e além, auxiliando em minha formação, e claro, às risadas também. Agradeço a todos: Luciana, Emanuel, Marcel, Taísa, Baggio, Letícia, Dayane, Carol S., Carolzinha.

Porém o principal agradecimento deve oferecer a meus familiares. Obrigada Mãe, por ter realmente me ensinado tudo que sei, e ter sido o meu modelo de mulher, minha fonte inspiradora que um dia quero me tornar. Obrigada a todo o seu apoio, sua força, dedicação em nos ensinar, e pelo o seu amor, pois sem ele, eu nada seria. Entretanto outra mulher que merece todo o meu agradecimento é minha irmã. Gostaria de demonstrar todo o meu agradecimento a você, que sempre foi minha fonte de inspiração, minha amiga, e sempre estaremos juntas, não importa o que acontecer. Obrigada por mostrar como uma mulher determinada se parece, alguém que nunca desiste. Agradeço as duas, pois devo á vocês tudo o que sou. Meus maiores amores.

Todavia devo agradecer a todos os meus amigos, pois sem eles minha formação não teria acontecido. Obrigada pelas horas de estudo, e também as horas que deveriam ser de estudos, porém viraram conversas. Obrigada a todas as risadas, até as risadas presas na garganta, em plena aula, onde tentar disfarçar era impossível. Obrigada por me aguentarem, desde a voz sempre alta demais, até meus dias péssimos, que me ajudaram a passar, nas aulas em que estava exausta e me mantiveram acordada e até aquelas que me deixaram dormir. Agradeço por me deixarem ser parte da vida de vocês. Amo á todos. Obrigada: Zanin, Trevisão, Zontta, Sari, Batata, Bib's, Duda, Jerônimo, Eder, Wagner, Kids e Henrique.

Um agradecimento especial a Alessandra, que desde o primeiro dia se tornou minha melhor amiga, e sei que sempre estaremos uma na vida da outra. Obrigada por realmente tudo, e agradeço por ser amiga dessa pessoa extraordinária que é, e parabéns pelo seu enorme comprometimento com sua formação, você também é minha fonte de inspiração.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO.....	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	3.1 Gyrodactylidae	15
	3.2 Morfometria Geométrica.....	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.	RESULTADOS	24
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO.....	31
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** *Gyrodactylus carolinae* (Boeger , W. A., et al, 2014). a, corpo inteiro (caixa cinza delimitando a região haptoral do parasito. b, região haptoral em destaque (flecha vermelha indicando localização do gancho). C, gancho com os três pontos anatômicos (landmarks) marcadelimitados. 20
- Figura 2.** Filogenia molecular do gene 18S (Boeger et al. In prep.). As diferentes cores dos ramos indicam agrupamentos monofiléticos utilizados para classificar cada espécie analisada. O nome das espécies é seguido pelo código da sequencia no GENBANK ou na coleção do LEMPE. 22
- Figura 3.** Análise de Componentes Principais realizada nos dados de Marcos Anatômicos. Cada cor representa um grupo filogenético. 24
- Figura 4.** Análise de Variável Canônica realizada nos dados de marcos anatômicos, onde cada cor representa um grupo filogenético. 25
- Figura 5.** Variação da Forma de Procrustes relativa aos dados dos contornos. Pontos azuis indicam a média da forma das 28 espécies analisadas, e pontos pretos mostram a variação da forma das espécies. 26
- Figura 6.** Análise de Componente Principal realizada com os dados dos contornos, cada cor indica um agrupamento filogenético. 27
- Figura 7.** Análise da Variável Canônica realizada com os dados dos contornos, onde cada cor representa um agrupamento filogenético. 28
- Figura 8.** Análise de Sinal Filogenético para os dados obtidos da Variável Canônica, relativo aos contornos. 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista com os Gêneros que fazem parte da família Gyrodactylidae. (Vianna, 2007, Vianna *et al*, 2007a, Vianna, *et al*, 2007b, Přikrylová e Luus-Powell, 2014). 15
- Tabela 2.** Espécies utilizadas na análise de morfometria geométrica. Primeira coluna: nome das espécies utilizadas. Segunda coluna: classificador que cada espécie recebeu. Terceira Coluna: artigos e livro de onde as imagens utilizadas foram retiradas. 21

RESUMO

Monogenoidea constitui um grupo diverso de ectoparasitos com ampla distribuição mundial. Gyrodactylidae possui aproximadamente 500 espécies vivíparas descritas até o momento, distribuídas em 25 gêneros. Análises filogenéticas morfológicas e moleculares indicam que o agrupamento de espécies de *Gyrodactylus* não representa um clado, portanto seu suporte evolutivo inexistente. *Gyrodactylus*, como os recentes resultados sugerem, deveria ser subdividido em diversos gêneros para que a classificação do grupo contenha exclusivamente táxons naturais. Todavia, um fato complicador é que o gênero possui mais de 400 espécies conhecidas, várias das quais representadas apenas por espécimes depositados em museus e cuja extração de DNA seria dificultada, limitada ou de excessiva capacidade destrutiva. Assim, este trabalho utiliza técnicas de morfometria geométrica para validar caracteres morfológicos que possam servir de indicadores da identidade genérica de cada espécie, mesmo aquelas para as quais o DNA é inacessível. Para a obtenção dos dados morfométricos foi utilizado o gancho, estrutura localizada na região haptoral, utilizada para a fixação do parasito sobre seu hospedeiro. As 28 espécies usadas foram retiradas de uma filogenia molecular, para verificar se os dados obtidos a partir da morfometria geométrica servem de diagnóstico para os clados propostos pela filogenia molecular. Os resultados mostram que dados encontrados pela morfometria geométrica do gancho são bons indicadores de grupos monofiléticos de *Gyrodactylus* (parafilético). Os dados são consistentes com o relacionamento filogenético das espécies de *Gyrodactylus* e, portanto, podem auxiliar na alocação genérica de espécimes que não possuem dados moleculares, dando apoio a estudos sistemáticos.

Palavras-chaves: Análise da Forma, Gancho, *Gyrodactylus*.

ABSTRACT

Monogeneoidea is a diverse group of ectoparasites with worldwide distribution. Gyrodactylidae has approximately 500 viviparous species described to date, distributed in 25 genera. Morphological and molecular phylogenetic analyzes indicate that the grouping of species *Gyrodactylus* does not represent a clade thus their evolutionary support does not exist. *Gyrodactylus*, as recent results suggest, should be subdivided into different genera to the group's classification contains exclusively natural taxa. However, one complicating fact is that the genus contains over 400 species, many of which represented only by specimens deposited in museums and for which DNA extraction would be impossible or excessively limited and/or destructive. This work uses geometric morphometric techniques to validate morphological characters that can use as indicators of the generic identity of each species, even those for which the DNA is inaccessible. To obtain the morphometric data we used the hook structure located in haptor region, used for fixing the parasite on its host. The 28 species used were taken from a molecular phylogeny, to verify that the data obtained from the geometric morphometric serve as a diagnostic for clades proposed by molecular phylogeny. The findings strongly suggest that the geometric morphometrics of hooks is a good proxy of monophyletic groups within the non-monophyletic *Gyrodactylus*. The data are consistent with the phylogenetic relationships of *Gyrodactylus* species and thus may help in the general allocation specimens that have no molecular data, supporting systematic studies.

Key-Words: *Gyrodactylus*, Form Analysis, Hook.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os Gyrodactylidae vivíparos, *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 é o gênero mais diverso (Boeger *et al.*, 2003), com aproximadamente 500 espécies descritas até o momento (Harris *et al.*, 2008). Os Gyrodactylidae vivíparos estão distribuídos em 27 gêneros, porém alguns desses apresentam problemas taxonômicos (Vianna, 2007, Vianna *et al.*, 2007a, Vianna, *et al.*, 2007b).

A alta diversificação dos Gyrodactylidae vivíparos, segundo Boeger *et al.* (2003), se deve à facilidade desses parasitos trocarem de hospedeiro e, dessa forma, conquistar novos ambientes geográficos. Essa capacidade está associada às características da biologia de *Gyrodactylus* (e.g. dispersão durante a fase adulta e hiperviviparidade) (Boeger *et al.*, 2003). Por outro lado, a ampla distribuição e diversidade de espécies de *Gyrodactylus* sugere que o conhecimento taxonômico do grupo é ainda subestimado (*sensu* Bakke *et al.*, 2007).

A identificação dos Gyrodactylidae é baseada, essencialmente, na morfologia comparada de estruturas esclerotizadas do háptor, tais como âncoras e ganchos. Com base em dados morfométricos dessas estruturas, é possível diferenciar espécies crípticas e detectar linhagens de espécies parasitas (Shinn *et al.*, 1996, 2001, 2004; Bueno-Silva e Boeger, 2009; Vignon e Sasal, 2010; Bueno-Silva *et al.*, 2011). Porém, as estruturas esclerotizadas do háptor podem apresentar alta variação na forma e tamanho em diferentes condições bióticas e abióticas (MalMBERG, 1970; Mo 1991a, b; Harris, 1998; Geets *et al.*, 1999; Dmitrieva e Dimitrov, 2002; Huyse e Volckaert, 2002; Dávidová *et al.*, 2005), e isso pode causar confusão taxonômica na delimitação das espécies, e até mesmo reduzir a confiabilidade do uso desses caracteres na definição e diagnose de grupos supraespecíficos. Parte desse problema tem sido resolvido com a ajuda de marcadores moleculares de DNA, os quais têm sido amplamente usados em estudos de taxonomia e filogenia de Gyrodactylidae (Harris, 1998; Huyse e Volckaert, 2002; Cunningham e Mo, 1997; Matejusová *et al.*, 2001).

O sequenciamento de DNA mitocondrial (mtDNA) tem contribuído na identificação de espécies e linhagens de *Gyrodactylus* (Huyse e Volckaert, 2002; Huyse *et al.*, 2003; Meinilä *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2007a, b, Bueno-Silva *et al.*, 2011). Embora marcadores moleculares de mtDNA tenham revelado dados relevantes para a taxonomia desses parasitos, o uso exclusivo de dados

moleculares não permite uma delimitação satisfatória de unidades taxonômicas reconhecidas com base na morfologia (Hansen *et al.*, 2007a), o que tem provocado incertezas na identificação e caracterização de espécies de Gyrodactylidae.

Segundo Kritsky e Boeger (2003) e Matejusová *et al.* (2003), evidências filogenéticas sugerem *Gyrodactylus* como não monofilético. Esses autores não encontraram evidências genéticas para suportar grupos de espécies de *Gyrodactylus*. Embora marcadores moleculares possam ser eficientes no diagnóstico dos clados de *Gyrodactylus*, diversos espécimes estão disponíveis apenas fixados, cujo DNA é de difícil sequenciamento (e.g. espécimes de museu). Por esse motivo, a demarcação de características morfológicas diagnósticas é essencial para permitir o estabelecimento de um sistema natural de classificação para espécies de *Gyrodactylus*. Malmberg (1998) tentou, com aparente sucesso, resolver esse problema taxonômico através das características morfológicas do sistema excretor, mas essas estruturas só são passíveis de observação em animais vivos. Ferreira (2010) avaliou se características morfológicas dos ganchos de *Gyrodactylus* spp. podem subsidiar a delimitação de caracteres morfológicos na delimitação de grupos de espécies de Gyrodactylidae. A autora demonstrou a eficiência de algumas características na definição de agrupamentos indicados pela filogenia molecular, mas a escolha de alguns caracteres demonstrou ambiguidade nos resultados. Um método que pode ser promissor na definição de agrupamentos que podem representar gêneros atualmente incluídos em *Gyrodactylus* é a morfometria geométrica. Diferente da morfometria tradicional que analisa medidas descritivas de comprimento, altura e largura, a morfometria geométrica analisa a forma utilizando pontos anatômicos identificáveis, que são visualizados em um plano cartesiano. Sendo forma as informações geométricas remanescentes, quando os efeitos de rotação, translação e escala são retirados de um objeto (Stegmann e Gomez, 2002).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o uso integrado de técnicas morfométricas e moleculares na delimitação de espécies de Gyrodactylidae, auxiliando na divisão de *Gyrodactylus*, na tentativa de resolver a questão taxonômica do gênero. A técnica de morfometria geométrica é utilizada comparativamente com filogenia molecular já existente construída com o gene ribossomal 18S (Boeger *et al.*, In Prep.) para auxiliar no diagnóstico morfológico e resolução taxonômica.

2. OBJETIVO

- Verificar se a separação dos agrupamentos filogenéticos pela análise da forma é compatível àquela verificada em filogenia molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gyrodactylidae

Gyrodactylidae Bychowsky, 1937 apresenta grande diversidade de espécies, comportando gêneros ovíparos e vivíparos (Boeger, *et al*, 2003). Porém, anteriormente, as espécies ovíparas pertenciam a uma família distinta, sendo proposta por Harris, 1983, conhecida como Oogyrodactylidae. Entretanto, estudos filogenéticos mostraram que as espécies ovíparas eram representantes de Gyrodactylidae, apresentando uma posição mais basal dentro da filogenia desse grupo (Boeger *et al*. 1994).

Para Gyrodactylidae são conhecidos sete gêneros ovíparos, sendo seus representantes: *Aglaiogyrodactylus*, *Hyperoletes*, *Nothogyrodactylus*, *Onychogyrodactylus*, *Oogyrodactylus*, *Phanerothecioides* e *Phanerothecium*. Esses gêneros comportam ao todo 21 espécies (Tabela 1). Para as espécies vivíparas são conhecidos 27 gêneros, entre eles: *Acanthoplacatus*, *Accessorius*, *Afrogyrodactylus*, *Anacanthocotyle*, *Anguilladactylus*, *Archigyrodactylus*, *Diplogyrodactylus*, *Diechodactylus*, *Fundulotrema*, *Gyrdicotylus*, *Gyrodactyloides*, *Gyrodactylus*, *Iredactylus*, *Isancistrum*, *Laminiscus*, *Limnogyrodactylus*, *Macrogyrodactylus*, *Mesogyrodactylus*, *Metagyrodactylus*, *Micropolyclithrum*, *Mormyroglyrodactylus*, *Paragyrodactylus*, *Polyclithrum*, *Postgyrodactylus*, *Scleroductus*, *Scutalatus* e *Swingleus* (Tabela 1), para esses gêneros são aceitas atualmente 469 espécies.

Tabela 1. Lista com os Gêneros que fazem parte da família Gyrodactylidae. (Vianna, 2007, Vianna *et al*, 2007a, Vianna, *et al*, 2007b, Přikrylová e Luus-Powell, 2014).

Forma de Reprodução	Gêneros	Número de Espécies	Referência
Ovíparos	<i>Aglaiogyrodactylus</i>	7	Kritsky, <i>et al</i> , 2007.
	<i>Hyperoletes</i>	1	Boeger, <i>et al</i> , 1994.
	<i>Nothogyrodactylus</i>	3	Kritsky e Boeger, 1991.
	<i>Onychogyrodactylus</i>	2	Vianna e Boeger, 2007.
	<i>Oogyrodactylus</i>	1	Harris, 1983.
	<i>Phanerothecioides</i>	1	Kritsky, <i>et al</i> , 2007.
	<i>Phanerothecium</i>	6	Kritsky e Thatcher, 1977.
		Total: 21	
	<i>Acanthoplacatus</i>	7	Ernst, <i>et al</i> , 2000.
	<i>Accessorius</i>	1	An, <i>et al</i> , 1991.
	<i>Afrogyrodactylos</i>	3	Paperna, 1968.
	<i>Anacanthocotyle</i>	1	Kritsky e Fritts, 1970.
	<i>Anguilladactylus</i>	1	Glaser, 1978.

	<i>Archigyrodactylus</i>	3	Mizelle e Kritsky, 1967.
	<i>Diplogyrodactylus</i>	1	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2009.
	<i>Diechodactylus</i>	1	Vianna, <i>et al</i> , 2008.
	<i>Fundulotrema</i>	6	Kritsky e Thatcher, 1977.
	<i>Gyrdicotylus</i>	1	Vercamen-Grandjean, 1960.
	<i>Gyrodactyloides</i>	5	Bychowsky e Polyanski, 1953.
	<i>Gyrodactylus</i>	409	Nordmann, 1832.
	<i>Ieredactylus</i>	1	Schelke, <i>et al</i> , 2011.
Vivíparos	<i>Isancistrum</i>	2	De Beauchamp, 1912.
	<i>Laminiscus</i>	2	Pálsson e Beverly-Burton, 1983.
	<i>Limnogyrodactylus</i>	1	Glaser, 1978.
	<i>Macroglyrodactylus</i>	7	Malmberg, 1956.
	<i>Mesogyrodactylus</i>	1	Glaser, 1978.
	<i>Metagyrodactylus</i>	1	Yamaguti, 1963.
	<i>Micropolyclithrum</i>	1	Skinner, 1975.
	<i>Mormyrogyrodactylus</i>	1	Luus-Powell, <i>et al</i> , 2003.
	<i>Paragyrodactylus</i>	2	Szidat, 1973.
	<i>Polyclithrum</i>	5	Rogers, 1967.
	<i>Postygyrodactylus</i>	1	Glaser, 1978.
	<i>Scleroductus</i>	2	Jara e Cone, 1989.
	<i>Scutalatus</i>	1	Vianna, <i>et al</i> , 2007.
	<i>Swingleus</i>	2	Rogers, 1969.
Total: 469			

Gyrodactylus apresenta o maior número de espécies (409 espécies) em comparação aos outros gêneros que estão incluídos em Gyrodactylidae (Tabela 1). As principais características encontradas para definir as espécies desse gênero são: vitelária em forma de H, sendo ela reduzida ou modificada no tronco posterior; cecos intestinais não-confluentes; esclerito R1 ausente; âncoras presentes; dezesseis ganchos distribuídos radialmente na margem do háptor; e barra acessória ausente (Vianna, 2007).

Essa grande diversidade resultou em artigos sobre a evolução das espécies alocadas em *Gyrodactylus*. A primeira proposta foi realizada por Malmberg (1970), que iniciou essa discussão com a sugestão de criar seis subgêneros que seriam diferenciados no sistema protonefridial, utilizando também estruturas reprodutivas e do háptor. Boeger *et al.* (2003) propõem que a grande variação dos girodactylídeos vivíparos ocorreu por radiação adaptativa através de troca de hospedeiro. Essa habilidade de especiar por troca de hospedeiros parece relacionada com características apomórficas e simplesiomórficas encontradas nos representantes vivíparos. As características simplesiomórficas encontradas são o ciclo de vida monoxênico, a perda de fase de oncomiracídeo, mudança de hospedeiros durante

seu ciclo de vida, a partir de uma estratégia de estágio pré-adulto/adulto. Os caracteres apomórficos encontrados nas espécies vivíparas são o desenvolvimento progenético, hiperviviparidade, protogenia, partenogênese e a perda do adesivo encontrado nos ovos das espécies ovíparas (Boeger *et al*, 2003).

3.2 Morfometria Geométrica

Segundo Oxnard (1978), a morfometria geométrica deve ser utilizada para elucidar problemas sistemáticos e evolutivos, enquanto a morfometria tradicional pode ser utilizada para a classificação de uma espécie, como em chaves de identificação. A morfometria tradicional utiliza distâncias e medidas de estruturas, e a morfometria geométrica utiliza pontos em regiões homólogas de uma estrutura, plotadas em um plano cartesiano.

Os métodos estatísticos desenvolvidos por Karl Pearson, a partir de 1880, foram essenciais para o desenvolvimento das análises morfométricas em geral. Com seus métodos, foi possível observar correlações entre medidas retiradas de objetos biológicos. Porém, após os trabalhos de Pearson, os primeiros trabalhos usando morfometria apresentavam apenas os problemas encontrados nesse método. Um dos primeiros trabalhos abordando a metodologia que pode ser usada na obtenção de medidas de dados biológicos foi o trabalho de Oxnard (1978), no qual são discutidos parâmetros que podem ser utilizados em um trabalho de morfometria geométrica.

A partir da década de 80, o ramo da morfometria se tornou mais completo com o desenvolvimento de métodos para a obtenção de imagens e análises computacionais, que facilitaram o processo de aquisição de dados. Nesse período, diversos trabalhos publicados foram significantes para a área (Bookstein, 1982, Rohlf 1990), auxiliando em sua elucidação e desenvolvimento.

A morfometria geométrica, conforme Bookstein (1982), é a interação de informações retiradas de coordenadas geométricas e a homologia de estruturas. A área da morfometria quantitativa teve grande ampliação nas últimas décadas, principalmente devido à formulação de análises estatísticas e desenvolvimento de softwares, os quais auxiliam na obtenção e análise de dados.

Para que as análises da forma de uma estrutura sejam realizadas, alguns pontos devem ser definidos. Como é o caso da obtenção dos pontos anatômicos -

landmarks - nas estruturas analisadas. Esses pontos podem ser classificados em três tipos (Bookstein, 1991). O tipo 1 é caracterizado pela justaposição de tecidos, sendo um ponto de encontro entre estruturas. O tipo 2 é formado por pontos de máxima curvatura ou criado por processos morfogenéticos. O tipo 3 é reconhecido por pontos extremos em uma estrutura, como uma região sobressalente, ou pontos de maior distância medida. Além dos marcos anatômicos, outro tipo de dado que pode ser obtido é o contorno da estrutura estudada. Esse é caracterizado pela descrição da forma *-pseudolandmarks-*, nos quais pontos não homólogos são distribuídos ao longo do contorno da imagem.

A área da morfometria geométrica tem apresentado diferentes trabalhos. Sua utilização mais comum é para demonstrar o dimorfismo sexual (Fabre, A. C., *et al*, 2014, Kimmerle, E. H. *et al*, 2008), assim como observar a variação morfológica de uma população (Neustupa, J. e Škaloud, P., 2007, Gonçalves, P. H. P., 2010), diferenças de forma entre espécies de laboratório e ambiente (Jaramillo. O. N. *et al*, 2002), mudanças de forma (Chollet, M. B., *et al*, 2014), dentre outras utilizações. Vignon e Sasal, 2010, utilizaram a morfometria geométrica em *Monogenoidea* para verificar a diferença de forma da âncora e da barra, que fazem parte da região haptoral do parasito, entre quatro populações. Em seu trabalho os autores relatam os aspectos positivos do uso da morfometria geométrica quando comparada à tradicional, já que é analisada a forma da estrutura, e não apenas medidas e comprimentos que podem trazer interpretações incorretas sobre a relação com suas variáveis. Outros artigos utilizam a âncora analisando a plasticidade fenotípica dessa estrutura em *Ligophorus cephalis* (Rodríguez-González, *et al*, 2015), e também para integração morfológica e genética *Ligophorus* (Khang, *et al*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na utilização das técnicas morfométricas, o gancho foi escolhido. Os ganchos compõem um conjunto de estruturas rígidas localizadas na região haptoral do parasito, e são utilizados na fixação em seu hospedeiro (Figura 1). Os ganchos apresentam forma bastante variada que aparentemente reflete a proximidade filogenética de espécies de *Gyrodactylus*. A morfologia dessa estrutura é de difícil definição, como sugere o trabalho Ferreira (2010). Assim, a morfometria geométrica será utilizada como um descritor de forma dessas estruturas.

Existem 16 ganchos (oito pares) nos Gyrodactylidae que, na maioria das vezes, não apresentam variação perceptível na forma e tamanho. Os ganchos são compostos por um *hooklet* e uma haste (Figura 1). A morfologia do *hooklet* é considerada importante como caracteres taxonômicos e é composta pela ponta, lâmina, bico, calcanhar, e plataforma (Figura 1).

Nesse estudo, dados obtidos a partir dos *landmarks* foram analisados inicialmente e, subsequentemente, foi realizada a análise do contorno da forma (*pseudolandmarks*) a qual foi estudada em conjunto com os *landmarks*.

Os marcos anatômicos escolhidos (segundo Bookstein, 1991) e a sua localização (Figura 1) são as seguintes: 1. a ponta do gancho (Tipo de Marco 2 - Pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais), 2. a região de inserção da haste na base do gancho (Tipo de Marco 1 - Justaposição de tecidos) e 3. o bico (*thumb*) (Tipo de Marco 2 - Pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais).

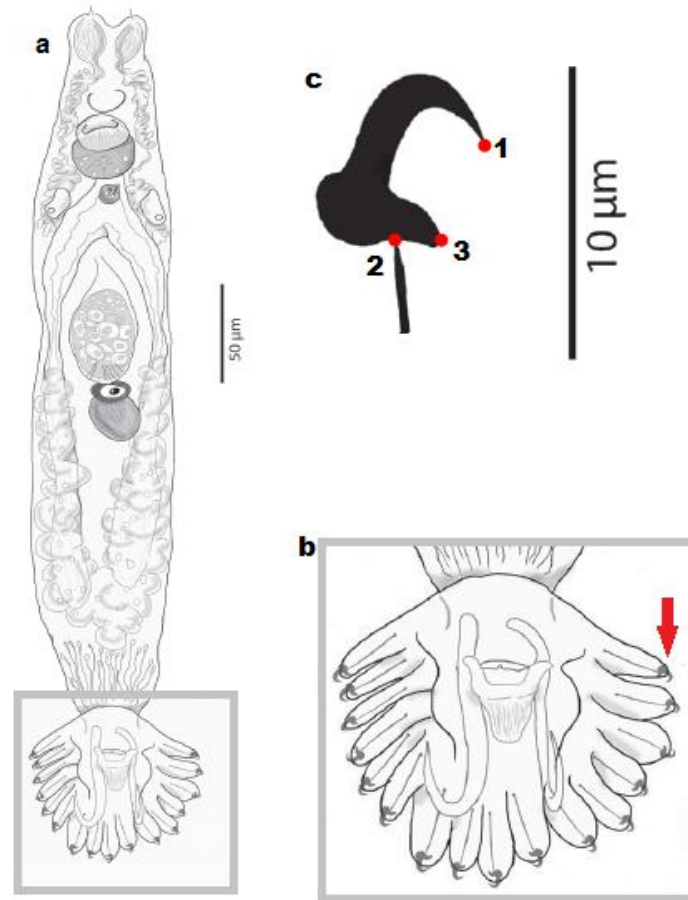


Figura 1. *Gyrodactylus carolinae* (Boeger , W. A., et al, 2014). a, corpo inteiro (caixa cinza delimitando a região haptoral do parasito. b, região haptoral em destaque (flecha vermelha indicando localização do gancho). C, gancho com os três pontos anatômicos (landmarks) marcadelimitados.

Além dos marcos anatômicos escolhidos, foi também realizada a análise do contorno do gancho – *pseudolandmarks*. Os pontos do contorno foram distribuídos na seguinte ordem, 25 pontos entre a ponta e a inserção da haste na base (entre pontos 1-2), 15 pontos entre a base e o bico (entre pontos 2-3), e outros 25 pontos entre o bico e a ponta do gancho (entre landmarks 3-1).

As espécies foram definidas de acordo com a sua disponibilidade em uma filogenia molecular existente (Boeger *et al.*, em preparação) , totalizando 28 espécies (Tabela 2), distribuídas em oito gêneros: *Aglaigyrodactylus*, *Diechogyrodactylus*, *Diplogyrodactylus*, *Gyrodactylus*, *Iredactylus*, *Macrogyrodactylus*, *Onychogyrodactylus* e *Swingleus*. As imagens das espécies analisadas foram obtidas de artigos e trabalhos científicos conforme indicado na Tabela 2.

Os classificadores são parte essencial para que as análises sejam realizadas, porém o tipo de classificador depende do objetivo específico do trabalho. Como no presente caso, objetivo é verificar se as espécies encontradas na filogenia molecular

apresentam uma divisão similar à dos dados obtidos das análises morfométricas, grupos foram criados a partir de grupos monofiléticos da filogenia molecular. Cada espécie recebeu um número de identificação, referente à sua posição na filogenia (compare Figura 2 e Tabela 2).

Tabela 2. Espécies utilizadas na análise de morfometria geométrica. Primeira coluna: nome das espécies utilizadas. Segunda coluna: classificador que cada espécie recebeu. Terceira Coluna: artigos e livro de onde as imagens utilizadas foram retiradas.

Espécie	Classificadores	Referências das Imagens
<i>Aglaogyrodactylus calumus</i>	01E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Aglaogyrodactylus coneii</i>	02E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Aglaogyrodactylus ctenistus</i>	03E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Aglaogyrodactylus pedunculatus</i>	04E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Aglaogyrodactylus salebrosus</i>	05E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Diechodactylus joaberi</i>	06C3	Vianna, R. T., <i>et al</i> , 2008.
<i>Diplogyrodactylus martini</i>	07A0	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2009.
<i>Gyrodactylus alekosi</i>	08B0	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2012.
<i>Gyrodactylus carasii</i>	09B0	Ergens, R., 1988.
<i>Gyrodactylus corydori</i>	10D0	Bueno-Silva, M., Boeger, W., 2009.
<i>Gyrodactylus ergensi</i>	11C3	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2009.
<i>Gyrodactylus gobiensis</i>	12C2	Gusev, A. V., 1985.
<i>Gyrodactylus malalai</i>	13C3	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2012.
<i>Gyrodactylus rhodei</i>	14C2	Gusev, A. V., 1985.
<i>Gyrodactylus rutilensis</i>	15C2	Gusev, A. V., 1985.
<i>Gyrodactylus rysavyi</i>	16B0	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2012.
<i>Gyrodactylus salaris</i>	17C2	Gusev, A. V., 1985.
<i>Gyrodactylus salmonis</i>	18C2	Rubio-Godoy, <i>et al</i> , 2012.
<i>Gyrodactylus sedelnikowi</i>	19B0	Gusev, A. V., 1985.
<i>Gyrodactylus superbus</i>	20D0	Popazoglo, F., Boeger, W. A., 2000.
<i>Gyrodactylus synodonti</i>	21B0	Přikrylová, I., <i>et al</i> , 2012.
<i>Gyrodactylus carolinae</i>	22C1	Boeger, W. A., <i>et al</i> , 2014.
<i>Ieredactylus rivuli</i>	23A0	Schelke, B., <i>et al</i> , 2011.
<i>Macrogyrodactylus congolensis</i>	24A0	Arafa, S. Z., 2011.
<i>Macrogyrodactylus polypteri</i>	25A0	Přikrylová, I., Gelnar, M., 2008.
<i>Macrogyrodactylus simentiensis</i>	26A0	Přikrylová, I., Gelnar, M., 2009.
<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	27E0	Kritsky, D. C., <i>et al</i> , 2007.
<i>Swingleus ancistrus</i>	28C1	Billeter, P. A. <i>et al</i> , 2000.

Para a obtenção dos *landmarks* e *pseudolandmarks*, dois programas do pacote TPS (*Thin Plate Spline*) foram utilizados (disponível em <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>). Desenvolvido por F. James Rohlf, da Universidade de Stony Brook em Nova York, é possível encontrar nesse pacote diversos softwares que abrangem a área da morfometria geométrica, além de análises e bibliografia. Para a obtenção das coordenadas x e y dos *landmarks* e *pseudolandmarks* de cada espécie, o programa tpsDig Version 2.17 foi aplicado às imagens dos ganchos (Rohlf, 2013), assim como o software tpsDig Version 2.17 (Rohlf, 2013). Para

minimizar o erro na obtenção dos marcos anatômicos homólogos e das curvaturas de cada espécie, essa demarcação (coordenadas x e y) foi realizada três vezes, em dias distintos. Posteriormente, uma média das três marcações para cada espécie foi utilizada nas análises. Nesse estágio, cada espécie recebeu uma classificação (Tabela 2) de acordo com sua localização na filogenia molecular (Figura 2), para verificar se a divisão pela morfometria geométrica é similar à encontrada nos dados moleculares.

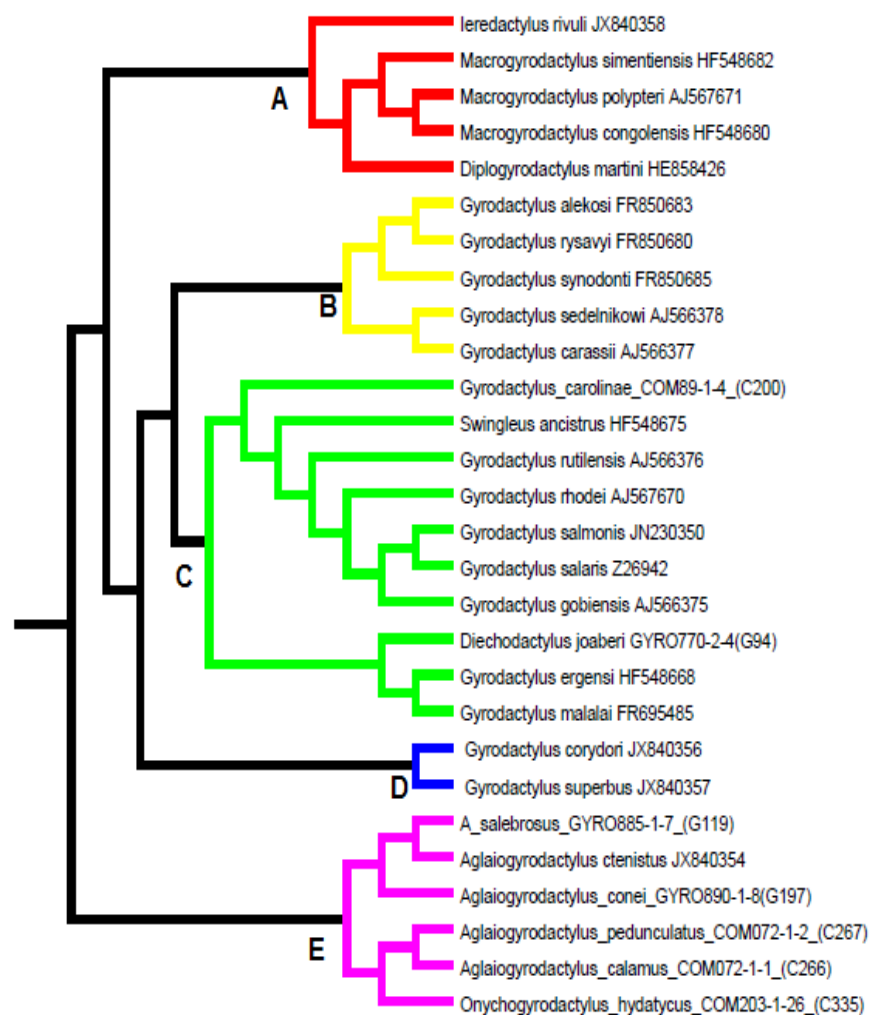


Figura 2. Filogenia molecular do gene 18S (Boeger *et al.* In prep.). As diferentes cores dos ramos indicam agrupamentos monofiléticos utilizados para classificar cada espécie analisada. O nome das espécies é seguido pelo código da sequência no GENBANK ou na coleção do LEMPE.

O programa MorphoJ Version 1.06c (Klingenberg, 2011) foi utilizado para a realização das análises. Na análise de dados morfométricos alguns problemas

podem ser encontrados, como o tamanho, posição e orientação da imagem. Porém, a análise de forma de Procrustes corrige esses efeitos. Isso ocorre a partir de um ponto chamado de centróide, que é estabelecido em cada imagem, no qual é verificada a melhor posição para que os marcos de todos os pontos se tornem o mais próximos possíveis, sem alterar a forma da estrutura. Portanto a análise da forma Procrustes (Rohlf e Slice, 1990) é um dos primeiros passos para a análise dos dados. Subsequentemente, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para verificar a existência de padrões no conjunto de dados obtidos, segundo a morfologia dos ganchos. A análise de variável canônica (CVA), a qual maximiza a variação nos grupos conhecidos anteriormente, foi aplicada em seguida. Finalmente, foi realizada a análise de sinal filogenético (Klingenberg e Gidaszewski, 2010), na qual a filogenia molecular e os dados morfológicos são analisados conjuntamente, verificando se existe consistência entre a divisão morfológica e a molecular (significância de $p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Os dados que apresentam um grau de confiabilidade maior são os *landmarks*, pois representam pontos anatômicos facilmente reconhecidos. Portanto, eles foram analisados inicialmente. A análise de Procrustes foi realizada, para o redimensionamento das imagens das 28 espécies, retirando os problemas de tamanho, posição e orientação.

Após os classificadores serem extraídos e a matrix de covariância ser realizada, a análise de componentes principais (PCA) (Figura 3) demonstra que os Grupos C, B e E possuem uma delimitação clara quando observado a PC1 em relação aos outros 2 grupos restantes, que se encontram dispersos pelo gráfico. A variância dos dados é explicada em 93,235% pela PC1, enquanto que a PC2 representa 6,765% do total dessa variação.

Outro aspecto a ser ressaltado, é que as espécies 06C3 e 23A0, sendo *Diechodactylus joaberi* e *Ieredactylus rivuli* respectivamente, estão distantes dentro da filogenia, e fazem parte de espécies de outros gêneros.

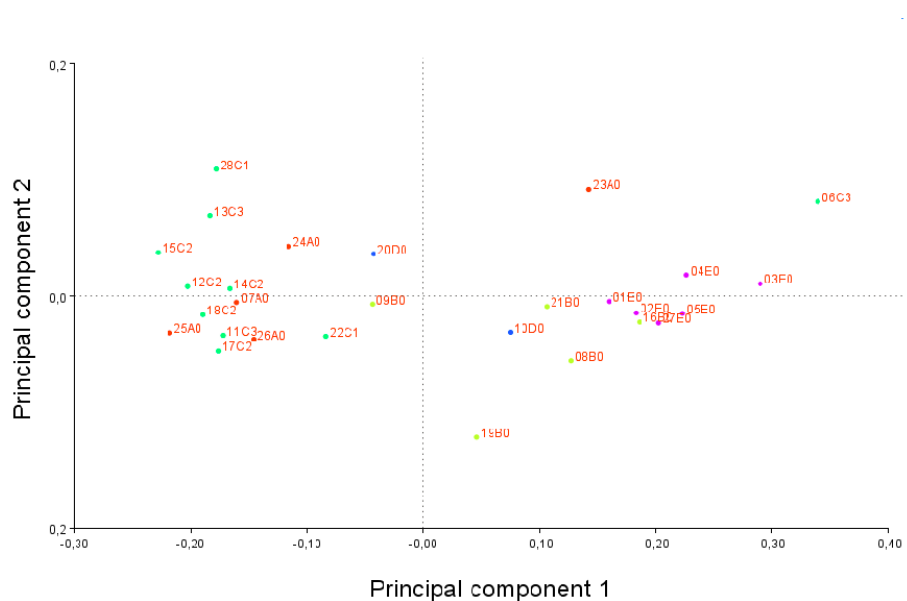
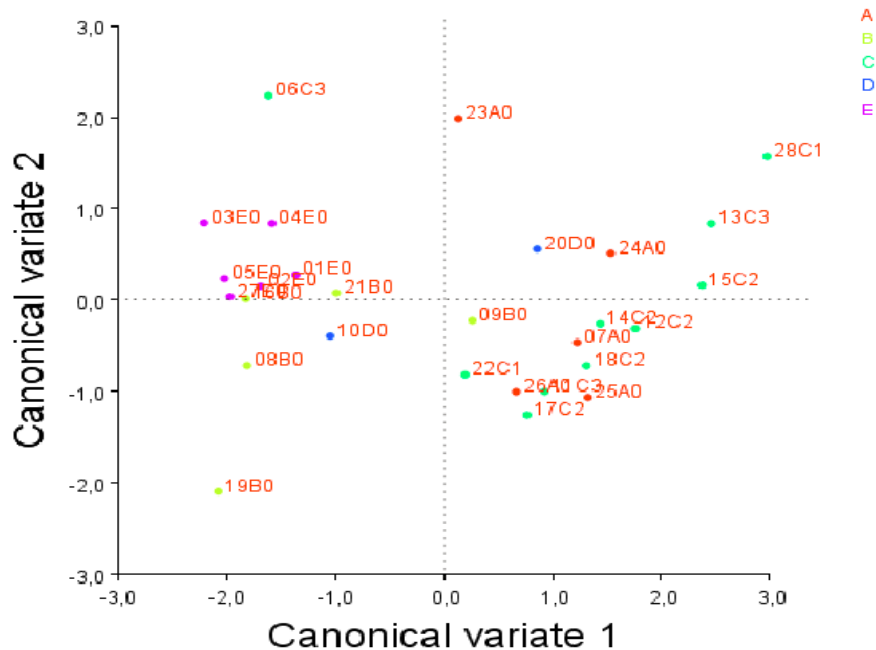


Figura 3. Análise de componentes principais realizada nos dados de marcos anatômicos. Cada cor representa um grupo filogenético.

Os resultados obtidos a partir da análise da variável canônica (Figura 4) confirma a existência dos grupos a priori sugeridos pela PCA. As espécies

Diechodactylus joaberi (06c3) e *Ierodactylus rivuli* (23A0) também mantiveram a configuração observada anteriormente na PCA.



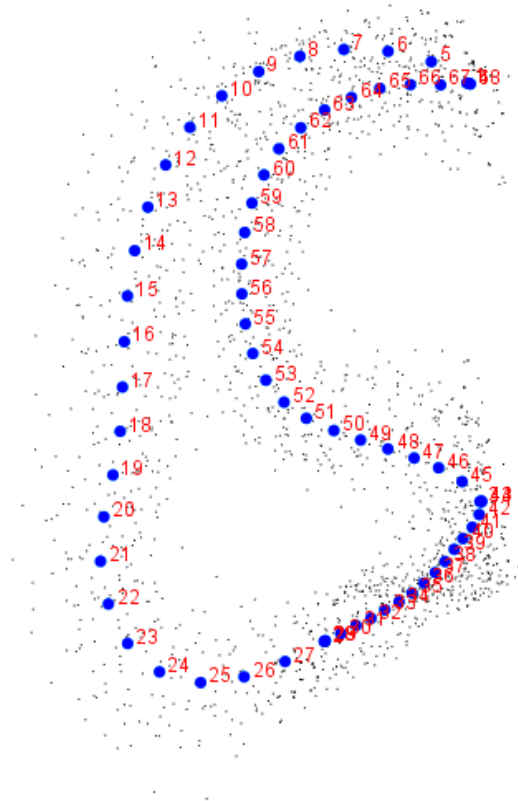


Figura 5. Variação da forma de Procrustes relativa aos dados dos contornos. Pontos azuis indicam a média da forma das 28 espécies analisadas, e pontos pretos mostram a variação da forma das espécies.

Para a análise de componentes principais (Figura 6) os grupos filogenéticos C, B e E apresentam certa delimitação, a qual pode ser observada na PC1 (52,1% da variação). A PC2 possui a representatividade de 23,07% da variância da forma, seguida pela PC3 que possui o valor de 9,9%. As componentes principais imediatas apresentam menos que 6% de representação na variação da forma.

As espécies *Iredactylus rivuli* (23A0) e *Macrogyrodactylus simentiensis* (26A0), integrantes do grupo A, não são observadas próximas de seu agrupamento filogenético, assim como *Diechogyrodactylus joaberi* (06C3), a qual faz parte do grupo C. Essas observações podem ser vistas também nos dados obtidos das análises dos *landmarks*.

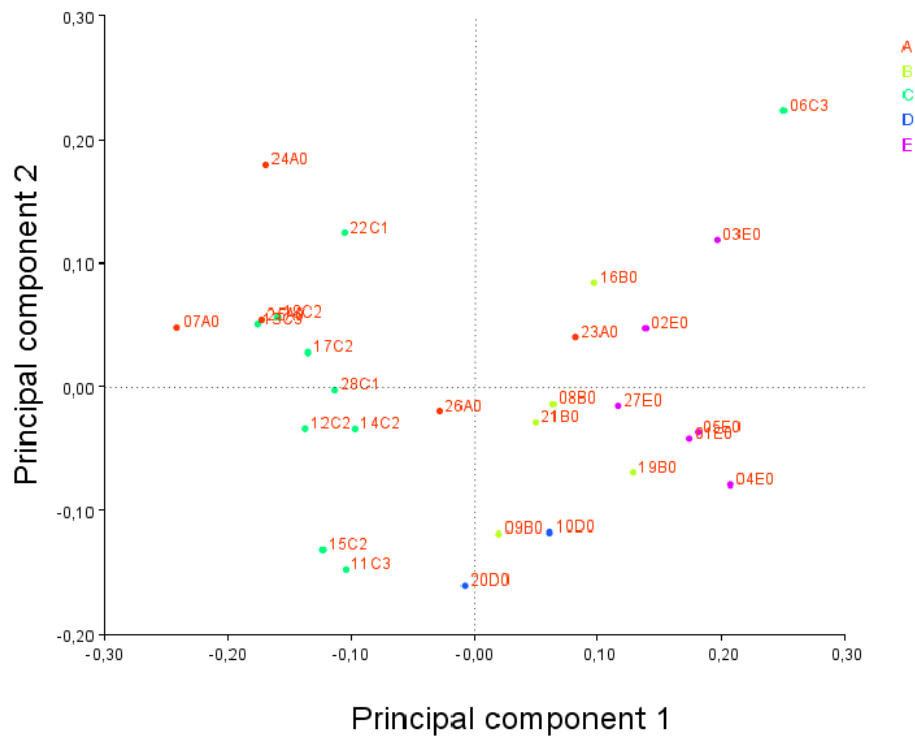


Figura 6. Análise de componente principal realizada com os dados dos contornos, cada cor indica um agrupamento filogenético.

A análise de variável canônica distingue os 5 grupos filogenéticos segundo os dados morfológicos (Figura 7).

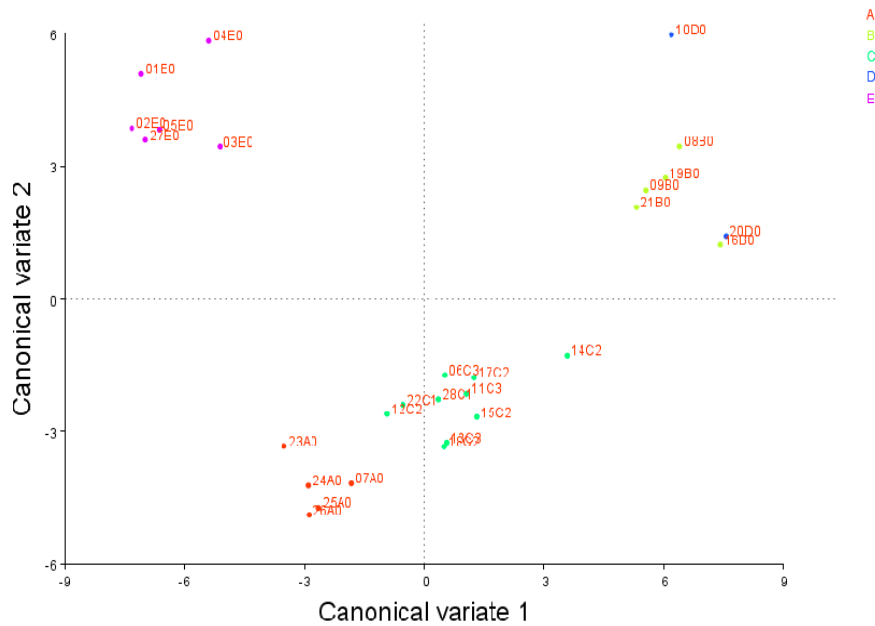


Figura 7. Análise da variável canônica realizada com os dados dos contornos, onde cada cor representa um agrupamento filogenético.

A hipótese de sinal filogenético para os dados dos *pseudolandmarks* foi aceita ($p= 0,0057$). Foi realizado o teste de sinal filogenético para os dados obtidos a partir da PCA, assim como para a CVA (Figura 8). O p encontrado foi de $<0,0001$, aceitando a hipótese de que existe sinal filogenético nos dados morfológicos obtidos a partir das duas análises.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir dos *landmarks* e dos *pseudolandmarks* apresentam a possibilidade de utilizar esse método para a resolução de um *Gyrodactylus* parafilético.

Nas análises dos *landmarks*, embora a Análise de Componentes Principais (Figura 3) e a Análise Variável Canônica (Figura 4), não tenham evidenciado uma divisão conspícua dos grupos filogeneticamente definidos, a Análise de Sinal Filogenético sugere que mesmo com poucos *landmarks*, existe sinal filogenético na forma dos ganchos. Esses resultados indicam que, mesmo que as análises gráficas não tenham apresentado uma divisão clara das linhagens pré estabelecidas pela filogenia molecular (Grupo A, B, C, D e E) o reconhecimento de grupos filogenéticos do gênero pode ser realizado com os dados morfométricos. De fato, Rodriguez-Gonzalez, *et al.* (2015), demonstram que marcos anatômicos são significativos para identificar plasticidade fenotípica em *Ligophorus cephalii*, sendo um método promissor para futuros estudos.

As análises realizadas com os *pseudolandmarks*, por outro lado, mostraram resultados bastante positivos. A Análise de Componentes Principais (Figura 6) demonstrou uma divisão indistinta dos grupos aparentados, assim como a observada nos *landmarks*. Porém a Análise Variável Canônica (Figura 7) apresentou uma separação clara dos grupos monofiléticos estabelecidos segundo a filogenia molecular. O resultado de Sinal Filogenético, segundo a hipótese de que existe congruência entre os dados morfológicos e genéticos, exibiram paridade com os observados nos *landmarks*, apresentado um p bem mais significativo ($p=0,0057$). Anteriormente, Vignon e Sasal (2010) utilizaram *pseudolandmarks* com sucesso para avaliar a divisão biogeográfica entre populações de parasitos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a resolução do problema taxonômico imposto por um *Gyrodactylus* parafilético utilizando marcadores moleculares pode ser complementado pela técnica da morfometria geométrica. Clados suportados pela análise molecular podem ser agrupados na categoria de gênero, muitos provavelmente novos à ciência, e sua composição definida tanto por marcadores moleculares ou por análises de morfometria geométrica.

Evidentemente, outras estruturas, além dos ganchos, podem ser alvo de testes adicionais no futuro, mas acredita-se que ganchos sejam de fato as estruturas mais informativas para esse contexto.

Uma forma de alocar espécies nesses novos agrupamentos genéricos pode ser realizada através da análise da forma média (Buani, 2010) do gancho dos agrupamentos monofiléticos. Nesse protocolo, cada agrupamento recebe uma forma média de gancho, através da qual todas as espécies pertencentes ao gênero seriam identificadas pela comparação de seu gancho pela forma média dos grupos pré estabelecidos.

Porém, um fator limitante para que isso seja feito confiavelmente e eficientemente, é a utilização de ilustrações (encontradas em artigos e livros científicos) para as análises. As ilustrações podem conter erros, sendo pouco precisas, pois são realizadas por autores com diferentes habilidades, conceitos e recursos. Uma alternativa seria o uso direto da imagem da lâmina de tipo da espécie. Essa fotografia poderia ser utilizada para a obtenção dos dados morfométricos, diminuindo erro humano das ilustrações.

A Análise Morfométrica de outras estruturas esclereotizadas dos monogenoides deve ser realizada, para verificar se seguem o padrão encontrado pelo gancho. Vignon e Sasal, 2010 utilizaram apenas as âncoras e as barras em seu trabalho, justificando que os ganchos não foram usados devido a seu pequeno tamanho, e a dificuldade de visualizar sob a luz do microscópio. O uso das âncoras e barras pode auxiliar na divisão do grupo, ajudando na elucidação dessa problemática. Trabalhos futuros podem utilizar essas estruturas, para verificar se apresentam os mesmos resultados obtidos quando o gancho foi analisado.

O estudo de divisão taxonômica de monogenoídes utilizando dados adquiridos pela morfometria geométrica é uma área pouco explorada, de modo que esse trabalho pode auxiliar em futuros estudos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, L., JARA, C. e CONE, D. K. Five species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea) from freshwater fishes of Peru. **Canadian Journal of Zoology** 69: 1199-1202, 1991.
- ARAFÁ, S. Z. Ultrastructure of musculature of the marginal hooklets of *Macrogryodactylus congolensis*, a monogenean skin parasite from the catfish *Clarias gariepinus*. **Acta Parasitologica**, 2011, 56(2), 122–130; ISSN 1230-2821, 2011.
- BAKKE, T.A., CABLE, J., HARRIS, P. D. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian doll-killers”. **Adv. Parasitol.** 64, 161-376, 2007.
- BILLETER, P. A., KLINK, M. M., MAUGEL, T. K. A new species of *Swingleus* (Monogenea: Gyrodactylidae) from the mummichog *Fundulus heteroclitus*, in the Delaware Bay. **J. Parasitol.**, 86(6), 2000, p. 1219–1222, 2000.
- BOEGER, W. A., KRITSKY, D. C., BELMONT-JÉGU, E. Neotropical Monogenoidea. 20. Two new species of oviparous Gyrodactylidea (Polyonchoinea) from loricariid catfishes (Siluriformes) in Brazil and the phylogenetic status of Oogryodactylidae Harris, 1983. **Journal of the Helminthological Society of Washington** 61: 34-44, 1994.
- BOEGER, W. A., KRITSKY, D. C., PIE, M. R. Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). **Zool. Scr.** 32, 437-448, 2003.
- BOEGER, W. A., FERREIRA, R. C., VIANNA, R. T., PATELLA, L. Neotropical Monogenoidea 59. Polyonchoineans from *Characidium* spp. (Characiformes: Crenuchidae) from southern Brazil. **Folia Parasitologica** 6X [X]: XXX–XXX, 201X ISSN 0015-5683 (print), ISSN 1803-6465 (online), 2014.
- BOOKSTEIN, F. L. Foundations of morphometrics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 1982. 13:451-70, 1982.
- BOOKSTEIN, F. L. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. **Cambridge Univ. Press**: New York. 435 pp, 1991.
- BUANI, B. E. Z. **Aplicação da lógica FUZZY KNN e análises estatísticas para seleção de características e classificação de abelhas**. Dissertação de Mestrado (Universidade de São Paulo), 2010.
- BUENO-SILVA, M., BOEGER, W.A. Neotropical Monogenoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. **Folia Parasitol.** 56, 13-20, 2009.
- BUENO-SILVA, M., BOEGER, W.A., PIE, M.R. Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). **Int. J. Parasitol.** 41, 657-667, 2011.
- CHOLLET, M. B., ALDRIDGE, K., PANGBORN, N. WEINBERG, S. M., DELEON, V. B. Landmarking the Brain for Geometric Morphometric Analysis: An Error Study. **PLoS ONE** 9(1): e86005. doi:10.1371/journal.pone.0086005, 2014.
- CUNNINGHAM, C. O., MCGILLIVRAY, D. M., MACKENZIE, K., MELVIN, W. T., Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavini* and *G. truttae* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitology** 111,87-94, 1995a.
- CUNNINGHAM, C. O., MO T. A. Random amplified polymorphic (RAPD) analysis of three Norwegian *Gyrodactylus salaris* populations (Monogenea; Gyrodactylidae). **J. Parasitol.** 83: 311-314, 1997.

- DÁVIDOVÁ, M., JARKOVSKÝ, J., MATEJUVÁ, I., GELNART, M., Seasonal occurrence and metrical variability of *Gyrodactylus rhodei* (Vitnan, 1964) (Monogenea, Gyrodactylidae). **Parasitol. Res.** 95, 398-405, 2005.
- DMITRIEVA, E., DIMITROV, G. Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). **Syst. Parasitol.** 51, 199-206, 2002.
- ERNST, I., WHITTINGTON, I. D. e JONES, M. K. Three new species of *Polyclithrum* Rogers, 1967 (Gyrodactylidae: Monogenea) from mugilini fishes from Australia and Brazil, with a redescription of *P. mugilini* Rogers, 1967. **Systematic Parasitology** 45: 61-73, 2000.
- ERGENS, R. Two new and three previously described species of the genus *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 from the *G. phoxini* group (Monogenea:Gyrodactylidae). **Folia Parasitologica** 35: 23-30, 1988.
- FABRE, A. C., CORNETTE, R., HUYGHE, K., ANDRADE, D. V., HERREL, A. Linear versus geometric morphometric approaches for analysis of head shape dimorphism in Lizards. **JOURNAL OF MORPHOLOGY** 275:1016–1026, 2014.
- FERREIRA, R.C.S. **Moléculas podem subsidiar a definição de caracteres diagnósticos de agrupamentos de espécies em *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae, Monogenoidea)?** Monografia de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - UFPR, Curitiba, 34 p, 2010.
- GEETS, A., APPLEBY, C., OLLEVIER, F. Host-dependent and seasonal variation in opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus* cf. *arcuatus* from three *Pomatoschistus* spp. and *G. arcuatus* from *Gasterosteus aculeatus*: a multivariate approach. **Parasitology** 119, 27-40, 1999.
- GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meloponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas.** Tese de Mestrado Universidade de São Paulo, 2010.
- GUSEV, A. V. **Chaves de parasitas de peixe de água doce da URSS. Volume 2. Metazoários Parasitas (Parte 1).** (Bauer, O. N., ed. geral, Gusev, A. V., ed. volume. Nauka. Leningrado. 424 pp., 1985. (Em russo)
- HANSEN, H., BAKKE T. A., BACHMANN, L. Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland and Norway reveals further lineages. **Parasitology Research**, 100, 1389–1394. DOI: 10.1007/s00436-006-0423-5, 2007a.
- HANSEN, H., BAKKE T. A., BACHMANN, L. DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. **Trends in Parasitology**, 23, 363–367. DOI: 10.1016/j.pt.2007.06.007, 2007b.
- HARRIS, P.D. The morphology and life-cycle of the oviparous *Oogyrodactylus farlowellae* gen. et sp. nov. (Monogenea: Gyrodactylidae). **Parasitology**, 87, pp 405-420. doi:10.1017/S0031182000082937, 1983.
- HARRIS, P.D. Extreme morphological variation between related individuals of *Gyrodactylus pungitti* Malmberg, 1964 (Monogenea). **Syst. Parasitol.** 39, 137-140, 1998.
- HARRIS, P.D., SHINN, A.P., CABLE, J., BAKKE, T.A., BRON, J.E. GyroDb: gyrodactylid monogeneans on the web. **Trends in Parasitology** 24, 109-111, 2008.
- HUYSE, T., VOLCKAERT, F.A.M. Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). **Int. J. Parasitol.** 32, 907-919, 2002.

- HUYSE T., AUDENAERT V., VOLCKAERT F. A. M. Speciation and host-parasite relationships in the genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). **Int. J. Parasitol.** 33: 1679-1689, 2003.
- JARA, C. A. e CONE, D. K. *Scleroductus yuncensi* gen. et sp. n. (Monogenea) from *Pimelodella yuncensis* (Siluriformes: Pimelodidae) in Peru. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington.** 56 (2): 125-127, 1989.
- JARAMILLO, O. N., CASTILLO, D., WOLFF E. M. Geometric morphometric between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002 Jul; 97(5):667-73. Epub 2002 Aug 30, 2002.
- KHAN, T. F., SOO, O. Y. M., TAN, W. B., LIM, L. H. S. Monogenean Anchor Morphometry: Systematic Value, Phylogenetic Signal, and Evolution. **PeerJ PrePrints** 3:e1576 <https://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.1283v1>, 2015.
- KIMMERLE, E. R., ROSS, A., SLICE, D. Sexual dimorphism in America: geometric morphometric analysis of the craniofacial region. **J Forensic Sci**, Vol. 53, No. 1 doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00627.x, January 2008.
- KLINGENBERG, C. P., GIDASZEWSKI, N. A. Testing and quantifying phylogenetic signal and homoplasy in morphometric data. **Systematic Biology**, 59, 245-261, 2010.
- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources** 11: 353-357, 2011.
- KRITSKY, D. C., e FRITTS, T. H. Monogenetic Trematodes from Costa Rica with the proposal of *Anacanthocotyle* gen. n. (Gyrodactylidae: Isancistrinae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington** 37 (1): 63 – 68, 1970.
- KRITSKY, D. C., e THATCHER, V. E. *Phanerothecium* gen. nov. and *Fundulotrema* gen. nov. Two new genera of viviparous Monogenoidea (Gyrodactylidae), with a description of *P. caballeroi* sp. nov. and key to the subfamilies and genera of the family. *Publicaciones Especiales* (4): **Excerta Parasitologica** en memoria del doctor Eduardo Caballero y Caballero 4: 53-60, 1977.
- KRITSKY, D.C., BOEGER, W.A. Neotropical Monogenea, 16. New Species of Oviparous Gyrodactylidae with Proposal of *Nothogyrodactylus* gen. n. (Oogyrodactylidae). **Journal of Helminthology** 58:7-15, 1991.
- KRITSKY, D.C., BOEGER, W.A. Phylogeny of the Gyrodactylidae and the phylogenetic status of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Platyhelminthes: Monogenoidea). In: C. Combes, J. Jourdane, editors. **Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites.** (Livre hommage a Louis Euzet). Tome II. Perpignan: pp. 37-58, 2003.
- KRITSKY, D.C., VIANNA, T. R., BOEGER, W.A. 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). **Syst Parasitol** (2007) 66:1–34 DOI 10.1007/s11230-006-9053-7, 2007.
- LUUS-POWELL, MASHEGO e KHALIL. *Mormyroggyrodactylus gemini* gen. et sp. n. (Monogenea: Gyrodactylidae), a new gyrodactylid from *Macusenius macrolepidotus* (Mormyridae) from South Africa. **Folia Parasitologica** 50: 49-55, 2003.
- MADDISON, W. P. Squared-change parsimony reconstructions of ancestral states for continuous-valued characters on a phylogenetic tree. **Systematic Biology** 40, 304–314, 1991.
- MALMBERG, G. On a new genus of viviparous monogenetic trematodes. **Arkiv för Zoologi** 10 (3): 317-329, 1956.

- MALMBERG, G. The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematic of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). **Ark. Zool.** 23, 1-235, 1970.
- MALMBERG, G. On the evolution within the family Gyrodactylidae (Monogenea). **Int. J. Parasitol.** 28, 1625-1635, 1998.
- MATEJUSOVÁ I., GELNAR M., McBEATH A. J. A., COLLINS C. M., CUNNINGHAM C. O. Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). **Int. J. Parasitol.** 31: 738-745, 2001.
- MATEJUSOVÁ, I., GELNAR, M., VERNEAU, O., CUNNINGHAM, C.O., LITTLEWOOD, D.T.J. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Gyrodactylus* (Platyhelminthes: Monogenea) inferred from rDNA ITS region: subgenera versus species groups. **Parasitology** 127, 603-611, 2003.
- MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M. S., LUMME J. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). **Int. J. Parasitol.** 34: 515-526, 2004.
- MIZELLE, R. e KRITSKY, D. C. Studies on Monogenetic Trematodes. XXXIII. New species of *Gyrodactylus* and a key to the North American species. **Trans. Amer. Microsc. Soc.** 86: 390-401, 1967.
- MO, T. A. Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. **Syst. Parasitol.** 20, 11-19, 1991a.
- NEUSTUPA, J., ŠKALOUD, P. Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). **Preslia** 79: 401–417, 2007.
- OXNARD, C. E. One biologist's view of morphometrics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 1978. 9:219-241, 1978.
- PAPERNA, I. Monogenetic Trematodes collected from freshwater fish in Ghana. **Second Report. Bamidgeh.** 20: 88-100, 1968.
- PÁLSSON, J. e BEVERLY-BURTON, M. *Laminiscus* n. g. (Monogenea: Gyrodactylidae) from capelin, *Mallotus villosus* (Müller), (Pisces: Osmeridae) in the northwest Atlantic with redescription of *L. gussevi* n. comb., *Gyrodactyloides petruchewskii*, and *G. andriaschewi*. **Canadian Journal of Zoology** 61 (2): 298-306, 1983.
- POPAZOGLO, F., BOEGER, W. A. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbis* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of Southern Brazil. **Folia Parasitologica** 47: 105-110, 2000
- PŘIKRYLOVÁ, I., GELNAR, M. The first record of *Macrogyrodactylus* species (Monogenea, Gyrodactylidae) on freshwater fishes in Senegal with the description of *Macrogyrodactylus simentiensis* sp. nov., a parasite of *Polypterus senegalus* Cuvier. **Acta Parasitologica**, 2008, 53(1), 1–8; ISSN 1230-2821, 2008.
- PŘIKRYLOVÁ, I., MATEJUSOVÁ, I., MUSILOVÁ, N., GELNAR, M., HARRIS, P. D. A new Gyrodactylid (Monogenea) genus on Gray bichir, *Polypterus senegalus* (Polypteridae) from Senegal (West Africa). **J. Parasitol.**, 95(3), 2009, pp. 555–560, 2009.
- PŘIKRYLOVÁ, I., MATEJUSOVÁ, I., MUSILOVÁ, N., GELNAR, M. Gyrodactylus species (Monogenea: Gyrodactylidae) on the cichlid fishes of Senegal, with the description of *Gyrodactylus ergensi* n. sp. from Mango tilapia, *Sarotherodon galilaeus* L. (Teleostei: Cichlidae). **Parasitol Res** (2009) 106:1-6 DOI 10.1007/s00436-009-1600-0, 2009

- PŘIKRYLOVÁ, I., BLAZEK, R., VANHOVE, M. P. M. An overview of the *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) species parasitizing African catfishes, and their morphological and molecular diversity. **Parasitol Res** (2012) 110:1185–1200 DOI 10.1007/s00436-011-2612-0, 2011.
- PŘIKRYLOVÁ, I., BLAZEK, R., GELNAR, M. *Gyrodactylus malalai* sp. nov. (Monogenea, Gyrodactylidae) from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and Redbelly tilapia, *Tilapia zillii* (Gervais) (Teleostei, Cichlidae) in the Lake Turkana, Kenya. **Acta Parasitologica**, 2012, 57(2), 122–130; ISSN 1230-2821, DOI: 10.2478/s11686-012-0017-6, 2012.
- PŘIKRYLOVÁ, I., LISS-POWELL, W. J. Revision of the genus *Afrogyrodactylus* Paperna, 1968 (Monogenea: Gyrodactylidae) with description of the two new species from geographically distant localities. **Folia Parasitologica** 61 [6]: 529–536, 2014, doi: 10.14411/fp.2014.066, 2014.
- ROHLF, F.J., SLICE, D. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology** 39: 40–59. doi: 10.2307/2992207, 1990.
- RODRÍGUES-GONZÁLEZ, A., MÍGUEZ-LOZANO, R., LLOPIS-BELENGUER, C., BALBUENA J. A. Phenotypic plasticity in haptor structures of *Ligophorus cephalii* (Monogenea: Dactylogyridae) on the flathead mullet (*Mugil cephalus*): a geometric morphometric approach. **International Journal for Parasitology** 45 (2015) 295–303, 2015.
- ROGERS, W. *Polyclithrum mugilini* gen. et sp. n. (Gyrodactylidae: Polyclithrinae subfam. n.) from *Mugil cephalus* L. **Journal of Parasitology** 53: 274-276, 1967.
- ROGERS, W. *Swingleus polyclithroides* Gen. et sp. n. (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Fundulus Grandis* Baird and Girard. **Tulane Studies in Zoology and Botany** 16: 22-25, 1969.
- RUBIO-GODOY, M., PALADINI, G., FREEMAN, M. A., GRACÍA-VÁSQUEZ, A., SHINN, A. P. Morphological and molecular characterisation of *Gyrodactylus salmonis* (Platyhelminthes, Monogenea) isolates collected in Mexico from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Veterinary Parasitology** 186 (2012) 289–300, 2012.
- SCHELKLE, B., PALADINI, G., SHINN, A. P., KING, S., JOHNSON, M., OOSTERHOUT, C. van, MOHAMMED, R. S., CABLE, J. *Iredactylus rivuli* gen. et sp. Nov. (Monogenea, Gyrodactylidae) from *Rivulus hartii* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in Trinidad. **Acta Parasitologica**, 56(4), 360–370; ISSN 1230-2821, DOI: 10.2478/s11686-011-0081-3, 2011.
- SHINN A. P., des CLERS S., GIBSON D. I., SOMMERVILLE C. Multivariate analyses of morphometrical features from *Gyrodactylus* spp. (Monogenea) parasitising British salmonids: light microscope based studies. **Syst. Parasitol.** 33: 115-125, 1996.
- SHINN A. P., GIBSON D. I., SOMMERVILLE C. Morphometric discrimination of *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Monogenea) from species of *Gyrodactylus* parasitising British salmonids using novel parameters. **J. Fish Dis.** 24: 83-97, 2001.
- SHINN A. P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L., BAKKE T. A. The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). **Folia Parasitol.** 51: 239-252, 2004.
- STEGMANN, M. B., GOMEZ, D.D. "A Brief Introduction to Statistical Shape Analysis," technical report, Informatics and Mathematical Modelling, **Technical Univ. of Denmark**, DTU, Mar. 2002.

- VIANNA, R. T. **Filogenia e biogeografia histórica dos Gyrodactylidae (Monogenoidea): morfologia, moléculas e evidência total.** Tese de Doutorado Universidade Federal do Paraná. 2007.
- VIANNA, R. T., BOEGER, W. A., DOVE, A. D. M. Neotropical Monogenoidea. 51. *Scutalatus magniancoratus* gen. et SP. N. (Gyrodactylidae) from the South-American electric eel, *Electrophorus electricus* (Gymnotidae, Gymnotiformes), and redescription of *Mormyrogyrodactylus gemini* from the African bulldos, *Marcusenius macrolepidotus* (Mormyridae, Osteoglossiformes). **Acta Zoologica** (Stockholm) 88: 89-94, April 2007a.
- VIANNA, R. T., BOEGER, W. A., SILVA-SOUZA, A. T. Neotropical Monogenoidea. 52. *Diechodactylus joaberi* n. g., n. sp. from the banded knifefish *Gymnotus carapo* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in southeastern Brazil. **Syst Parasitol.** Jan;69(1):45-50. Epub 2007b Nov 21, 2008.
- VIGNON, M., SASAL, P. The use of geometric morphometric in understanding shape variability of sclerotized haptor structures of monogeneans (Platyhelminthes) with insights into biogeographic variability. **Parasitology International** 59 (2010) 183-191, 2010.
- YAMAGUTI, S. Systema Helminthum. Volume IV. Monogenea and Aspidocotylea. **InterScience Publishers**, New York, 699 pp, 1963.