

Informe final* del Proyecto HB026
Códigos de barras de helmintos de anfibios y reptiles de México

Responsable: Dra. Virginia León Régagnon
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biología
Estación Chamela
Dirección: Apartado Postal 21, San Patricio Melaque, Jal, 48980 , México
Correo electrónico: vleon@ib.unam.mx
Teléfono/Fax: 01 312 3161000 ext. 49003
01 315 35 10200
56229167
Fecha de inicio: Enero 15, 2010.
Fecha de término: Enero 20, 2015.
Principales resultados: Base de datos, códigos de barras, fotografías, informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** León, R.V. 2016. Códigos de barras de helmintos de anfibios y reptiles de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. HB026.** México D. F.

Resumen:

En el presente proyecto se desarrollará una base de datos de secuencias de ADN de referencia, asociadas a la información taxonómica de cada especie de helmintos de anfibios y reptiles en México. Esta base de datos servirá en un futuro cercano como un sistema de identificación rápida de especies que será una vía de comunicación ágil entre los generadores de información taxonómica y los usuarios de ésta (ecólogos, conservacionistas, ecoguardias, etc.). La identificación rápida y oportuna de los helmintos de anfibios y reptiles de México aportará información acerca de las condiciones de las poblaciones de hospederos debido a que los parásitos pueden utilizarse como especies centinelas de alteraciones ambientales. El objetivo general del presente proyecto es caracterizar genéticamente a especies selectas de helmintos de anfibios y reptiles en México, con secuencias del gen Citocromo Oxidasa I (COI) para generar una herramienta de identificación rápida de dichas especies. Se obtendrán las secuencias parciales del gen COI para 73 especies de helmintos anfibios y reptiles de México. En los casos necesarios se obtendrán las secuencias de otras regiones de ADN para lograr la diferenciación de las especies. Las secuencias se analizarán con metodologías de agrupación filogenética como parsimonia o análisis bayesianos. Se generará una base de datos con la información taxonómica y geográfica de los ejemplares, con páginas electrónicas asociadas que contengan la secuencia de COI, la fotografía y otras secuencias si es el caso.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

INFORME FINAL

Proyecto HB026 “Código de barras de helmintos de anfibios y reptiles de México”

Virginia León Règagnon

Resumen

Se construyó una biblioteca de códigos de barras de helmintos parásitos de anfibios y reptiles con 453 registros de 49 especies (más otras no descritas), de los cuales 318 registros, de 38 especies, cuentan con secuencias parciales del gen COI. De éstas secuencias, 174 son códigos de barras validados. Se observa al analizar las secuencias que esta región del genoma es útil para identificar a las especies descritas y para detectar posibles especies nuevas para la ciencia. Se diseñaron nuevos primers para la amplificación de códigos de barras de nemátodos que permitirán ampliar esta biblioteca de referencia para este grupo megadiverso de invertebrados.

Introducción y antecedentes

El impedimento taxonómico que prevalece en la actualidad para muchos sistematas, ecólogos de campo y biólogos evolutivos, es decir, la dificultad para identificar correctamente una muestra de cualquier organismo de manera rápida, repetible y confiable, es una realidad que no podemos negar. Este problema taxonómico fue una de las principales razones para el desarrollo de un nuevo método para la identificación rápida de cualquier especie, con base en la extracción de una secuencia de ADN de una pequeña muestra de tejido de cualquier organismo. Esta metodología fue llamada "Código de Barras de ADN" (DNA barcoding), haciendo referencia a las etiquetas UPC (por sus siglas en inglés: Universal Product Code) de los productos comerciales; los códigos de barras de ADN consisten en una secuencia corta de ADN estandarizada que, en teoría, puede aislarse y caracterizarse fácilmente a partir de todas las especies en el planeta (Hebert et al., 2003, Savolainen et al., 2005).

Los códigos de barras se obtienen a partir de muestras de tejido de ejemplares de campo o de museo, extrayendo el ADN, amplificando la región elegida como código de barras y obteniendo su secuencia. La información de la secuencia se

vincula con detalles acerca del ejemplar (nombre de la especie, clave de acceso para el ejemplar de referencia en alguna colección, ubicación geográfica, imágenes, etc.) para producir un registro único, en una biblioteca de acceso público, que permite la identificación de especies. El sistema de códigos de barras de la vida (BOLD por sus siglas en inglés) es una plataforma bio-informática, semi-automatizada de alto rendimiento, que funciona a nivel internacional a través de una red de países o nodos regionales, con instalaciones basadas en el Instituto de Biodiversidad de Ontario, en Canadá (<http://www.boldsystems.org/>) (Ratnasingham y Hebert, 2007).

El proceso de identificación con códigos de barras de ADN implica dos pasos básicos: 1) la construcción de la biblioteca de códigos de barras de las especies conocidas, y 2) la comparación de la secuencia desconocida, con las secuencias de la biblioteca para su identificación. El primer paso requiere de conocimiento y experiencia taxonómica para elegir uno o de preferencia, varios ejemplares de cada especie para que sirvan como muestras de referencia en la biblioteca de códigos de barras. Estos ejemplares de referencia, depositados en museos o herbarios sirven como registro permanente que vincula la secuencia de ADN con una especie en particular (Kress y Erickson, 2012).

Una vez que la biblioteca de códigos de barras de referencia está completa para los organismos estudiados, ya sean los organismos en una región geográfica, de un grupo taxonómico, o un grupo blanco (por ejemplo, plantas medicinales, o insectos plaga), entonces los códigos de barras de las muestras para identificar se comparan con los códigos de barras conocidos mediante algún algoritmo (Erickson et al., 2008; Ratnasingham y Hebert, 2013).

Aunque sería ideal tener una misma región que funcionara como código de barras para todos los organismos, no ha logrado encontrarse una región con estas características. Para los animales se usa el gen citocromo oxidasa I (COI) porque los iniciadores funcionan bien para la mayoría de los grupos, y porque aparentemente posee una señal filogenética mayor que cualquier otro gen mitocondrial (Hebert et al., 2003).

La iniciativa del Código de Barras de la Vida se enfocó en sus inicios sobre grupos

taxonómicos carismáticos, como las aves, peces, mamíferos e insectos. El diseño de iniciadores (primers) para amplificar el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I estuvo basado en la secuencia de ADN de esos grupos. Aunque los iniciadores diseñados originalmente para insectos funcionan con un porcentaje muy alto de éxito en otros grupos como las aves y los peces, en el caso de los platelmintos y los nemátodos tienen un desempeño pobre, lo cual se refleja en el reducido número de códigos de barras que se han generado en este grupo en comparación con otros.

Esos grupos de helmintos son de origen muy antiguo y presentan una gran riqueza de especies, diversidad de hábitats, historias de vida, etc. Es probablemente por esta razón que los primers "universales", que funcionan bien para la mayoría de los grupos de vertebrados, insectos, crustáceos, etc., no funcionan para muchos grupos de nemátodos y platelmintos.

Los parásitos juegan un papel importante en la crisis de biodiversidad por la que atravesamos (Daszak et al., 2003; Epstein et al., 2003; Harvell et al., 2002). Cada especie de vida libre alberga, al menos, una especie de parásito, es decir, más del 50% de las especies del mundo son parásitas (Price, 1980). Estos organismos, por un lado, pueden regular las poblaciones de hospederos al estructurar las comunidades de metazoarios (Hudson et al., 2006), mientras que por otro lado, pueden representar una amenaza para la salud humana, la agricultura, los sistemas naturales y para las prácticas de conservación de vida silvestre (Horowitz y Wilcox, 2005).

El conocimiento de la historia natural y la distribución de los patógenos conocidos y potenciales, es entonces un requisito crítico para aprovechar sus efectos positivos y, al mismo tiempo, minimizar los negativos sobre los programas de conservación, restauración y desarrollo sustentable (Brooks y Hoberg, 2000; Brooks et al., 2001; Brooks, 2003). Este conocimiento permite hacer predicciones acerca de brotes potenciales de enfermedades emergentes, ahorrando con ello tiempo y dinero, recursos importantes en la batalla contra la crisis de las enfermedades infecciosas emergentes (Brooks y Hoberg, 2006; Brooks et al., 2006). Asimismo, permite conocer aspectos importantes de la biología de sus hospederos, ya que sus ciclos de vida complejos son indicadores de las cadenas

alimenticias del ecosistema, así como del estado general de las poblaciones de los hospederos (anfibios/reptiles o sus alimentos/depredadores) en el medio (Marcogliese, 2003). El empleo de la información aportada por los parásitos junto con la provista por sus hospederos, ha permitido determinar el grado de alteración de los ecosistemas, lo que convierte a algunos de estos sistemas parásito-hospedero en “centinelas” de las condiciones ambientales (Brooks et al., 2001; Vidal-Martínez et al., 2009).

Sin embargo, la identificación de los helmintos utilizando información exclusivamente morfológica puede dar resultados ambiguos o erroneos. La generación de códigos de barras genéticos de parásitos de anfibios y reptiles de México sentará las bases para construir un sistema de identificación rápido y eficaz que será de utilidad para evaluar el estado de las comunidades de parásitos en poblaciones de estos hospederos como indicadores de sus condiciones ambientales.

Objetivos

Generar una biblioteca de referencia con códigos de barras de ADN de especies de helmintos parásitos de anfibios y reptiles de México.

Métodos

Se recolectó material helmintológico de diferentes especies de anfibios y reptiles a lo largo de varios años en diferentes regiones del país. Los hospederos se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se disectaron para realizar el examen helmintológico. Una parte de los helmintos recolectados de cada especie se fijaron para su estudio morfológico, de acuerdo con el grupo al que pertenecían: etanol 70% caliente en el caso de los nemátodos y formol al 4% caliente en el caso de platyhelminths. Se conservaron en frascos homeopáticos con etanol al 70% para su posterior aclaramiento o tinción y montaje en preparaciones temporales o permanentes según el grupo (Lamothe 1997). La determinación taxonómica se realizó consultando claves taxonómicas especializadas y descripciones originales. Otra parte de la muestra se fijó en etanol absoluto y se conservó en congelación para su estudio molecular. Se

extrajo el ADN de las muestras utilizando con el kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. La amplificación de la región parcial del gen COI (código de barras) se llevó a cabo mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción para un volumen total de 25 μ L consistió en: 2.5 μ L de Buffer (10X), 0.5 μ L de dNTPs (10 mM), 1.6 μ L MgCl₂ (30 mM), 1 μ L de cada oligonucleótido (10 μ M), 0.125 μ L de Taq polimerasa (5U/ μ L) (Biogenica), 1-3 μ L de templado de ADN y agua destilada hasta completar el volumen final. Los pares de primers utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Pares de primers utilizados para la amplificación de la región parcial del COI, señalando para qué grupo taxonómico fueron utilizados.

Primer	Secuencia	Autores	Grupo
JB3 JN4.5	TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG	Bowles et al., 1995	Schistosoma
Plat- diploCOX1F Plat- diploCOX1R	CGTTTRAATTATACGGATCC AGCATAGTAATMGCAGCAGC	Moszczyńska et al. 2009	Platyhelminthes
MplatCOX1d F MplatCOX1d R	TGTA AACGACGGCCAGTTTWCITTRGA TCATAAG CAGGAAACAGCTATGACTGAAAYAYAI GGATCICCACC	Moszczyńska et al. 2009	Platyhelminthes
LCO1490 HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. 1994	Nematoda
LepF1 LepR1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA	Hebert et al., 2004	Nematoda
NemF1_t1 NemR1_t1 NemF2_t1 NemR2_t1 NemF3_t1 NemR3_t1	tgtaaacgacggccagtCRACWGTWAATCAA ARAATATTGG caggaaacagctatgactAACTTCWGGRTGA CCAAAAATCA tgtaaacgacggccagtARAGATCTAATCATA AAGATATYGG caggaaacagctatgactAWACYTCWGGRTGM CCAAAAAYCA tgtaaacgacggccagtARAGTTCTAATCATA ARGATATTGG caggaaacagctatgactAAACCTCWGGATGA CCAAAAATCA	Prosser et al., 2013	Nematoda (para ser usado en coctel)

Resultados

A lo largo de este proyecto nos vimos en la necesidad de hacer numerosas pruebas con primers conocidos y de diseñar nuevos primers para el grupo de los nematodos ya que los primers que se utilizan como universales en otros grupos

como los insectos no tienen un buen desempeño con helmintos. En algunas ocasiones los únicos primers que dieron buenos resultados fueron aquellos que no amplifican la región completa del código de barras (como el caso de los platelmintos). Por esta razón, de las 318 secuencias registradas en el proyecto, solo 178 tienen una longitud mayor a 500pb. Aunque los compromisos originales del proyecto no se alcanzaron, presento a continuación los logros obtenidos, mismos que considero de gran valor para el trabajo subsecuente en la elaboración de la biblioteca de códigos de barras de helmintos a nivel global.

Dada la gran diversidad taxonómica de los grupos estudiados y la necesidad de referir los resultados en las publicaciones, los resultados del proyecto HB026 se dividieron en cuatro proyectos en la plataforma BOLD:

- 1) Platyhelminthes of Amphibians and Reptiles from Mexico (HELMX)
- 2) Nematodes of Mexico old primers (NEMXA)
- 3) Nematoda new primers (NEMMX)
- 4) Parasitic nematodes from Mexican vertebrates (NEMNP)

A continuación se describen los contenidos de cada uno de esos proyectos:

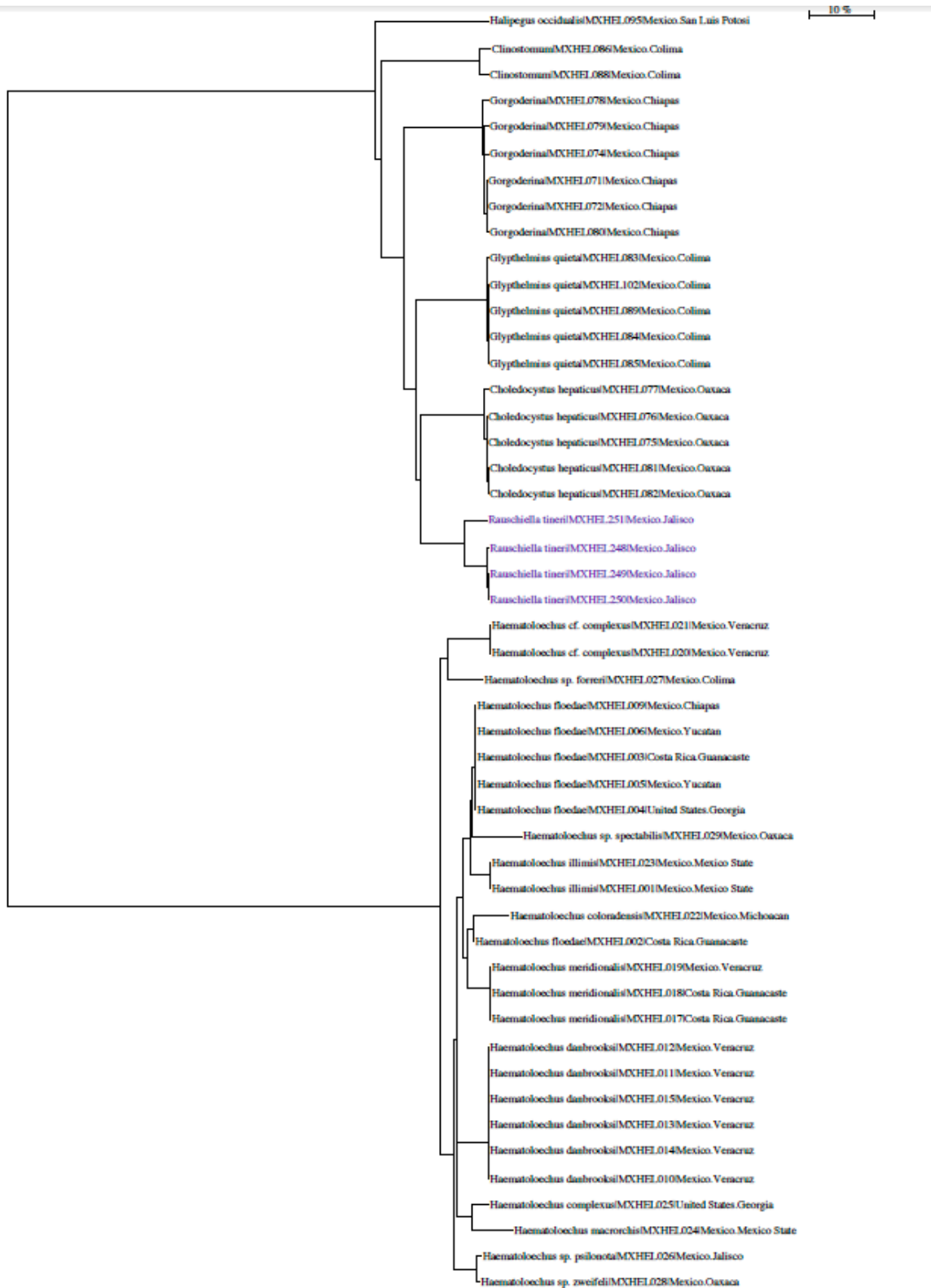
Platyhelminthes of Amphibians and Reptiles from Mexico (HELMX)

104 registros (ejemplares) de 22 especies
62 registros con secuencias (>360 bp) de 16 especies
01 códigos de barras validados (680 bp +/-)
102 con georeferencia
50 registros con fotografía

Del análisis de las secuencias obtenidas de los platelmintos se deduce que esta región del ADN es útil para diferenciar especies de este grupo, al menos especies del orden Plagiorchiida, al que pertenecen la mayoría de las especies analizadas (Figura 1). El único grupo de especies que no se diferencia claramente es el de los parásitos de pulmón de anfibios *Haematoloechus illimis* + *H. floedae* + *H. sp. spectabilis*. Las secuencias que se obtuvieron de estos ejemplares fueron muy cortas, ya que se usaron los primers JB3 y JB4.5 que son los primers que mejor resultado dieron para la amplificación de las muestras. Es necesario hacer pruebas subsecuentes para amplificar la región del código de barras completa

para este grupo con el fin de evaluar su efectividad para la diferenciación de las especies. Asimismo, se obtuvo la secuencia en un solo sentido de muchas de las muestras y que la secuencia en contrasentido no pudo leerse. Los primers que diseñaron Moszczyńska et al. (2009) para platelmintos no pueden considerarse como universales. Las muestras de *Langeronia macrocirra* fueron procesadas en el laboratorio de el CCDB (Canadian Center for DNA Barcoding) sin éxito alguno. Ellos utilizaron sus protocolos estandarizados para hacer un único intento para amplificar las muestras, desafortunadamente ninguna de ellas funcionó. Los protocolos que tienen un elevado porcentaje de éxito para grupos como los insectos, no tienen la misma eficacia para el grupo de los platelmintos.

Figura 1. Árbol de distancias (NJ, Kimura 2 parámetros) que muestra el grado de divergencia entre las secuencias de COI de los platelmintos analizados en el proyecto.

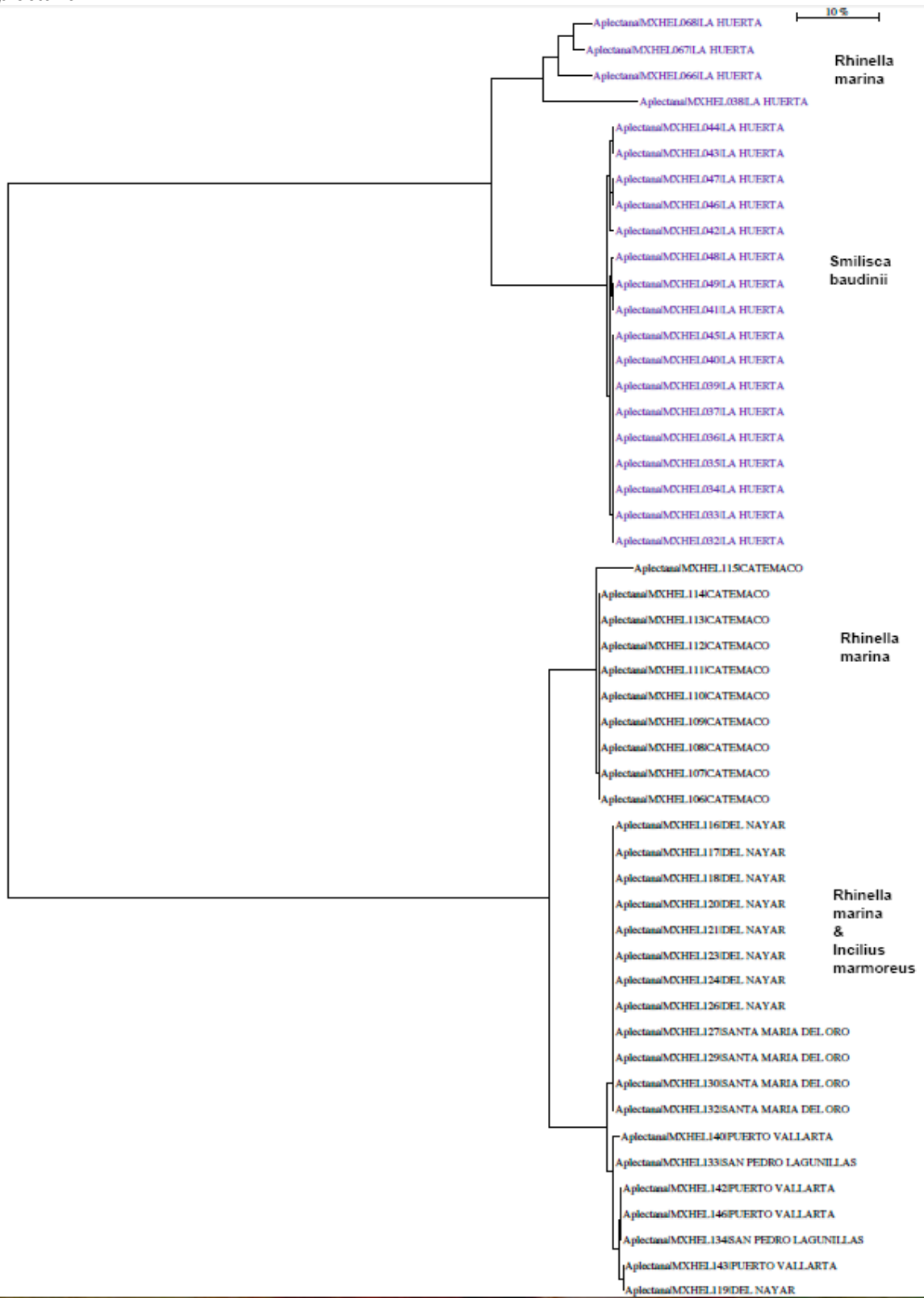


Nematodes of Mexico old primers (NEMXA)

159 registros (ejemplares) de 7 especies
92 registros con secuencias (>360 bp) de 4 especies
12 códigos de barras validados (680 bp +/-) de 4 especies
159 registros con georeferencias
65 registros con fotografía

En este proyecto se agrupan los ejemplares que fueron procesados utilizando los primers que tradicionalmente se habían usado en la literatura para amplificar parte del COI (Bowles et al., 1995). Estos primers dan buen resultado para algunos grupos de helmintos, sin embargo el fragmento que amplifican no es el código de barras completo (325 a 350 pb). Aún con este pequeño fragmento, observamos una buena diferenciación de especies, particularmente en el caso del género *Aplectana*. Se ingresaron los registros como una sola especie, sin embargo al analizar las secuencias obtenidas, se observan al menos 5 especies diferentes que corresponden claramente con su distribución geográfica y/o a la especie de hospedero al que parasitan (figura 2). Actualmente estamos trabajando en la obtención de secuencias de la región completa del código de barras utilizando los nuevos primers, así como en la obtención de secuencias de otras regiones para corroborar estas observaciones y en la búsqueda de los caracteres morfológicos que nos permitan describir formalmente estos nuevos taxa.

Figura 2. Árbol de distancias (NJ, Kimura 2 parámetros) que muestra el grado de divergencia entre las secuencias parciales de COI amplificadas con los primers JB/JB4.5 de especies del género *Aplectana*.



Nematoda new primers (NEMMX)

106 registros (ejemplares) de 8 especies
80 registros con secuencias (>360 bp) de 6 especies
77 códigos de barras validados (680 bp +/-)
106 registros con georeferencias
33 registros con fotografía

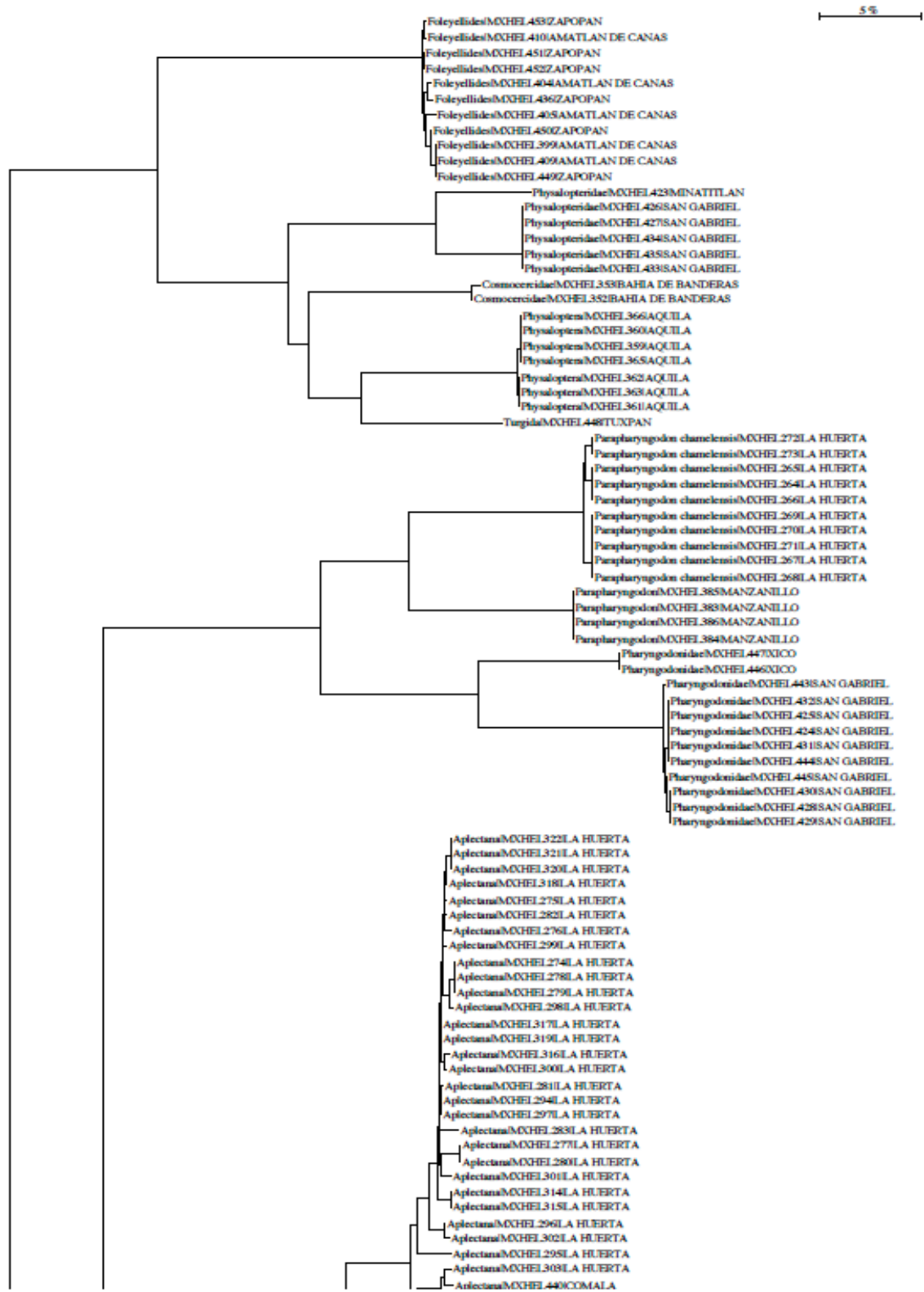
Parasitic nematodes from Mexican vertebrates (NEMNP)*

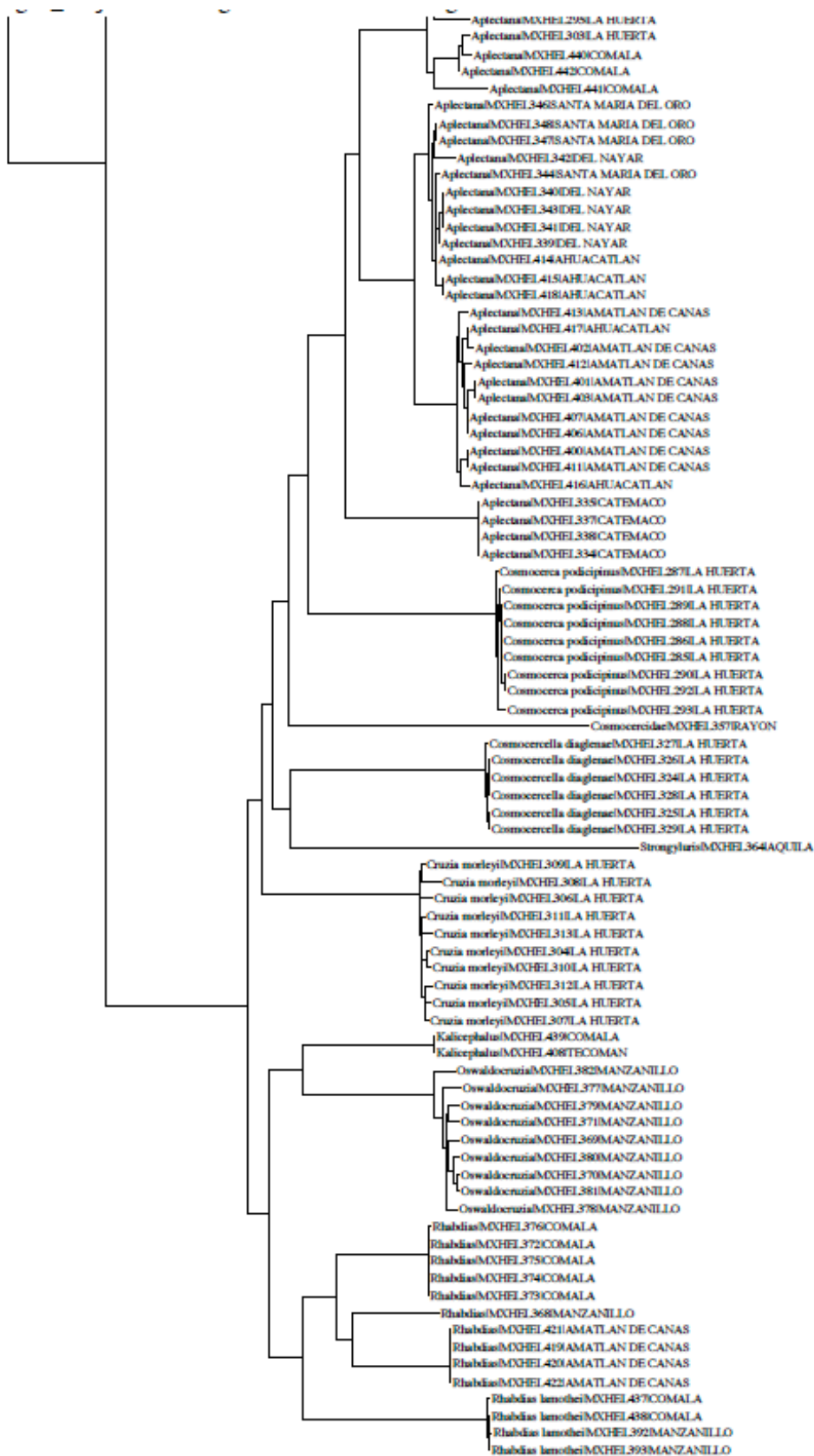
84 registros (ejemplares) de 12 especies
84 registros con secuencias (>360 bp) de 12 especies
84 códigos de barras validados (680 bp +/-)
84 con georeferencia
0 registros con fotografía

*Los datos de este proyecto fueron publicados en Prosser et al. (2013)

Las secuencias de estos 2 proyectos se analizaron conjuntamente ya que los primers utilizados permitieron la obtención del fragmento completo del código de barras (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2004; Prosser et al., 2013). Del análisis de las secuencias se observa que al menos se pueden diferenciar 28 clados que potencialmente son especies independientes, muchas de ellas aún no descritas (Figura 3). Nos encontramos en el proceso de obtener secuencias de otras regiones y respaldar esta información con caracteres morfológicos que nos permitan describir formalmente a las especies.

Figura 3. Árbol de distancias (NJ, Kimura 2 parámetros) que muestra el grado de divergencia entre las secuencias de COI de los nemátodos incluidos en los proyectos NEMMX y NEMNP.





Discusión y conclusiones

El resultado mas relevante de este proyecto son las publicaciones que se derivaron de éste. Se demuestra en primer lugar, que el fragmento de ADN mitocondrial elegido como Código de Barras para los animales son útiles para identificar especies ya descritas de helmintos y para detectar posibles nuevas especies (León-Règagnon, 2010; Martínez -Salazar et al., 2010). El código de barras es una herramienta útil para el trabajo taxonómico, pero de ninguna manera busca sustituirlo. Para delimitar y describir especies, así como para investigar sus relaciones filogenéticas, es necesario incorporar información de diferentes fuentes en análisis robustos como sugieren Will et al. (2005) para lograr lo que se ha llamado "taxonomía integrativa".

Además, se publicó la secuencia de primers específicos para amplificar el código de barras de diversos grupos de nemátodos parásitos, lo cual facilitará la construcción de la biblioteca de códigos de barras de este importante y megadiverso grupo de invertebrados (Prosser et al., 2013).

Bibliografía

- Bowles, J., Blair D. & Mc. Manus, D. P. 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 103-109.
- Brooks, D. R. 2003. Lessons from a quiet classic. *Journal of Parasitology*, 8(6), S878-S885.
- Brooks, D.R. & Hoberg, E.P. 2000. Triage for the Biosphere: The Need and Rationale for Taxonomic Inventories and Phylogenetic Studies of Parasites. *Comparative parasitology*, 67(1), 1-25.
- Brooks, D.R. & Hoberg, E.P. 2006. Systematics and Emerging Infectious Diseases: From Management to Solution. *Journal of Parasitology*, 92(2), 426-429.
- Brooks, D. R., León-Règagnon, V. & Pérez-Ponce de León, G. 2001. Los Parásitos y la Biodiversidad. In: H. M. Hernández, A. N. García A., F. Alvarez y M. Ulloa (Eds.) *Enfoques Contemporáneos para el Estudio de la Biodiversidad*. Instituto de Biología, UNAM, Fondo de Cultura Económica, México pp. 245-289.
- Brooks, D. R., McLennan, D. A., León-Règagnon, V. & Hoberg, E.. 2006. Phylogeny, ecological fitting and lung flukes: helping solve the problem of emerging infectious diseases. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 225-233

- Daszak, P., Cunningham, A. & Hyatt, D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9, 141-150
- Erickson D. L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L. A. & Kress, W. J. 2008. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. *Taxon*, 57(4), 1304–1316.
- Folmer, O., Black, M. Hoech, W. Lutz R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E. Ward, J. R. Altizer, S. Dobson, A. P. Ostfeld, R. S. & Samuel, M. D.. 2002. Ecology - climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296, 2158-2162.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270(Suppl.), S96–S99.
- Hebert, P.D.N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallawachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817.
- Horwitz, P., & Wilcox, B. A.. 2005. Parasites, ecosystems and sustainability: an ecological and complex systems perspective. *International Journal for Parasitology*, 35, 725-732.
- Hudson, P. J., Dobson, A. & Lafferty, K. D. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 381-385.
- Kress, W. J. & Erickson, D. L. 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols. En: W. J. Kress y D. L. Erickson (Eds.). *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. New York: Humana Press. pp. 3–8.
- Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. AGT eds. México. p. 43.
- León-Règagnon, V. 2010. Evidence of new species of *Haematoloechus* (Platyhelminthes: Digenea) using partial *cox1* sequences. *Mitochondrial DNA*, 21(S1), 12-17

- Marcogliese, D. J. 2003. Food webs and biodiversity: are parasites the missing link? *Journal of Parasitology*, 89(Suppl.), 106-113.
- Martínez-Salazar et al. 2010. Molecular evidence that *Langeronia macrocirra* and *Langeronia cf. parva* (Trematoda: Pleurogenidae) parasites of anurans from Mexico are conspecific. *Mitochondrial DNA*, 21(S1), 3-11
- Moszczyńska, A., Locke, S. A., McLaughlin, 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 helminths. *Molecular Ecology Resources*, 2009. 9, 75-82.
- Price, P. W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 237 pp.
- Prosser, S. W. J., Velarde-Aguilar, M. G., León-Règagnon, V. & Hebert, P. D. N. 2013. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1108-1115.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355 – 64 .
- Savolainen, V., Cowan R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. & Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1850–1811.
- Vidal-Martínez, V., Pech, D., Sures, B., Purucker, S. T. y Poulin, R. 2009. Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology*, 26, 44-51.
- 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), 844–51.