

140
2ei



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“UTILIZACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS Y MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACION DE TRES ESPECIES DE GLYPHHELMINS (DIGENEA), PARASITOS DE ANUROS DE MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ULISES JESUS RAZO MENDIVIL



DIRECTOR DE TESIS
DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CODIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN PEDRO LACIETTE

México, D.F.
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Utilización de caracteres morfológicos y moleculares para la
diferenciación de tres especies de Glythelmins (Digenea),
parásitos de anuros de México"

realizado por ULISES JESUS RAZO MENDIVIL

con número de cuenta 8924333-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Propietario

Dr. Juan Pedro Laclette San Roman

Propietario

Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo

Suplente

Dra. Virginia León Régagnon

Suplente

M. en C. Luis García Prieto

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suarez D.

DRA. EDNA MA. SUAREZ DIAZ

Gerardo Pérez Ponce de León
Juan Pedro Laclette San Roman
Marcos Rafael Lamothe Argumedo
Virginia León Régagnon
Luis García Prieto

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
S.A.M.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
262651

**“UTILIZACIÓN DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES PARA LA
DIFERENCIACIÓN DE TRES ESPECIES DE
GLYPHELMINS (DIGENEA), PARÁSITOS DE
ANUROS DE MÉXICO”**

DEDICATORIAS

A mi mamá por la fortaleza que siempre a mostrado ante todas las adversidades, así como por gran apoyo incondicional que me a brindado a lo largo de mi vida y por el enorme amor que le tengo.

A mi papá por su apoyo y comprensión.

A Edgar y Maribel.

A mi abuelita Raquel.

A toda mi familia por su apoyo desinteresado: Edsón, Carlos, Oscár, César, Brenda, Omar, Aries, Yol, Ros, Chapa,, Güich, Yesi, Lili, Gris, Sonia y Ana.

A mi hermanita Tania.

A ti, que ya no estás conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Hernández, Director del Instituto de Biología de la U.N.A.M., por el uso de las instalaciones.

Al Dr. Fernando Alvarez, Jefe del Departamento de Biología.

Agradezco a CONACYT por el apoyo financiero destinado al proyecto con No. 2676-PN.

Al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León director del presente trabajo, por ser un maestro excepcional, al cual le debo gran parte de mi formación académica, así como la iniciación en este campo de la Biología. Además, le agradezco haberme hecho partícipe del proyecto con No. 2676-PN.

Al Dr. Juan Pedro Laclette, codirector del presente estudio y por formar parte del sínodo, así como por haberme permitido utilizar las instalaciones y equipo del Departamento de Inmunología del IIBM.

Al Dr. Marcos Rafael Lamothe-Argumedo, Jefe del Laboratorio de Helmintología, por formar parte del sínodo, así como por haberme permitido hacer uso de las instalaciones del mismo y por sus acertados comentarios a este trabajo.

A la Dra. Virginia León Régagnon, por la revisión hecha al presente y por los comentarios hechos al mismo, así como por haberme proporcionado material proveniente de los Estados Unidos.

Al M. en C. Luis García Prieto, por formar parte del sínodo, por la revisión del presente trabajo, así como sus acertados comentarios al mismo. Adicionalmente, por la disposición en todo momento, en el préstamo de bibliografía y material de la CNHE.

Al Biol. Martín García Varela, por haberme ayudado y enseñado parte de la técnica de secuenciación, ya que sin ello este trabajo no podría haber sido terminado.

Al Dr. Dan Brooks, de la Universidad de Toronto, Canadá, por haberme prestado las preparaciones de varias especies del género *Glythelmins*, que fueron de muchísima ayuda.

Al Sr. Marcelo Paxtian por la recolecta de los huéspedes en la región de "Los Tuxtles", Veracruz.

A mis amigos Gerardo P. P. de L., Luis G. Agustín J. y Martín G., por brindarme su amistad incondicional, por su ayuda desinteresada y por esos momentos tan agradables que hemos pasado juntos.

A mi hermanita Tania, por la gran amistad que nos une, la ayuda y apoyo desinteresado que me ha brindado en todo momento, por todas las cosas que compartimos y los momentos felices que hemos pasado.

A mis amigos de la Facultad: Tania, Jorge, Sonia, Alejandro, Iris, Leonel, Nazario, Cadena, con los cuales he vivido experiencias muy halagadoras.

A mis amigas: Tania, Sandra, Ivonne, Miriam por su amistad y apoyo incondicional en todo momento.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Helmintología: Agustín, Mely, Georgina, Jorge, Rosario, Luz María, Vicky, David, Fernando, Elizabeth C., Sol, Griselda, Claudia, Angélica, Berenitt, Cristina, Irma; así como del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Martín, Pepe, Pedro Ostoa, Patricia de la Torre, Carlos C., Dayana, Laura M., Laura V., Carlos, Pavel y Yoshi.

A todas las mujeres que han estado a mi lado a lo largo de mi vida, principalmente a esa persona que ya no está conmigo y que gran parte de este trabajo se lo debo a ella.

Gracias.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	
AGRADECIMIENTOS	
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
GENERALIDADES	
EL GÉNERO <i>Glypthelmins</i>	
DNA RECOMBINANTE	
MARCADORES MOLECULARES	
a) POLIMORFISMOS DEL ADN AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD's)	
b) POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's)	
c) SECUENCIAS DE GENES	
II.- ANTECEDENTES.....	4
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
IV.- OBJETIVOS.....	16
V.- MATERIAL Y METODO.....	17
a) COLECTA DE HOSPEDEROS	
b) ESPECIES DE HOSPEDEROS COLECTADOS	
c) OBTENCIÓN DE HELMINTOS	
d) OBSERVACIONES EN VIVO	
e) FIJACIÓN	
ESTUDIO MORFOLÓGICO	
PROCESAMIENTO	
ESTUDIO MORFOMÉTRICO	
REVISIÓN DE LOS LOTES DE LA CHNE	
ESTUDIO MOLECULAR	
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL	
AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	
SECUENCIACIÓN DE ADN DE DOBLE CADENA POR PCR	
ELECTROFORESIS DE UN GEL DE SECUENCIA	
VI.- RESULTADOS.....	25
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	
ANÁLISIS MOLECULAR	
VII.- DISCUSIÓN.....	37
VIII.- CONCLUSIONES.....	45
IX.- BIBLIOGRAFIA.....	46

I. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

La clase Trematoda dentro del phylum Platyhelminthes, fue propuesta originalmente por Rudolphi en 1808 para incluir un grupo de gusanos parásitos caracterizados por la presencia de una ventosa en el cuerpo. Algunos años más tarde, Burmeister dividió a los tremátodos en tres grupos, de acuerdo con la naturaleza de sus órganos adhesivos, Malacobothrii, Pectobothrii y Aspidobothrii. Van Beneden elevó a los tremátodos al rango de clase en 1858, dividiéndola a su vez en dos órdenes, con base en las características de su ciclo de vida: digenéticos y monogénicos, a los cuales Carus en 1863 nombra como Digenea y Monogenea respectivamente. Posteriormente, en 1936, Faust y Tang reconocieron tres subclases de Trematoda, denominándolas Monogenea, Digenea y Aspidogastrea. Sin embargo, en años recientes los Monogenea han sido colocados como una clase independiente dentro de los Platyhelminthes (Prudhoe & Bray, 1982).

Los digéneos, dentro de los Trematoda son uno de los grupos de gusanos parásitos más comunes y abundantes; después de los nemátodos, son los que presentan probablemente la mayor riqueza específica. Los digéneos se caracterizan por ser endoparásitos de toda clase de vertebrados, principalmente, de peces marinos; como adultos o como juveniles, habitan casi en cualquier órgano del cuerpo de vertebrados. Su desarrollo ocurre en por lo menos dos huéspedes. El primero puede ser un molusco, o más raramente un anélido. Muchas especies incluyen en sus ciclos biológicos un segundo y algunas veces, un tercer huésped intermediario (Schmidt & Roberts, 1977).

Estos parásitos se caracterizan por la presencia de dos ventosas musculares con forma de copa, generalmente sin ganchos u otros órganos accesorios de fijación; por los poros genitales que normalmente abren sobre la superficie ventral entre las ventosas y por un poro excretor posterior (Noble *et al.*, 1989).

La mayoría de los tremátodos digéneos son aplanados dorsoventralmente y de forma oval, aunque los hay tan gruesos como anchos; algunas especies son filiformes, redondas, o más anchas que largas. El cuerpo está cubierto por un tegumento sincicial que es anucleado y

que se conecta por estrechos procesos citoplásmicos con los llamados citones tegumentales que, contienen al núcleo y que se localizan por debajo de la membrana basal. La musculatura está compuesta por músculos externos circulares, longitudinales y diagonales. Al tegumento se le asocian las funciones tanto respiratoria como de absorción y protección. La superficie externa del tegumento se encuentra aumentada por proyecciones digitiformes designadas como microtrichas (Noble *et al.*, 1989).

El sistema digestivo generalmente incluye una boca anterior, terminal o subterminal, rodeada por la ventosa oral; la boca se continua con una faringe musculosa, la cual ocasionalmente está ausente. Algunas veces se presenta un pequeño tubo (prefaringe), que conecta la boca con la faringe. Raramente, la faringe desemboca directamente en un ciego sencillo, haciéndolo la mayoría de las veces en un par de estructuras tubulares o ciegos intestinales, o abre en un esófago, el cual se bifurca en estos últimos. En algunas formas, los ciegos tienen divertículos laterales, pero en otras se comunican directamente con una vesícula excretora situada posteriormente, o excepcionalmente pueden desembocar al exterior por poros anales. El tipo de alimentación es suctorial, asociado con el proceso de adhesión de la ventosa oral y de la faringe muscular (Prudhoe & Bray, 1982).

El sistema excretor, que probablemente posee tanto una función osmorreguladora como excretora, consiste de células en flama o protonefridios embebidos en el parénquima y situados en los extremos laterales del cuerpo. La vesícula excretora es básicamente en forma de "V", "Y" o "T" y desemboca al exterior a través de un poro excretor terminal o subterminal, también denominado nefridioporo y que se ubica en el extremo posterior del cuerpo (Prudhoe & Bray, 1982).

La organización del sistema nervioso es escalonado, típico de los platelmintos. Tienen un par de ganglios cerebrales conectados por comisuras supraesofágicas. De éstos salen varios nervios anteriores y hay tres pares principales de troncos nerviosos -dorsal, lateral y ventral- que inervan las partes posteriores del cuerpo. Los nervios ventrales, por lo común, están más desarrollados y un número variable de comisuras unen a éstos y a otros nervios longitudinales. Las ramas proporcionan terminaciones motoras y sensoriales a los músculos y tegumento. La porción anterior, especialmente la ventosa ventral, está bien provista de terminaciones sensoriales (Schmidt & Roberts, 1977).

Los tremátodos digéneos son en su mayoría hermafroditas, algunas formas son gonocorísticas y dioicas. Como regla general, poseen dos testículos; la presencia de uno o más de dos es poco frecuente, aunque característico de dos o tres familias de tremátodos. Cada testículo presenta un vaso eferente que se conecta con el otro para formar el vaso deferente, este abre, por lo regular, en una bolsa del cirro en donde se expande en una vesícula seminal interna para almacenar esperma. Estrechándose nuevamente el tubo, forma un conducto eyaculador delgado, que se extiende por el resto de la longitud de la bolsa del cirro y forma, en su terminación distal, el cirro muscular. El cirro es el órgano copulador masculino, que se invagina y evagina en la bolsa del cirro para transferir el esperma al sistema reproductor femenino del otro individuo. El cirro puede estar desnudo o cubierto de espinas de diferentes tamaños. El conducto eyaculador suele estar rodeado por numerosas glándulas prostáticas unicelulares. En este punto, una dilatación forma la pars prostática. El sistema reproductor femenino posee un ovario, generalmente oval o redondo, que puede estar lobulado o aún ramificado. El corto oviducto tiene un esfínter proximal, el ovicpto, que controla el paso de los huevos. El oviducto y la mayoría de los canales femeninos son ciliados. El receptáculo seminal se forma como una bolsa externa de la pared del oviducto, grande o pequeño, pero casi siempre presente. En la base del receptáculo seminal frecuentemente se forma un tubo delgado, el canal de Laurer, que termina ciego en el parénquima o se abre a través del tegumento. Siguiendo las aberturas o abertura común del receptáculo seminal y del canal de Laurer, el oviducto está rodeado por una acumulación de células, conocidas como glándulas de la cáscara, y en conjunto representan a la glándula de Mehlis, cuya secreción pasa dentro de una porción modificada del oviducto conocida como ootipo. Las glándulas vitelógenas pueden formar un órgano compacto, el vitelarium, o un par de tales órganos, pero en muchas familias las glándulas están dispuestas en folículos en dos campos simétricos. Desde el ootipo, el oviducto continúa, pero inmediatamente se ensancha para formar el útero, el cual contiene muchos huevos y generalmente ocupa una gran porción del cuerpo con sus numerosas asas. La porción distal del útero es algunas veces muscular, glandular o forrado con espinas, y representa a la vagina o metratermo. Generalmente, el metratermo desemboca al exterior cerca de la abertura masculina, casi siempre ambas aberturas abren en un atrio genital. El poro

genital es variable en posición, pero frecuentemente está localizado sobre o cerca de la línea media de la superficie ventral del cuerpo (Prudhoe & Bray, 1982).

El ciclo de vida de los tremátodos puede presentar numerosas modificaciones. En general, se inicia cuando los huevos salen del huésped definitivo junto con las heces (esputo u orina). Caen en el medio acuático y pueden ser comidos o no por el primer huésped intermediario, que generalmente es un caracol o rara vez un anélido. En el caso de que sean ingeridos por el caracol, los huevos eclosionan en el intestino y liberan al miracidio. Por otro lado, los huevos pueden eclosionar en el medio acuático y liberar un miracidio ciliado libre nadador el cual, busca y penetra al caracol. Dentro del molusco, el miracidio, da origen a un esporocisto, dentro de éste se originan redias, y dentro de cada una de las redias, cercarias; siempre asexualmente. Las cercarias salen del molusco, pueden penetrar directamente al huésped como en el caso de las especies de la familia Schistosomatidae, o bien enquistarse, constituyendo una nueva fase larvaria llamada metacercaria. Esta puede enquistarse en hierbas acuáticas, insectos, moluscos, crustáceos, larvas de insectos, peces, anfibios, reptiles o mamíferos que actúan como segundos huéspedes intermediarios, que, al ser comidos por un huésped definitivo, alcanzan su estado adulto, maduran y se cierra el ciclo (Lamothe, 1983). Sin embargo, hay variaciones de las cuales las más comunes son: (1) más de una generación de esporocistos o redias, (2) supresión, ya sea de las generaciones de esporocistos o redias y (3) la supresión de las metacercarias (Prudhoe & Bray, 1982).

EL GÉNERO *Glythelmins*

El género *Glythelmins* fue establecido por Stafford (1905) para incluir a *Distomum quietum* Stafford, 1900, parásito del intestino de *Rana catesbeiana*, *R. virescens* e *Hyla pickeringii* en Canadá; de esta forma, la especie tipo del género es *G. quietum* (Stafford, 1900) Stafford, 1905. Desafortunadamente en ninguno de los trabajos de Stafford (1900 y 1905) se presentó una diagnóstico completa y precisa del género, ni se le asignó a una categoría taxonómica superior.

Posteriormente, Cort (1919) erigió el género *Margeana*, con base en un digéneo parásito del intestino de *Rana aurora* de California, E. U., al cual denominó *M. californiensis*

Cort, 1919, señalando su afinidad con *Brachycoelium hospitale* (Sttaford, 1900), en cuanto al tamaño y forma del cuerpo, así como a la posición y las dimensiones de la ventosa ventral y la posición de los órganos genitales; con base en lo anterior, Cort incluyó a *Margeana* en la subfamilia Brachycoeliinae Looss, 1899, mencionando que dicha inclusión requería de una revisión basada exclusivamente en las características del aparato digestivo y de la vesícula excretora.

En un estudio sobre *G. quieta*, Miller (1930) refirió una gran variación en las dimensiones de su cuerpo, producto de la contracción y extensión, la cual afectaba también a algunos de los órganos internos en organismos vivos; además realizó observaciones acerca de los cambios producidos por los procesos de fijación y aplanamiento de los parásitos. Adicionalmente, incluyó una redescrición de *G. quieta* y una revisión de la descripción original de *Margeana californiensis*, llegando a la conclusión de que ambas especies compartían rasgos morfológicos similares; la única diferencia evidente que encontró entre ellas, fue la presencia de prominentes glándulas perifaríngeas en *G. quieta*, mientras que *M. californiensis* carecía de las mismas. Por lo anterior, decidió sinonimizar al género *Margeana* con *Glythelmins*, por lo que *M. californiensis* paso a ser *G. californiensis* (Cort, 1919) Miller, 1930. Asimismo, Miller (1930) propuso remover el carácter presencia o ausencia de glándulas perifaríngeas de la descripción original del género. Aunque enlista siete especies [*G. quieta*; *G. linguatula* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1924; *G. parva* Travassos, 1924; *G. repandum* (Rud., 1819) Travassos, 1924; *G. elegans* Travassos, 1926; *G. staffordi* Tubangui, 1928; y *G. californiensis* (Cort, 1919), Miller, 1930] expresa la necesidad de someter al género a una revisión exhaustiva, debido a que las características de algunas de las especies mencionadas, no correspondían con las referidas en la descripción original del género *Glythelmins*, establecida por Stafford (1905).

En un estudio sistemático de los tremátodos de la subfamilia Plagiorchiinae Pratt, 1902, Olsen (1937) aceptó la propuesta de Miller para incluir en el género *Glythelmins* a las especies con y sin glándulas perifaríngeas; asimismo, presentó una clave para las especies consideradas por Miller y a la cual, adicionó otras dos *G. subtropica* Harwood, 1932, parásito de *R. catesbeiana* y *R. sphenoccephala* en Houston y Huntsville, Texas y *G. shastai*, Ingles, 1936 como parásito de *B. boreas* en Shasta County, E. U.

Caballero (1938), realizó una revisión taxonómica de las especies de *Glythelmins* conocidas hasta ese momento proponiendo una clave para aquellas que consideró válidas, con base en los siguientes caracteres: presencia o ausencia de glándulas perifaringeas, así como de prefaringe; relación de los diámetros de la ventosa oral y el acetábulo, y la situación y tamaño de los testículos. En su clave, Caballero incluyó diez especies válidas, aquellas enlistadas por Miller (1930) y Olsen (1937) y una adicional, *G. rugocaudata* (Yoshida, 1916) Yahata, 1934 parásito de *R. nigromaculata* en Japón. Por último, sitúa al género en la subfamilia Brachycoeliinae y siguiendo el criterio de Johnston, eleva ésta a nivel de familia (Brachycoelidae Johnston, 1912).

Considerando la sugerencia de Miller, acerca de la revisión del género, Rankin (1944) realizó un estudio sistemático sobre las especies del género *Glythelmins*, parásitas de anfibios de Estados Unidos, Canadá y de material proveniente de Panamá. Para dicho trabajo, empleó las claves de Olsen (1937) y Caballero (1938), encontrando que, al tratar de identificar a los parásitos a nivel específico, estas claves eran inoperantes, por lo cual decidió basarse en caracteres que no presentaran tanta variación, como aquellos utilizados por los autores mencionados. De esta manera, utilizó rasgos como la presencia y forma del metratermo, y la extensión de las asas uterinas y de las glándulas vitelógenas, lo que le permitió separar y diferenciar a las especies. Rankin (1944) incluyó también una discusión relacionada con la variación morfológica de adultos de la especie *G. quieta*, con base en cientos de ejemplares vivos colectados de *Rana catesbeiana* de Seattle, Washington, E. U.. El autor consideró sólo cuatro especies válidas: *G. quieta*, *G. elegans*, *G. linguatula* y *G. repandum*, sinonimizando a las especies *G. californiensis*, *G. parva*, *G. rugocaudata*, *G. shastai*, *G. staffordi*, y *G. subtropica* con la especie tipo.

Ruiz (1949) realizó un trabajo comparativo entre las especies *Glythelmins elegans* Travassos, 1926, *Choledocystus eucharis* Pereira & Cuocolo, 1941 y *C. vesicalis* Ruiz & Leao, 1942, todas parásitas de anuros de Brasil, y en el cual transfirió a la primera especie al género *Choledocystus* Pereira y Cuocolo 1941 y sinonimizó las dos restantes con *C. elegans* (Travassos, 1926) Ruiz, 1949, a la cual definió como especie tipo. Adiciona una diagnosis del género *Choledocystus* en términos más completos, diferenciándolo de *Plagiorchis* Lühe, 1899 y de *Glythelmins* Stafford, 1905, tomando en cuenta rasgos de algunas especies

pertenecientes al último género. Finalmente, colocó a *C. intermedius* Caballero, Bravo y Cerecero, 1944 como un miembro más de *Choledocystus*.

Byrd, 1950 (In: Babero, 1951a) aceptó las propuestas de Rankin, pero transfirió a *Glythelmins repandum*, Travassos, 1924 al género *Microderma* Mehra, 1931, manteniendo como especies válidas a *G. quieta*, *G. linguatula* y *G. elegans*. Aparentemente, considera a *Glythelmins* como el género dentro del cual se debía incluir a la especie *C. elegans*. Siguiendo con la problemática taxonómica de las especies pertenecientes al género *Glythelmins*, Babero (1951a) mencionó dos alternativas que desde su punto de vista, podrían corregir la sistemática del grupo; por una parte, sugirió crear un género nuevo para situar a las especies de Sudamérica y por otro lado, corregir la diagnosis genérica, de forma que las características empleadas en la misma englobaran a estas especies. La propuesta de estas alternativas surgieron del estudio de los tipos y paratipos disponibles de las especies asignadas a este género, del estudio de la literatura disponible hasta ese momento, así como de la discusión y comentarios personales de investigadores que habían trabajado con *Glythelmins*. En una comunicación personal, Freitas mencionó a Babero que las especies del género podían ser divididas en dos grupos : a) las especies con glándulas perifaringeas y sin asas uterinas desarrolladas en la zona pretesticular y b) especies sin glándulas perifaringeas y con asas uterinas desarrolladas en la zona pretesticular. Babero consideró que con base en esta última característica, debería crearse un nuevo género para incluir a *G. linguatula*, *G. repandum*, *G. palmipedis*, *G. simulans* y *G. proximus*. Diferió de la opinión de Byrd (1950) al no incluir a *G. repandum* como un miembro de *Microderma*, debido a que este género se caracteriza por la ausencia de un esófago y la posesión de una vesícula seminal espiralada; por lo que expresó la necesidad de realizar un estudio más detallado de *G. elegans*, ya que ésta había sido trasladada a *Choledocystus*. En este mismo año, Babero (1951b) describió un digéneo colectado en el intestino de una "rana verde" de México, para el cual creó el género *Rauschiella* con la especie *R. tineri* Babero, 1951; al examinar ejemplares de *G. repandum*, encontró ciertas semejanzas entre esta especie y *R. tineri*, por lo que sugirió su transferencia al género *Rauschiella*.

Más adelante, Cheng (1959) reestableció el género *Margeana* con base en la ausencia de glándulas perifaringeas, con lo cual defendió el valor de este carácter, como diagnóstico a

nivel genérico. Por lo tanto, en su trabajo solo toma en cuenta tres especies válidas del género *Glypthelmins* y a 11 pertenecientes a *Margeana*. Además, erigió al género *Reynoldstrema* para transferir a *Glypthelmins africana*, ya que según él, las características que presenta esta especie, no correspondían con las diagnósticas para los géneros *Glypthelmins* y *Margeana*.

Byrd & Maples (1963) rechazaron el reestablecimiento de *Margeana*, basándose en el hecho de que algunos organismos no presentan dichas glándulas. Enfatizan que de acuerdo a la técnica de tinción que se utilice, la apariencia de las glándulas es muy variable, ya que con algún colorante utilizado a veces se observan perfectamente, mientras que al utilizar uno diferente no se tiñen o se observan tenuemente. Transfieren la especie *G. pennsylvaniensis* Cheng, 1961 a *Choledocystus*. Por último proponen un nuevo género, *Repandum* Byrd & Maples 1963, al cual trasladan a las especies, *G. repandum*, *G. palmipedis* y *G. sera*.

Nasir (1966) sinonimizó los géneros *Margeana*, *Choledocystus*, *Reynoldstrema* y *Repandum* con *Glypthelmins*, en el cual incluyó 20 especies válidas.

Posteriormente Nasir & Diaz (1970) propusieron una clave para identificar 13 especies de *Glypthelmins*, basándose en las características del ciclo de vida - conocido solo para tres especies - y en caracteres morfológicos de los organismos.

En su obra, Yamaguti (1971) aceptó la sinonimia de *Margeana*, *Choledocystus* y *Repandum* con *Glypthelmins*, enlistando un total de 23 especies válidas para el género.

Sullivan (1976) mencionó que el género *Glypthelmins* lo constituían 28 especies, a las cuales dividió en dos grupos de acuerdo con la forma de la vesícula excretora; en uno de los grupos colocó a las especies con vesícula excretora en forma de "Y", en el otro agrupó a las que presentaban una vesícula excretora parecida a una "T". Como resultado de estas observaciones, incluyó en el primer grupo a las formas Sudamericanas, representadas por quince especies (dos de las cuales fueron registradas en América Central y una en México). A las formas Norteamericanas, así como a una forma Centroamericana y a las descritas para el Sureste de Asia, Japón y Korea, las colocó en el segundo grupo. Por lo anterior y por presentar las especies características tanto de la familia Plagiorchiidae como de la Macroderoididae, propuso que aquellas especies con vesícula en forma de "Y" deberían ser restringidas a la familia Plagiorchiidae, mientras que las restantes con vesícula en forma de "T" fueran colocadas en la familia Macroderoididae. Adicionalmente, hizo una corrección de la

diagnosis del género, enfatizando que los parásitos pertenecientes al mismo poseen una vesícula excretora en forma de "I", por lo que solo consideró a *G. quieta*, *G. rugocaudata*, *G. staffordi*, *G. shastai* y *G. facioi* como especies válidas, colocándolas en la familia Macroderoididae. Por último hizo una redescrición de *G. facioi* parásito de *R. pipiens* de Costa Rica.

Brooks (1977) aplicó la metodología cladista con el fin de inferir la historia evolutiva de tres géneros pertenecientes a la subfamilia Plagiorchioidae: *Mesocoelium*, *Opistoglyphe* y *Glypthelmins*, todos parásitos intestinales de anuros. Este autor examinó las implicaciones acerca de la interrelación entre la hipótesis cladista y la zoogeografía de los tres géneros, poniendo especial atención en el género *Glypthelmins*, debido a que sus especies tienen una distribución cosmopolita, y por lo tanto le sirvieron como un modelo para estudios evolutivos. Analizó un total de 19 especies pertenecientes al género, transfiriendo al mismo a *R. tineri* por poseer una vesícula excretora en forma de "I".

Prudhoe & Bray (1982) colocaron al género *Glypthelmins* dentro de la familia Plagiorchiidae, señalando que lo componían 27 especies. Sin embargo, estuvieron en desacuerdo con Yamaguti (1971), debido a que no consideraron al género *Choledocystus* como sinónimo de *Glypthelmins*, ya que para ellos la ausencia de receptáculo seminal y la extensión lateral de las ramas uterinas más allá de los ciegos y cerca de las glándulas vitelógenas, son diferencias suficientes para reconocer a *Choledocystus* como un género aparte. Por otra parte, reestablecieron la validez del género *Rauschiella*, ya que los organismos representantes de este género poseen una vesícula seminal enrollada y la extensión de las ramas uterinas no llega hasta la parte posterior del cuerpo, como en el caso de *Glypthelmins*.

A partir de lo anterior, se pone de manifiesto que la clasificación de este grupo de digéneos parásitos de anuros, es aún inestable en taxa supraespecíficos, desconociéndose con certeza las relaciones genealógicas entre los géneros señalados, dada la incertidumbre para reconocer su validez taxonómica. Adicionalmente, diferentes autores que han trabajado con el género *Glypthelmins* no han llegado a un acuerdo en relación al número total de especies que lo constituyen, ya que no comparten los mismos criterios para sinonimizar los géneros *Margeana*, *Choledocystus*, *Reynoldstrema*, *Repandum* y *Rauschiella* con *Glypthelmins*. Esta controversia se debe principalmente a: I) la inadecuada caracterización genérica; II)

Insuficiente información disponible para los investigadores que han revisado a algunas de las especies del género y III) la estrecha relación de otros géneros con *Glypthelmins*.

Los últimos listados de las especies válidas del género, se remontan a la década de los 70's, cuando Yamaguti (1971) enlista un total de 23 especies; posteriormente Prudhoe & Bray (1982) consideran 27 especies pertenecientes a *Glypthelmins*.

Debido a que no existe consenso entre los diferentes autores acerca del número total de especies y el presente trabajo no trata acerca de la validez o sinonimia de ellos con *Glypthelmins*, enlistamos un total de 32 especies, las cuales han sido consideradas en algún momento dentro del género *Glypthelmins* (Tabla 1).

Tabla 1. Registros originales de las especies del Género *Glyphelminis* (Stafford, 1900) Stafford, 1905

ESPECIE	HOSPEDERO	HABITAT	LOCALIDAD	AUTOR
◦ <i>Glyphelminis californiensis</i> (Cort, 1919) Miller, 1930	<i>Rana aurora</i>	Intestino	San Francisco, California, Estados Unidos	Cort, 1919.
* <i>Glyphelminis chaquensis</i> Mañé-Garzón & Holzman-Spector, 1967	<i>Leptodactylus laticeps</i>	Intestino delgado	Argentina	Mañé-Garzón & Holzman-Spector, 1967 a.
◦ * <i>Glyphelminis diana</i> Belous, 1958	<i>Rana temporaria</i>	Intestino y estómago	Primorskii Krai, ex USSR	In: Yamaguti, 1971.
◦ <i>Glyphelminis elegans</i> Travassos, 1926	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Intestino delgado	Sao Paulo, Brasil	Travassos, 1926.
◦ * <i>Glyphelminis facioi</i> Brenes-Madrigal, Arroyo-Sancho, Jiménez-Quiroz & Deigado-Flores, 1959	<i>Rana pipiens</i>	Intestino delgado	Corís, Provincia de Cartago, Costa Rica	Brenes <i>et al.</i> , 1959.
◦ * <i>Glyphelminis festina</i> Cordero, 1944	<i>Bufo arenarum</i>	Vesícula biliar	Montevideo, Uruguay	Cordero, 1944.
◦ * <i>Glyphelminis hylourens</i> Martin, 1969	<i>Hyla regilla</i>	Intestino	Oregon, Estados Unidos	Martin, 1969.
♥ <i>Glyphelminis intestinalis</i> (Lucker, 1931), Rannala, 1990	<i>Rana pretiosa</i>	Intestino	Utah, Estados Unidos	Rannala, 1990.
◦ * <i>Glyphelminis incurvatum</i> Nasir, 1966	<i>Pseudis paradoxa</i>	Intestino	Valle de la Pascua, Estado Guarico, Venezuela	Nasir, 1966.
◦ <i>Glyphelminis intermedia</i> (Caballero, Bravo-Hollis & Zerocero, 1944) Yamaguti, 1958	<i>Bufo marinus</i>	Hígado y vesícula biliar	Río Huixtla, Huixtla, Chiapas, México	Caballero <i>et al.</i> , 1944.

Tabla 1. (Continuación)

◦ <i>Glypthelmins lenti</i> (Teixeira de Freitas, 1941) Prudhoe & Bray, 1982	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Estómago Intestino delgado	Montevideo, Uruguay	Teixeira de Freitas, 1941.
◦ <i>Glypthelmins linguatula</i> (Rudolphi, 1819) Travassos, 1924	<i>Cystignatus ocellatus</i>	Intestino delgado	Brasil	Travassos, 1924.
◦ <i>Glypthelmins palmipedis</i> (Lutz, 1928) Travassos, 1930	<i>Rana palmipes</i>	Pulmón	?	<i>In: Cheng, 1959.</i>
◦ <i>Glypthelmins parva</i> Travassos, 1924	<i>Cystignatus ocellatus</i>	Intestino	Brasil	Travassos, 1924.
◦ <i>Glypthelmins pennsylvaniensis</i> Cheng, 1961	<i>Hyla crucifer</i>	Intestino	Lake Warren, Pennsylvania, Estados Unidos	Cheng, 1961.
◦ <i>Glypthelmins proximus</i> Teixeira de Freitas, 1941	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Intestino y estómago	Montevideo, Uruguay	Teixeira de Freitas, 1941.
◦ <i>Glypthelmins pseudium</i> Mañé-Garzón & Holcman-Spector, 1967	<i>Pseudis mantidactylus</i>	Intestino delgado	Baños de la Coronilla, Departamento de Rocha, Uruguay	Mañé-Garzón & Holcman- Spector, 1967 b.
◦ <i>Glypthelmins quieta</i> (Stafford, 1900) Stafford, 1905	<i>Rana catesbeiana</i> <i>Rana virescens</i> <i>Hyla pickeringii</i>	Intestino	Canadá	Stafford, 1905.
◦ <i>Glypthelmins ramitesticularis</i> Nasir, 1966	<i>Pseudis paradoxa</i>	Pulmón	Valle de la Pascua, Estado Guarico, Venezuela	Nasir, 1966.
◦ <i>Glypthelmins rangeli</i> (Artigas & Zerpa, 1961) Prudhoe & Bray, 1982	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	?	Brasil	<i>In: Prudhoe & Bray, 1982.</i>

Tabla 1. (Continuación)

	<i>Cystignatus ocellatus</i>	Intestino	Brasil	Travassos, 1924.
◦ <i>Glypthelmins repandum</i> (Rudolphi, 1818) Travassos, 1924				
* <i>Glypthelmins robustus</i> Brooks, 1976	<i>Bufo marinus</i>	Intestino delgado	Huila, Colombia	Brooks, 1976.
◦ <i>Glypthelmins rugocaudata</i> (Yoshida, 1916) Yahata, 1934	<i>Rana nigromaculata</i>	Intestino	Japón	In: Caballero, 1938.
* <i>Glypthelmins sanmartini</i> Mañé-Garzón & Holcman-Spector, 1974	<i>Chihonepeton indistinctum</i>	Intestino delgado	Departamento de Canelones, Uruguay	Mañé-Garzón & Holcman-Spector, 1974.
* <i>Glypthelmins sera</i> (Cordero, 1944), Prudhoe & Bray, 1982	<i>Chihonepeton indistinctum</i>	Intestino delgado	Montevideo, Uruguay	Cordero, 1944.
◦ <i>Glypthelmins shastai</i> Ingles, 1936	<i>Bufo boreas</i>	Intestino	Shasta County, Estados Unidos	Ingles, 1936.
◦ <i>Glypthelmins simulans</i> Teixeira de Freitas, 1941	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Estómago, intestino y recto	Montevideo, Uruguay	Teixeira de Freitas, 1941.
◦ <i>Glypthelmins staffordi</i> Tubangui, 1928	<i>Rana vittigera</i>	Intestino	Los Baños and Bay, Laguna Province Luzon, Philippines	Tubangui, 1928.
◦ <i>Glypthelmins subtropica</i> Harwood, 1932	<i>Rana catesbeiana</i> <i>Rana sphenoccephala</i>	Intestino	Houston and Huntsville, Texas, Estados Unidos	Harwood, 1932.
♥ <i>Glypthelmins ineri</i> (Babero, 1951) Brooks, 1977	?	?	México	Babero, 1951b.
◦ <i>Glypthelmins vesicalis</i> (Ruiz & Leao, 1942), Yamaguti, 1971	<i>Bufo marinus</i>	Vesícula biliar	Sao Paulo, Brasil	Ruiz & Leao, 1942.
◦ <i>Glypthelmins vitellimophilum</i> (Dobbin, 1958)	<i>Hyla raniceps</i>	Intestino delgado	Estado de Pernambuco, Brasil	Dobbin, 1958.

◦ Especies válidas para Yamaguti (1971) *Especies válidas para Prudhoe & Bray (1982) ♥ Especie no considerada por ninguno de los dos autores.

EL DNA RECOMBINANTE

Tradicionalmente, los caracteres morfológicos han constituido la única base para la mayoría de los estudios taxonómicos, generando el sistema básico de clasificación para gran parte de los taxa. En la medida que estos sistemas se pretenden refinar, se han usado datos adicionales como: número de cromosomas, citoquímica, micromorfología, anatomía y ultraestructura, entre otros (Nieto & Llorente 1989).

El enorme y reciente desarrollo tecnológico ocurrido en la biología molecular, ha producido técnicas que han repercutido y revolucionado los estudios en casi todas las ramas de la biología. En particular, las nuevas técnicas del DNA recombinante y el perfeccionamiento de los métodos para secuenciar ácidos nucleicos, han contribuido con una gran cantidad de caracteres moleculares, extraordinariamente útiles en estudios de taxonomía y sistemática. En la década pasada, estas técnicas comenzaron a utilizarse en la caracterización e identificación de helmintos parásitos de animales domésticos y del hombre, con lo que se han constituido en una herramienta adicional para la taxonomía (Rollinson *et al.*, 1986).

La incorporación de los caracteres moleculares, ha sido útil en el estudio de taxa donde los caracteres morfológicos, por sí solos, no permiten resolver los problemas taxonómicos. Estos pueden provenir de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, e incluyen reacciones inmunológicas, isoenzimas, secuencias de proteínas, hibridación de DNA, patrones de bandeo con enzimas de restricción tales como los RFLP's (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), los RAPD's (polimorfismo del DNA amplificado al azar), el "fingerprinting" (huella digital) del DNA y las secuencias de genes, como es el caso de los ribosomales (González, 1997).

Las técnicas moleculares permiten definir relaciones entre organismos con una gran precisión y se han definido distintos marcadores moleculares que pueden ser usados de acuerdo a la distancia evolutiva de los que se analizan (desde especies hasta taxa superiores). El potencial de los marcadores moleculares es enorme. Por ejemplo, se han utilizado para estudiar la variabilidad genética de distintos grupos de seres vivos, para detectar cambios en el genoma o para determinar la estructura de las poblaciones. Además, ayudan a clasificar a los individuos a nivel de especie, a conocer el origen y evolución de los distintos grupos de

organismos (Valverde & Paredes-López, 1996). El empleo de estas metodologías ha venido a robustecer la filogenia de prácticamente todos los grupos de seres vivos, desde las bacterias hasta los primates (Hillis *et al.*, 1990).

MARCADORES MOLECULARES

Algunos marcadores moleculares que se han utilizado en estudios de helmintos incluyen: hibridización del DNA genómico con oligonucleótidos, secuencias de genes ribosomales, RAPD's, RFLP's, entre otros.

a) RAPD's

Los RAPD's detectan cambios en la secuencia del DNA en un sitio arbitrario en el genoma. Estos cambios se manifiestan en el número y longitud de los productos amplificados. Los polimorfismos resultan de cambios en la secuencia de los sitios de unión del "primer" (iniciador), lo cual impide la unión de éste con el DNA como ocurre con las mutaciones, o con cambios que alteran el tamaño de las secuencias complementarias en el DNA e impiden la amplificación, tales como inserciones, deleciones e inversiones.

Los polimorfismos obtenidos en los productos de amplificación, en el caso de helmintos parásitos, han sido utilizados como marcadores genéticos, con los cuales se pueden diferenciar aislados y especies de géneros de helmintos que morfológicamente son muy parecidos [ej. *Globodera* (Roosien *et al.*, 1993); *Steinernema* (Bandi *et al.*, 1993); *Trichinella* (Bandi *et al.*, 1993); *Metastrongylus* (Kaukas *et al.*, 1994); *Ancylostoma* (Liu & Berry, 1995) y *Necator* (Leignel *et al.*, 1997)]; por otro lado, los RAPD's pueden usarse para la elaboración de mapas genéticos y adicionalmente permiten analizar la variación intraespecífica en individuos pertenecientes a la misma especie; asimismo, son utilizados para la realización de análisis filogenéticos.

b) RFLP's

Los RFLP's involucran la extracción y purificación del DNA de un individuo y su digestión con enzimas de restricción para formar una mezcla de fragmentos que difieren en su longitud, de acuerdo con la distribución específica de los sitios de corte a través de la molécula

de DNA. Los fragmentos producidos por el corte de la enzima son el producto de cada combinación de enzima - DNA.

En parasitología, los RFLPs, han sido utilizados principalmente para separar e identificar ejemplares de monogéneos pertenecientes al género *Gyrodactylus* (Cunningham *et al.*, 1995), así como a nemátodos entomopatógenicos del género *Steinernema* (Reid & Hominick, 1993).

c) SECUENCIAS DE GENES

Los genes ribosomales son utilizados ampliamente como marcadores moleculares, ya que en la mayoría de los eucariontes, los genes ribosomales están organizados en grupos de unidades repetidas en cadena (una tras otra), que constituyen la unidad de transcripción. Cada unidad está separada por espaciadores no transcritos (Valverde & Paredes-López 1996). La unidad de transcripción codifica para los genes 18S, 5.8S, 28S y para los espaciadores externos (ETS) e internos (ITS). Las copias múltiples de este complejo de genes son idénticas dentro de un organismo dado (exceptuando pseudogenes fácilmente diferenciables) debido a procesos de recombinación génica que mantienen la homogeneidad de secuencia en todas las copias de los genes ribosomales (Blair *et al.*, 1996; Carranza *et al.*, 1996).

Las diferentes tasas de evolución entre y dentro de estos genes y espaciadores, proporcionan información útil sobre un amplio rango de niveles de divergencia (Blair *et al.*, 1996). Los espaciadores de transcripción internos, localizados entre los genes 18S y 28S y separados por el gen 5.8S, son las regiones menos conservadas utilizadas en estudios sistemáticos de diferentes taxa de helmintos (Leignel *et al.*, 1997). Principalmente por razones históricas, el gen de la subunidad 18S (el más conservado de los genes ribosomales), ha sido ampliamente utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas entre distintos grupos de platelmintos (Johnston *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1995; Nadler, 1995). Dado que es un gen grande, proporciona una gran cantidad de información validada estadísticamente; por otro lado, es una molécula que evoluciona muy lentamente; las regiones que lo constituyen, presentan tasas evolutivas desiguales. Además, la presencia de muchas copias por genoma y su homogenización a través de evolución concertada, reduce grandemente la variación intraespecífica (Carranza *et al.*, 1996).

II. ANTECEDENTES

De acuerdo con Lamothe *et al.*, (1997), en el Catálogo de la Colección Nacional de Helmintos existen registros aislados de los parásitos de 18 especies de anfibios, de las 295 enlistadas para México (Flores, 1994). En la Tabla 2 se presenta el registro de los trabajos en los que se ha encontrado a alguna de las tres especies del género *Glyphelmins* registradas en México. Los anuros con el mayor número de hallazgos han sido los pertenecientes al género *Rana* con seis registros realizados en cinco especies del mismo, distribuidas en el Distrito Federal, Estado de México y Veracruz; siguiéndole en número, el género *Bufo* con dos registros en los estados de Chiapas y Oaxaca.

Las especies *G. californiensis* y *G. quieta*, están restringidas a los hospederos del género *Rana*, mientras que *G. intermedia* ha sido localizada solo en *B. marinus*. El hábitat más parasitado por las dos primeras, ha sido el intestino delgado; por su parte *G. intermedia* se ha encontrado parasitando al hígado, vesícula biliar y conductos biliares.

Tabla 2. Registros de las especies de *Glyphelmins* (Stafford, 1900) Stafford, 1905 en México.

ESPECIE	HOSPEDERO	HABITAT	DISTRIBUCIÓN	AUTOR
<i>Glyphelmins californiensis</i> (Cort, 1919) Miller, 1930	<i>Rana montezumae</i> <i>Rana pipiens</i>	Intestino delgado	México, D. F.	Caballero & Sokoloff, 1934.
	<i>Rana montezumae</i> <i>Rana pipiens</i>	Intestino delgado	Xochimilco, D. F. Ciénaga de Lerma	Caballero, 1942.
	<i>Rana montezumae</i>	Intestino	San Pedro Tlaltizapán, Estado de México	León, 1992.
	<i>Rana dunni</i>	Intestino	Lago de Pátzcuaro, Michoacán	Pulido, 1994.
	<i>Rana berlandieri</i> <i>Rana vaillanti</i>	Intestino	Los Tuxtlas, Veracruz	Guillén, 1992.
<i>Glyphelmins intermedia</i> (Caballero, Bravo & Zerecero, 1944) Yamaguti, 1958	<i>Bufo marinus</i>	Hígado y vesícula biliar	Río Huixtla, Huixtla, Chiapas	Caballero <i>et al.</i> , 1944.
	<i>Bufo marinus</i>	Conductos biliares	Tuxtepec, Oaxaca	Bravo, 1948.
<i>Glyphelmins quieta</i> (Stafford, 1900) Stafford, 1905	<i>Rana montezumae</i>	Intestino	Xochimilco y Lago de Texcoco	<i>In:</i> Lamothe <i>et al.</i> , 1997.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inquietud de realizar el presente estudio, surgió de la controversia relacionada con la taxonomía de las especies incluidas en el género *Glyphelmins*. Esta controversia está sustentada principalmente por tres características: I) variación morfológica intra e interespecífica; II) descripción de especies con un número mínimo de ejemplares y III) la similitud morfológica existente entre *Glyphelmins* y otros géneros de tremátodos digéneos.

Derivado de lo anterior, en México existen algunos trabajos en los cuales, se a registrado a *Glyphelmins californiensis* (León, 1992 y Pulido, 1994), señalando haber encontrado problemas para identificarla. Debido a ésto, realizamos observaciones de ejemplares depositados en la Colección Nacional de Helminfos (CNHE), con lo cual nos percatamos que los organismos depositados por estos autores, bajo el nombre de *G. californiensis*, no corresponden en su totalidad a esta especie, es decir, existe una mezcla de *G. californiensis* con otra especie de morfología similar. Esto nos motivó a realizar recolectas de anfibios en las localidades en las que trabajaron los autores mencionados, así como en otras localidades del país, con el fin de obtener material suficiente para realizar un estudio morfológico de mayor profundidad y de esta manera, evidenciar las diferencias morfológicas existentes entre las especies recolectadas para determinarlas correctamente. A la par del estudio morfológico, se obtuvo material helmintológico que fue preservado para realizar un análisis molecular de las especies recolectadas, con el fin de utilizar los resultados de este análisis como una herramienta complementaria a la identificación efectuada con bases morfológicas. Este análisis consistió en purificar DNA genómico total de cada una de las especies para que, posteriormente, se amplificaran alrededor de 1500 pares de bases, incluyendo las regiones V4 y V7 del gen ribosomal 18S y de esta forma obtener secuencias de nucleótidos, que permitieran la comparación y diferenciación de las especies a nivel molecular. Por otro lado, la obtención de los datos de las secuencias de los genes ribosomales 18S, nos permitió establecer las relaciones de parentesco entre las especies de *Glyphelmins*, recolectadas en este estudio.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Diferenciar a las especies *Glythelmins quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi* con base en caracteres morfológicos y moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un análisis morfométrico de *G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi* recolectadas en diferentes huéspedes y localidades de México, así como en una de los Estados Unidos y una de Canadá; evidenciando los caracteres morfológicos diferenciales de cada una de ellas.
- Secuenciar parte del gen ribosomal 18S (~1500 pb), incluyendo las regiones variables V4 y V7 de cada una de las especies de *Glythelmins* recolectadas.
- Integrar los marcadores moleculares como herramientas complementarias de la morfología, para lograr la diferenciación de especies de helmintos.

V. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación más amplio que se realiza en el Instituto de Biología de la UNAM. En éste, se pretende inventariar a los helmintos que parasitan a anfibios y reptiles en diversas regiones de México. Asimismo, este trabajo se relaciona con un proyecto de colaboración entre el Instituto de Biología y el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el que se intenta combinar información morfológica y molecular para solucionar problemas taxonómicos, así como establecer relaciones filogenéticas entre taxa particulares de helmintos.

a) RECOLECTA DE HOSPEDEROS

Para la realización del presente estudio, se efectuaron recolectas durante los meses de junio, septiembre y diciembre de 1996 y marzo, abril, mayo, septiembre y octubre de 1997 en diferentes localidades del Estado de Michoacán: Lagos de Pátzcuaro, Zacapu; Manantiales de Cointzio; en la región de "Los Tuxtlas, Veracruz, en las Lagunas Escondida y El Zacatal; en el Estado de México en la Ciénaga de Lerma; en el Estado de Jalisco en el Estero Chamela y en Tuxtepec, Oaxaca en la Presa Presidente Miguel de la Madrid; los anfibios se obtuvieron a partir de la captura que con fines comerciales se efectúa en los Lagos de Pátzcuaro y Zacapu, así como en la Ciénaga de Lerma; en las localidades restantes, los anuros se capturaron manualmente o con la ayuda de redes, depositándolos en sacos de lona, para su posterior transporte al Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología de la UNAM.

b) ESPECIES DE HOSPEDEROS RECOLECTADAS

Las recolectas realizadas en las ocho localidades mencionadas y en los diferentes períodos, arrojaron un total de quince especies pertenecientes al grupo de los anuros, cuya referencia incluyendo el tamaño de muestra de cada uno, se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies de huéspedes recolectados en México

ESPECIE	LOCALIDAD	MUESTRA
<i>Bufo marinus</i>	Presa Presidente Miguel de la Madrid, Tuxtepec, Oaxaca	18
<i>Bufo marinus</i>	Chamela, Jalisco	1
<i>Bufo valliceps</i>	Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz	4
<i>Eleutherodactylus rhodopis</i>	Laguna El Zacatal, "Los Tuxtlas", Veracruz	1
<i>Gastrophryne elegans</i>	Laguna El Zacatal, "Los Tuxtlas", Veracruz	2
<i>Leptodactylus melanonotus</i>	Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz	2
<i>Leptodactylus labialis</i>	Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz	4
<i>Pachymedusa dachnicolor</i>	Chamela, Jalisco	2
<i>Rana brounorum</i>	Laguna El Zacatal, "Los Tuxtlas", Veracruz	14
<i>Rana dunni</i>	Lago de Zacapu, Michoacán	74
	Lago de Pátzcuaro, Michoacán	18
<i>Rana forreri</i>	Chamela, Jalisco	12
<i>Rana megapoda</i>	Manantiales de Cointzio, Michoacán	27
<i>Rana montezumae</i>	Ciénaga de Lerma, Estado de México	84
<i>Rana neovolcanica</i>	Manantiales de Cointzio, Michoacán	41
<i>Rana vaillanti</i>	Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz	31
<i>Smilisca baudini</i>	Laguna El Zacatal, "Los Tuxtlas", Veracruz	5
TOTAL		340

c) OBTENCIÓN DE HELMINTOS

Cada hospedero recolectado fue sacrificado por el método de descerebración, introduciendo una aguja de disección en la cavidad craneana; de cada individuo se registró la longitud hocico-cloaca (LHC) y su sexo, mediante la presencia de sacos bucales en los machos o la ausencia de los mismos en las hembras o por la observación directa de las gónadas. Posteriormente se les practicó un examen helmintológico, que consistió en principio en la revisión cuidadosa de la superficie del cuerpo y de las cavidades bajo el microscopio estereoscópico; el examen interno, se realizó mediante un corte longitudinal sobre la línea media de la región ventral del cuerpo, previo a la extracción de los órganos internos se revisaron la cavidad y los mesenterios; una vez efectuado lo anterior, los órganos se separaron del cuerpo del huésped y se colocaron en cajas de Petri con solución salina al 0.65 %. Los pulmones, estómago e intestino se revisaron desgarrándolos con agujas de disección; el hígado, bazo, riñones y corazón se revisaron comprimiéndolos entre dos vidrios y observándolos bajo el microscopio estereoscópico.

La extracción de los helmintos recolectados se realizó con la ayuda de pinceles finos, colocándolos en cajas de Petri con solución salina al 0.65 % con la finalidad de realizar observaciones en vivo y para su posterior fijación.

d) OBSERVACIONES *IN VIVO*

Para ello, se colocó a los parásitos en una preparación temporal con solución salina al 0.65 % y se observaron bajo el microscopio óptico. Los objetivos principales de dichas observaciones fueron los siguientes: a) asegurar que los gusanos colectados pertenecieran al género en cuestión; b) separar a los digéneos de las diferentes especies de *Glyphelmins*, con el fin de hacer un análisis morfológico y molecular de las mismas y c) obtener imágenes digitalizadas de las especies, para evidenciar la presencia de las espinas tegumentales que se pierden durante el procesamiento de los ejemplares. Las imágenes digitalizadas se obtuvieron con ayuda de software y equipo de computo (Image Pro 3.1).

e) FIJACIÓN

La fijación de los ejemplares se realizó de dos maneras de acuerdo al estudio al que serían sometidos; en el caso de los ejemplares que serían utilizados en el estudio morfológico, se les sacrificó agregándoles agua caliente o líquido de Berland, con el fin de evitar la contracción corporal de los mismos; posteriormente fueron colocados entre porta y cubreobjetos, aplicando por capilaridad líquido de Bouin como fijador y manteniéndolos de esta manera durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los ejemplares se colocaron en frascos homeopáticos con alcohol 70 % debidamente etiquetados, conservándolos en esta sustancia hasta su posterior procesamiento.

Por otra parte, para el análisis molecular, los ejemplares identificados *in vivo* se desmontaron de las preparaciones semipermanentes y se les colocó en una caja de Petri con solución salina limpia y se les quitó el exceso de tejido y mucus, proveniente del huésped, con la ayuda de pinceles finos. Posteriormente se les transfirió a frascos homeopáticos con alcohol etílico absoluto, con el fin de conservar adecuadamente a los organismos para la subsecuente extracción y purificación del DNA genómico.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

a) PROCESAMIENTO

Para su identificación, los digéneos conservados en alcohol al 70 % se tiñeron con diferentes técnicas y colorantes como: paracarmín de Mayer, tricrómica de Gomori y hematoxilina de Delafield; después de su tinción, se aclararon en salicilato de metilo antes de ser montados en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá.

b) ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Esta parte del estudio, consistió en medir a los ejemplares de las distintas especies del género *Glypthelmins* con ayuda de un microscopio óptico calibrado y un ocular micrométrico,

se realizaron extracciones en fenol y en cloroformo, seguidas por precipitaciones alcohólicas. Por último, una muestra de 1 μ l del DNA purificado fue examinado en un gel de agarosa al 1% en buffer de Tris-Boratos (TB).

b) AMPLIFICACIÓN DEL DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Con el fin de amplificar los genes ribosomales 18S de las tres especies de *Glythelmins*, se preparó una mezcla de reacción para PCR, la cual contenía 70.5 ml de dH₂O, 10 μ l dNTP's 0.2 mM, 10 μ l de buffer compuesto por KCl 50 mM y Tris-Cl 10 mM; 0.5 μ l ditioneitol 1 mM, 5 μ l MgCl₂; 1 μ l de templado, 1 μ l de cada oligonucleótido (100 pmol/ λ) y 1 μ l de la DNA polimerasa 2U/ μ l. La mezcla de reacción contenía un volumen final de 100 μ l. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del DNA fueron los siguientes: JLR1 5' CCTGGATCCAGCAGCCGCGGTAA 3' y JLR23 3' CTAAAACGGCCATGCTCCCC 5'. JLR9 5' GAAACTTAAAGGAATTCACGG 3' y JLR25 3' CCGTAGGTGAACCTGCGG 5'. GLY1 3' CATTGATCTGGAGCGAAAG 5' y JLR30 5'GAAACGGCTGTCACATCC 3'.

Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador con el siguiente programa:

1.- 94 °C	3 min
2.- 50 °C	3 min
3.- 72 °C	3 min
4.- 94 °C	1 min
5.- Repetir 5 veces a partir del 2	
6.- 50 °C	1 min
7.- 72 °C	1 min
8.- 94 °C	1 min
9.- Repetir 30 veces a partir del 6	
10.- 50 °C	5 min
11.- 72 °C	10 min
12.- 4 °C	24 hr

Al finalizar la PCR, los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en buffer de Tris-Boratos (TB), aplicando en cada carril 5 μ l de la mezcla de cada reacción.

Para la purificación de los fragmentos amplificados, a los 95 μl restantes de cada reacción, se les adicionó 18 μl de azul de bromofenol y se les aplicó en carriles de un gel de agarosa al 1% en buffer de Tris-Acetatos (TAE). Las bandas correspondientes a cada uno de los fragmentos fueron recortadas del gel, con la finalidad de ser purificadas utilizando el kit Wizard (Promega), cuyo protocolo consistía en colocar por separado a los fragmento amplificado en tubos de microfuga, a los cuales se les adicionó 1 ml de resina del kit y se les incubó a 65 °C durante 10 min. Al terminar el tiempo de incubación, el contenido de cada tubo se depositó por separado en una jeringa de 5 ml, cuya punta debía portar una columna de purificación. Enseguida, se colocó el émbolo a cada jeringa y se dejó que el líquido descendiera por sí sólo; posteriormente se agregaron 2 ml de isopropanol al 80%. Al dejar de fluir este último, se quitó con cuidado las columnas y se centrifugaron 25 s a 12,000 g con el fin de eliminar el isopropanol. Posteriormente, se adicionaron 50 μl de agua bidestilada a cada columna y se dejó transcurrir 5 min. Por último, se centrifugaron las columnas a 12,000 g, por 25 s y se recuperó el contenido en tubos de microfuga esterilizados.

c) SECUENCIACIÓN DEL DNA DE DOBLE CADENA POR PCR

La secuencia de los fragmentos de DNA se obtuvo por medio de la combinación de PCR e inhibición de las cadenas por dideoxinucleótidos ddNTP's propuesto por Sanger *et al.*, 1977 (Fig. 1), utilizando el kit de secuenciación cíclica "Termosecuensasa" (Amersham Lab.). La reacción de marcado consistió en colocar por separado 5 μl de DNA de los productos purificados, en tubos de PCR y adicionándoles a cada uno 2 μl del buffer de reacción, 1 μl de los oligonucleótidos JLR 9, 23, 25, 28, 30 y Gly 1 (uno en cada tubo); 1 μl de 7-deaza-dGTP, 1 μl de dCTP, 0.5 μl [α -³⁵S] dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y 2 μl de Termosecuensasa DNA polimerasa. Enseguida se colocaron los tubos en el termociclador, con un ciclo de 30-60 veces de la siguiente forma: 95°C/15 s y 50°C/30 s. Mientras se realizaba la reacción de marcaje, separadamente en cuatro tubos diferentes, se colocaron 4 μl de los dideoxinucleótidos ddA, ddC, ddG y ddT.

Al concluir la reacción de marcado, muestras de 3.5 μl se colocaron en tubos que contenían a los dideoxinucleótidos (A, C, G y T). Este paso se repitió con cada

oligonucleótido utilizado para secuenciar. Se colocó una vez más a los tubos en el termociclador con un ciclo de 30 veces: 95 °C/30 s; 72 °C/60-120 s. Al concluir el ciclo, la reacción fue bloqueada adicionando 4 µl de solución de terminación a cada tubo y manteniéndoseles a 4 °C hasta realizar la electroforésis de secuencia.

d) ELECTROFORÉISIS EN GEL DE SECUENCIA

Las muestras de reacción fueron previamente calentadas 2 min a 65 °C y cargadas en un gel de poliacrilamida al 6%, compuesto por 30 g de urea ultrapura, 14 ml de H₂O, 9.5 ml de acrilamida al 38%, que contenía bis-acrilamida al 2%; 14 ml de buffer TBE 5X, 550 µl de persulfato de amonio (50 mg/ml) y 20 µl de Temed. Antes de colocar las muestras en el gel, se calentaron a 55 °C, efectuando una precorrida de 45 min a 1,400 voltios y 40 miliamperios.

e) ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas manualmente en un programa de procesamiento de texto Word (Versión 7) y a partir de esto, se construyó una matriz de datos, la cual fue utilizada subsecuentemente para reconstruir una hipótesis filogenética, utilizando el programa PAUP (Versión 3.1.1, Swofford, (1993)). El análisis consistió en una búsqueda de branch-and-bound y un bootstrap con 1,000 repeticiones.

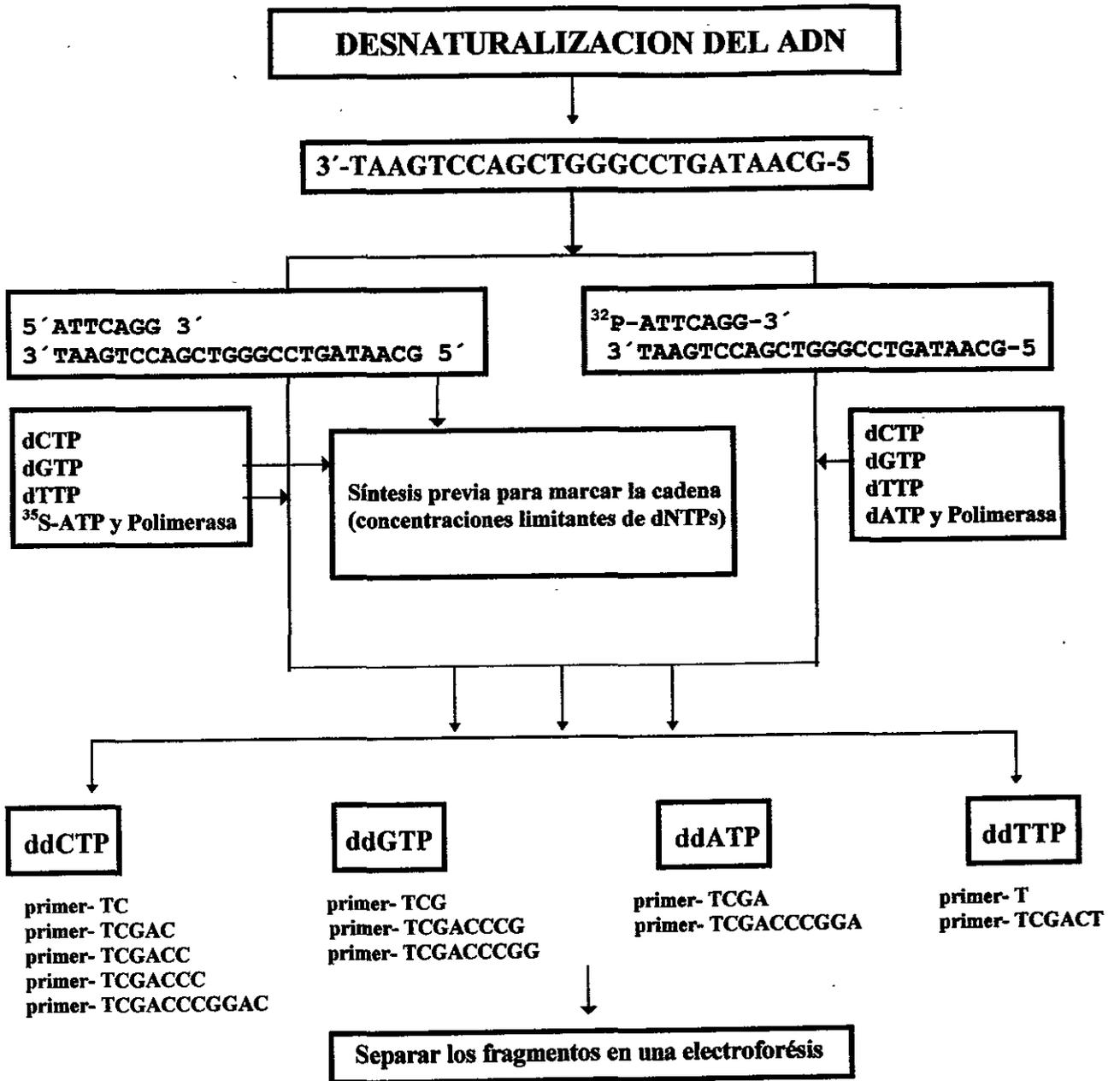


Fig. 1. Método de secuenciación por combinación de PCR e inhibición de las cadenas por dideoxinucleótidos propuesto por Sanger *et al.*, 1977.

VI. RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo están divididos en dos secciones: en la primera, se presenta el análisis morfológico de las especies de *Glythelmins* (*G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi*) recolectadas en diferentes localidades del país, así como en una de los Estados Unidos (*G. quieta*) y en una de Canadá (*G. californiensis*); para ello se presenta una redescrición de cada una de las especies, incluyendo datos morfométricos e ilustraciones de las mismas.

En la segunda parte, se presentan los resultados del estudio molecular, en el cual se secuenciaron casi 1,490 pares de bases de los genes ribosomales 18S de cada especie. Las secuencias fueron analizadas y alineadas manualmente en un procesador de textos con fines comparativos, a partir de lo cual se cuantificó el número de nucleótidos distintos entre ellas, para caracterizar las diferencias intraespecíficas. Posteriormente, estas secuencias fueron alineadas incluyendo como grupo externo al digéneo *Heronimus mollis*, considerado como miembro basal en la filogenia de los digenéos (Brooks & McLennan, 1993). Este procedimiento permitió establecer las relaciones de parentesco entre las tres especies de *Glythelmins* consideradas en el presente estudio.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para la realización del estudio morfológico de las especies de *Glythelmins*, se utilizaron ejemplares recolectados en cinco localidades del país, Ciénaga de Lerma, Estado de México; Lagos de Zacapu, Pátzcuaro y Manantiales de Cointzio, Michoacán; Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz (Fig. 11), así como de una de los Estados Unidos (Watson Creek, Nebraska) y una de Canadá (Columbia Británica); además, se analizó material depositado en la Colección Nacional de Helmintos, el cual sirvió para fines comparativos. Cinco de las 15 especies de anuros revisadas, estuvieron parasitadas con alguna especie de *Glythelmins* (Tabla 7).

Se estudiaron 91 ejemplares de *G. quieta*, provenientes de cinco localidades y cuatro especies de anuros.. En el caso de *G. californiensis*, se analizaron 53 ejemplares recolectados en cuatro localidades y cuatro especies de ranas. Con respecto a *G. facioi* solamente pudieron ser analizados siete gusanos, recolectados de *R. vaillanti* ("Los Tuxtlas", Ver.). En la Fig. 11 se ponen de manifiesto las localidades en donde se logró la obtención de alguna de las tres especies del género.

A continuación se presenta la redescrición de las tres especies de *Glythelmins* recolectadas:

Familia	Macroderoididae	McMullen, 1937
Subfamilia	Glythelminthinae	Yamaguti, 1971 (pro Glythelminae Cheng, 1959)
Género	<i>Glythelmins</i>	Stafford, 1905
	<i>Glythelmins quieta</i> (Stafford, 1900)	Stafford, 1905
		(Figuras 2, 3, 4)

La siguiente redescrición, está basada en el estudio de 91 adultos sexualmente maduros, recolectados del intestino de cuatro especies de ranas: *R. catesbeiana* (Watson Creek, Nebraska, Estados Unidos), *R. dunni* (Lagos de Pátzcuaro y Zacapu, Michoacán), *R. montezumae* (Ciénaga de Lerma, Estado de México) y *R. neovolcanica* (Manantiales de Cointzio, Michoacán). Los datos merísticos de los ejemplares recolectados en las distintas localidades se presentan en la Tabla 4.

Los gusanos *in vivo* son de color blanco, excepto en la región media posterior del cuerpo, la cual presenta una coloración café o amarilla debido a la gran cantidad de huevos que contiene el útero.

Los ejemplares montados en preparaciones, presentan cuerpo alargado, siendo ligeramente más ancho en la región posterior a los testículos; los extremos son redondeados, aunque el posterior es más pronunciado que el anterior, que es aguzado; el tegumento es grueso y se encuentra provisto de pequeñas espinas, excepto en el extremo posterior del cuerpo; las cuales son más abundantes en la región anterior y conforme se van aproximando al extremo posterior, disminuyen en número hasta desaparecer. Las espinas dispuestas en los bordes del cuerpo se presentan afiladas, mientras que las situadas en la superficie corporal

asemejan escamas. Desafortunadamente, en preparaciones semipermanentes se pierden, lo cual hace difícil su observación.

La ventosa oral es subterminal, esférica y ligeramente más ancha que larga; el acetábulo se sitúa en el primer tercio del cuerpo, anterior a los testículos y por debajo de la bifurcación cecal. Es de forma circular y de menor tamaño que la ventosa oral. La relación existente entre las dos ventosas es de 1 : 0.63 de largo por 1 : 0.54 de ancho.

En el centro de la ventosa oral se abre la boca; no se observó la prefaringe que refiere Miller (1930) en la redescrición de la especie; la faringe es grande, redonda y musculosa; a cada lado presenta prominentes glándulas perifaríngeas, agrupadas en forma de racimo; anteriormente se extienden hasta el borde anterior de la faringe y posteriormente sobrepasan el nivel de la bifurcación cecal; los conductos de las mismas se dirigen anteriormente y desembocan en el borde anterior de la ventosa oral. A continuación se encuentra el esófago, generalmente igual de largo que la faringe; no posee paredes musculosas y se bifurca para dar origen a los ciegos intestinales que se localizan laterodorsalmente, extendiéndose casi hasta el borde posterior del cuerpo. El ciego izquierdo es ligeramente más ancho y largo que el derecho.

El aparato reproductor masculino consta de un par de testículos intercecales, localizados en la región preecuatorial del cuerpo y posteriores al acetábulo; son de forma redondeada, casi simétricos y situados uno al lado del otro. El testículo derecho es ligeramente más anterior que el izquierdo. De cada uno de los bordes anteriores de los testículos, se originan los conductos eferentes, que se unen para formar un espermaducto que desemboca en la bolsa del cirro por su extremo posterior; la bolsa del cirro es alargada y voluminosa, generalmente dispuesta a la derecha y por debajo del acetábulo, extendiéndose más allá del borde anterior del mismo; aloja a la vesícula seminal que es bipartita, siendo la parte posterior más voluminosa que la anterior; ésta se comunica con la glándula prostática y ésta a su vez con el cirro, el cual es sinuoso, liso y desemboca en el poro genital, situado por delante del acetábulo y posterior a la bifurcación cecal.

El ovario es esférico u ovoide, intercecal, ventral, preecuatorial y está situado hacia el lado izquierdo del acetábulo, al mismo nivel o ligeramente hacia atrás de éste; en algunas ocasiones, su borde interno penetra en el área del acetábulo o puede estar ligeramente

separado del mismo. El receptáculo seminal se localiza en el área que dejan entre sí el ovario, el testículo izquierdo, el acetábulo y la porción posterior de la bolsa del cirro, siendo de menor tamaño que el ovario; de forma esférica, posterior al acetábulo y de difícil observación.

El útero es sinuoso, formado por numerosas asas transversales que van desde la región anterior de los testículos, hasta el borde posterior del cuerpo. Ocupando el área intracecal, cecal y en ocasiones la extracecal, en todos los ejemplares el útero corre ventralmente a los testículos. En la región en donde está el ootipo, la glándula de Mehlis y el canal de Laurer, el útero presenta una abundante cantidad de huevos, por lo que estas estructuras no pudieron ser observadas. Anteriormente a los testículos, el útero asciende mediante un asa delgada, la cual pasa ventral al receptáculo seminal y al nivel del acetábulo forma el metratermo, el cual es glandular y abre en el poro genital.

Formadas por numerosos folículos de formas diversas, las glándulas vitelógenas presentan gran variabilidad con respecto a su distribución a lo largo del cuerpo, ya que en algunas ocasiones pueden extenderse hasta el nivel anterior de la faringe, localizarse en la región media del esófago o bien, en la parte en la cual se origina la bifurcación cecal. Posteriormente se distribuyen hasta casi la mitad de la longitud de los ciegos, es decir, sobrepasan por mucho el borde posterior de los testículos. Los folículos ocupan una posición dorsal, ventro-lateral y extracecal e intercecal, correspondiendo al área extracecal el mayor número de ellos. En la región anterodorsal del acetábulo, las glándulas vitelógenas confluyen medialmente, sin sobrelaparse.

Los huevos operculados presentan cáscara amarilla y son más largos que anchos. La vesícula excretora tiene forma de "I" y abre en un poro excretor, localizado en el extremo posterior del cuerpo.

Hospederos: *Rana catesbeiana*, *R. dunni*, *R. megapoda*, *R. montezumae* y *R. neovolcanica*

Habitat: Intestino anterior

Ejemplares: Depositados en la CNHE con Nos. de catálogo 3271, 3272, 3273, 3274, 3275, 3276, 3277, 3278 y 3279

Tabla 4. Datos merísticos de los ejemplares de *G. quieta* recolectados en las diferentes localidades.

LOCALIDAD	COINITZIO		LERMA		PÁTZCUARO		ZACAPU		WILLOW CREEK, SERRASKA		TOTAL
	<i>R. neovolcanica</i>		<i>R. montezumae</i>		<i>R. dunnii</i>		<i>R. dunnii</i>		<i>R. catesbeiana</i>		
HOSPEDERO											
NÚMERO DE EJEMPLARES MEDIDOS	11		35		30		6		9		91
CUERPO											
<i>LONGITUD</i>	1.775 - 2.925 (2.465)	1.299 - 3.375 (2.446)	1.587 - 2.45 (2.151)	1.875 - 2.262 (2.068)	2.675 - 3.862 (3.452)						1.299 - 3.862 (2.426)
<i>ANCHO A NIVEL DEL ACETABULO</i>	0.637 - 0.987 (0.796)	0.400 - 1.037 (0.735)	0.525 - 0.787 (0.650)	0.525 - 0.75 (0.652)	0.725 - 1.112 (0.919)						0.400 - 1.112 (0.726)
<i>ANCHO MÁXIMO</i>	0.687 - 1.125 (0.902)	0.437 - 1.125 (0.795)	0.550 - 0.912 (0.735)	0.575 - 0.812 (0.712)	0.737 - 1.2 (0.972)						0.437 - 1.200 (0.800)
VENTOSA ORAL											
<i>LONGITUD</i>	0.171 - 0.234 (0.202)	0.156 - 0.300 (0.237)	0.180 - 0.261 (0.215)	0.186 - 0.228 (0.206)	0.216 - 0.315 (0.259)						0.156 - 0.315 (0.226)
<i>ANCHO</i>	0.180 - 0.258 (0.213)	0.198 - 0.375 (0.294)	0.198 - 0.279 (0.237)	0.231 - 0.267 (0.244)	0.252 - 0.333 (0.29)						0.180 - 0.375 (0.262)
BOCA											
<i>LONGITUD</i>	0.045 - 0.096 (0.081)	0.060 - 0.153 (0.091)	0.069 - 0.111 (0.092)	0.072 - 0.108 (0.084)	0.084 - 0.153 (0.114)						0.045 - 0.153 (0.092)
<i>ANCHO</i>	0.063 - 0.108 (0.083)	0.075 - 0.162 (0.120)	0.075 - 0.126 (0.101)	0.099 - 0.114 (0.107)	0.093 - 0.177 (0.129)						0.063 - 0.177 (0.109)
FARINGE											
<i>LONGITUD</i>	0.081 - 0.129 (0.107)	0.090 - 0.216 (0.149)	0.093 - 0.141 (0.117)	0.099 - 0.135 (0.115)	0.132 - 0.186 (0.145)						0.081 - 0.216 (0.131)
<i>ANCHO</i>	0.111 - 0.171 (0.142)	0.117 - 0.225 (0.173)	0.120 - 0.189 (0.155)	0.141 - 0.174 (0.154)	0.159 - 0.228 (0.196)						0.110 - 0.228 (0.165)
RELACION VENTOSA ORAL - FARINGE											
<i>LARGO</i>	1 : 0.52	1 : 0.62	1 : 0.54	1 : 0.55	1 : 0.65						1 : 0.57
<i>ANCHO</i>	1 : 0.66	1 : 0.58	1 : 0.65	1 : 0.63	1 : 0.55						1 : 0.62
ESÓFAGO											
<i>LARGO</i>	0.081 - 0.15 (0.110)	0.018 - 0.174 (0.090)	0.069 - 0.18 (0.124)	0.060 - 0.123 (0.099)	0.135 - 0.294 (0.224)						0.018 - 0.294 (0.119)
<i>ANCHO</i>	0.06 - 0.12 (0.093)	0.033 - 0.186 (0.076)	0.084 - 0.135 (0.109)	0.114 - 0.123 (0.117)	0.114 - 0.225 (0.157)						0.033 - 0.225 (0.100)
<i>DISTANCIA DE LA BIFURCACIÓN CECAL AL EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO</i>	0.357 - 0.537 (0.442)	0.324 - 0.657 (0.508)	0.414 - 0.567 (0.492)	0.411 - 0.462 (0.438)	0.567 - 0.855 (0.703)						0.324 - 0.855 (0.513)
CIEGO IZQUIERDO											
<i>LONGITUD</i>	1.137 - 2.137 (1.761)	0.812 - 2.187 (1.505)	1.0 - 1.762 (1.358)	1.165 - 1.625 (1.335)	1.875 - 2.812 (2.509)						0.812 - 2.812 (1.575)
<i>ANCHO MÁXIMO</i>	0.087 - 0.15 (0.116)	0.048 - 0.126 (0.089)	0.060 - 0.120 (0.092)	0.066 - 0.12 (0.084)	0.084 - 0.195 (0.133)						0.048 - 0.195 (0.097)
<i>DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO</i>	0.225 - 0.487 (0.386)	0.177 - 0.612 (0.394)	0.215 - 0.450 (0.357)	0.325 - 0.475 (0.391)	0.275 - 0.637 (0.437)						0.177 - 0.637 (0.384)
CIEGO DERECHO											
<i>LONGITUD</i>	1.137 - 2.162 (1.712)	0.825 - 2.15 (1.507)	0.987 - 1.737 (1.357)	1.1 - 1.475 (1.262)	1.937 - 2.775 (2.325)						0.825 - 2.775 (1.552)
<i>ANCHO MÁXIMO</i>	0.075 - 0.15 (0.108)	0.045 - 0.186 (0.090)	0.066 - 0.141 (0.093)	0.069 - 0.12 (0.088)	0.081 - 0.138 (0.113)						0.045 - 0.186 (0.095)
<i>DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO</i>	0.312 - 0.525 (0.397)	0.180 - 0.687 (0.407)	0.125 - 0.462 (0.352)	0.325 - 0.487 (0.416)	0.250 - 0.662 (0.470)						0.120 - 0.687 (0.394)
ACETABULO											
<i>LARGO</i>	0.108 - 0.159 (0.131)	0.093 - 0.225 (0.160)	0.096 - 0.147 (0.123)	0.114 - 0.156 (0.135)	0.129 - 0.195 (0.164)						0.093 - 0.225 (0.143)
<i>ANCHO</i>	0.105 - 0.165 (0.134)	0.111 - 0.213 (0.162)	0.111 - 0.141 (0.125)	0.096 - 0.168 (0.136)	0.126 - 0.192 (0.162)						0.096 - 0.213 (0.144)

Tabla 4. (Continuación)

LOCALIDAD	COINTZIO	LERMA	PÁTZCUARO	ZACAPU	WILLOW CREEK, NEBRASKA	TOTAL
RELACION VENTOSA ORAL - ACETÁBULO						
LARGO	1:0.64	1:0.67	1:0.57	1:0.65	1:0.63	1:0.63
ANCHO	1:0.62	1:0.55	1:0.52	1:0.55	1:0.55	1:0.54
DISTANCIA PORO GENITAL - ACETÁBULO	0.039 - 0.075 (0.057)	0.024 - 0.084 (0.054)	0.024 - 0.069 (0.045)	0.042 - 0.066 (0.055)	0.057 - 0.108 (0.051)	0.024 - 0.108 (0.053)
TESTÍCULO IZQUIERDO						
LARGO	0.153 - 0.3 (0.238)	0.126 - 0.362 (0.223)	0.102 - 0.243 (0.169)	0.135 - 0.225 (0.165)	0.282 - 0.475 (0.358)	0.102 - 0.475 (0.216)
ANCHO	0.141 - 0.267 (0.226)	0.138 - 0.35 (0.227)	0.093 - 0.240 (0.173)	0.108 - 0.201 (0.153)	0.216 - 0.362 (0.295)	0.093 - 0.362 (0.210)
TESTÍCULO DERECHO						
LARGO	0.153 - 0.291 (0.236)	0.132 - 0.375 (0.217)	0.105 - 0.25 (0.171)	0.135 - 0.212 (0.158)	0.246 - 0.425 (0.308)	0.105 - 0.425 (0.209)
ANCHO	0.138 - 0.249 (0.205)	0.111 - 0.375 (0.195)	0.081 - 0.225 (0.156)	0.087 - 0.187 (0.131)	0.192 - 0.312 (0.251)	0.081 - 0.375 (0.185)
BOLSA DEL CIRRO						
LARGO	0.156 - 0.315 (0.232)	0.210 - 0.412 (0.321)	0.183 - 0.258 (0.222)	0.177 - 0.3 (0.222)	0.264 - 0.423 (0.340)	0.156 - 0.423 (0.271)
ANCHO	0.063 - 0.102 (0.082)	0.090 - 0.150 (0.124)	0.060 - 0.090 (0.078)	0.06 - 0.105 (0.082)	0.090 - 0.150 (0.117)	0.060 - 0.150 (0.099)
RELACION BOLSA DEL CIRRO - ACETÁBULO						
LARGO	1:0.564	1:0.498	1:0.554	1:0.608	1:0.482	1:0.527
ANCHO	1:1.634	1:1.306	1:1.602	1:1.658	1:1.438	1:1.454
VESÍCULA SEMINAL (Extremo Anterior)						
LARGO	0.033 - 0.051 (0.040)	0.030 - 0.072 (0.051)	0.018 - 0.051 (0.033)	0.033 - 0.06 (0.043)	0.045 - 0.075 (0.063)	0.018 - 0.075 (0.045)
ANCHO	0.03 - 0.045 (0.034)	0.045 - 0.084 (0.056)	0.027 - 0.057 (0.038)	0.036 - 0.06 (0.044)	0.036 - 0.081 (0.056)	0.027 - 0.084 (0.047)
VESÍCULA SEMINAL (Extremo Posterior)						
LARGO	0.111 - 0.174 (0.144)	0.096 - 0.246 (0.178)	0.090 - 0.165 (0.130)	0.09 - 0.174 (0.116)	0.105 - 0.261 (0.211)	0.09 - 0.261 (0.159)
ANCHO	0.039 - 0.072 (0.048)	0.060 - 0.123 (0.090)	0.036 - 0.075 (0.053)	0.048 - 0.18 (0.083)	0.036 - 0.117 (0.089)	0.036 - 0.18 (0.074)
DISTANCIA PORO GENITAL EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO	0.45 - 0.712 (0.596)	0.399 - 0.862 (0.604)	0.500 - 0.757 (0.629)		1.087 - 1.112 (0.44)	0.399 - 1.112 (0.628)
OVARIO						
LARGO	0.120 - 0.183 (0.160)	0.108 - 0.262 (0.179)	0.120 - 0.192 (0.163)	0.105 - 0.18 (0.143)	0.174 - 0.300 (0.218)	0.105 - 0.300 (0.173)
ANCHO	0.132 - 0.183 (0.163)	0.099 - 0.252 (0.178)	0.102 - 0.201 (0.166)	0.123 - 0.18 (0.157)	0.177 - 0.240 (0.209)	0.099 - 0.252 (0.174)
RECEPTÁCULO SEMINAL						
LARGO	0.062 - 0.111 (0.080)	0.057 - 0.111 (0.086)	0.051 - 0.087 (0.070)	0.051 - 0.072 (0.059)	0.096 - 0.159 (0.126)	0.051 - 0.159 (0.084)
ANCHO	0.075 - 0.096 (0.087)	0.060 - 0.132 (0.091)	0.066 - 0.102 (0.080)	0.054 - 0.081 (0.068)	0.108 - 0.189 (0.133)	0.054 - 0.189 (0.092)
EXTENSION DE GLÁNDULAS VITELÓGENAS						
DERECHA	0.750 - 1.4 (1.187)	0.512 - 1.41 (0.989)	0.612 - 1.225 (0.924)	0.712 - 0.95 (0.864)	0.875 - 1.65 (1.382)	0.512 - 1.65 (1.017)
IZQUIERDA	0.775 - 1.462 (1.162)	0.462 - 1.462 (0.931)	0.585 - 1.175 (0.882)	0.687 - 1.1 (0.802)	0.937 - 1.7 (1.357)	0.462 - 1.700 (0.971)
HUEVOS						
LARGO	0.039 - 0.042 (0.040)	0.036 - 0.044 (0.040)	0.039 - 0.051 (0.040)	0.036 - 0.042 (0.040)	0.036 - 0.042 (0.039)	0.036 - 0.051 (0.040)
ANCHO	0.015 - 0.018 (0.016)	0.014 - 0.018 (0.016)	0.015 - 0.039 (0.017)	0.015 - 0.018 (0.017)	0.015 - 0.021 (0.018)	0.014 - 0.039 (0.017)

*Las medidas están dadas en mm; se expresa el intervalo y el promedio entre paréntesis.

COINTZIO: Manantiales de Cointzio, Michoacán. LERMA: Ciénaga de Lerma, Estado de México. PÁTZCUARO: Lago de Pátzcuaro, Michoacán.
ZACAPU: Lago de Zacapu, Michoacán. WILLOW CREEK: Nebraska, Estados Unidos.

‡MATERIAL PROVENIENTE DE LA COLECCIÓN PARTICULAR DEL DOCTOR DANIEL BROOKS

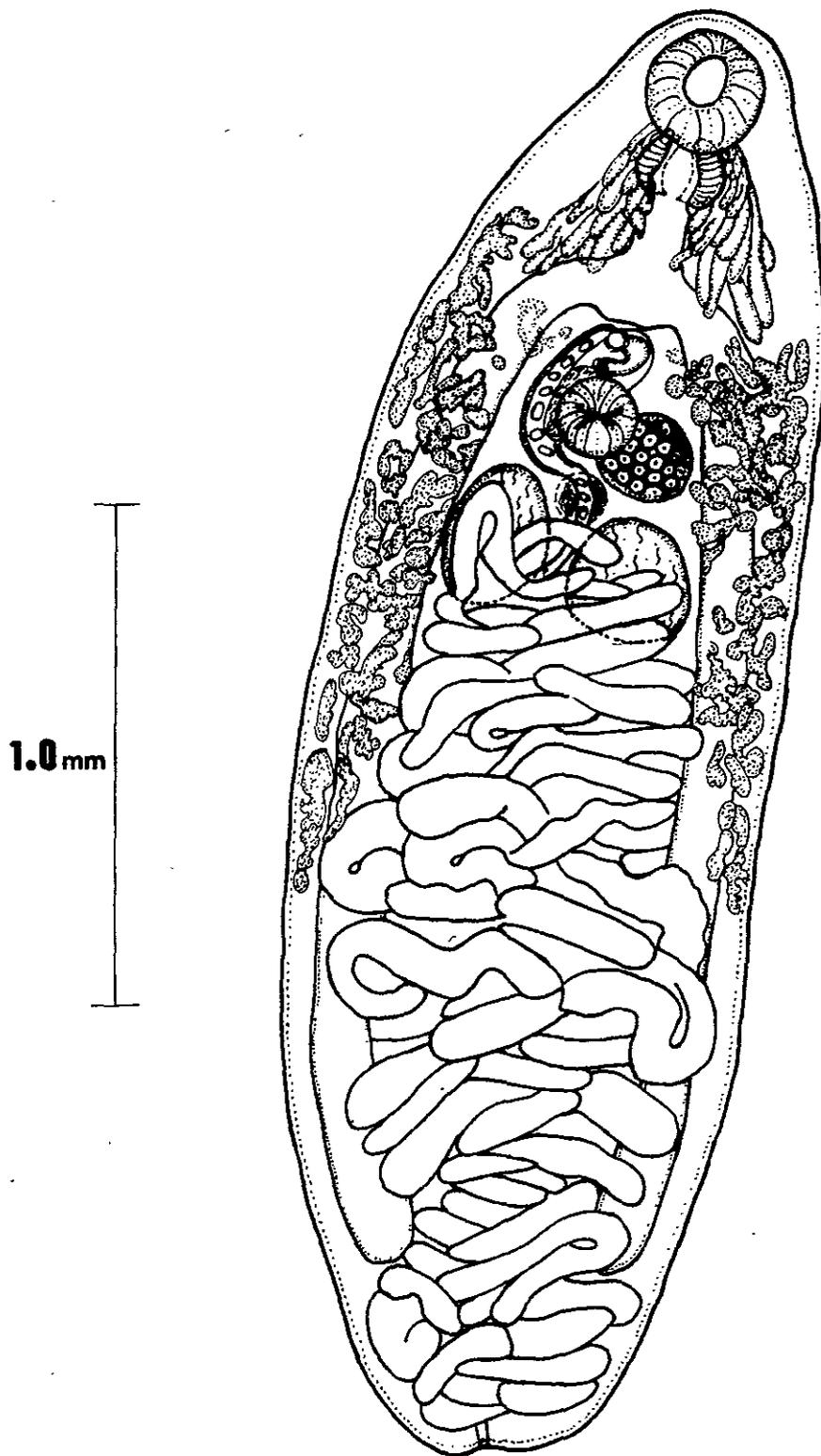


Fig. 2. Preparación total de *G. quieta*. Vista ventral. Parásito de *Rana neovolcanica* (Manantiales de Cointzio, Mich.).

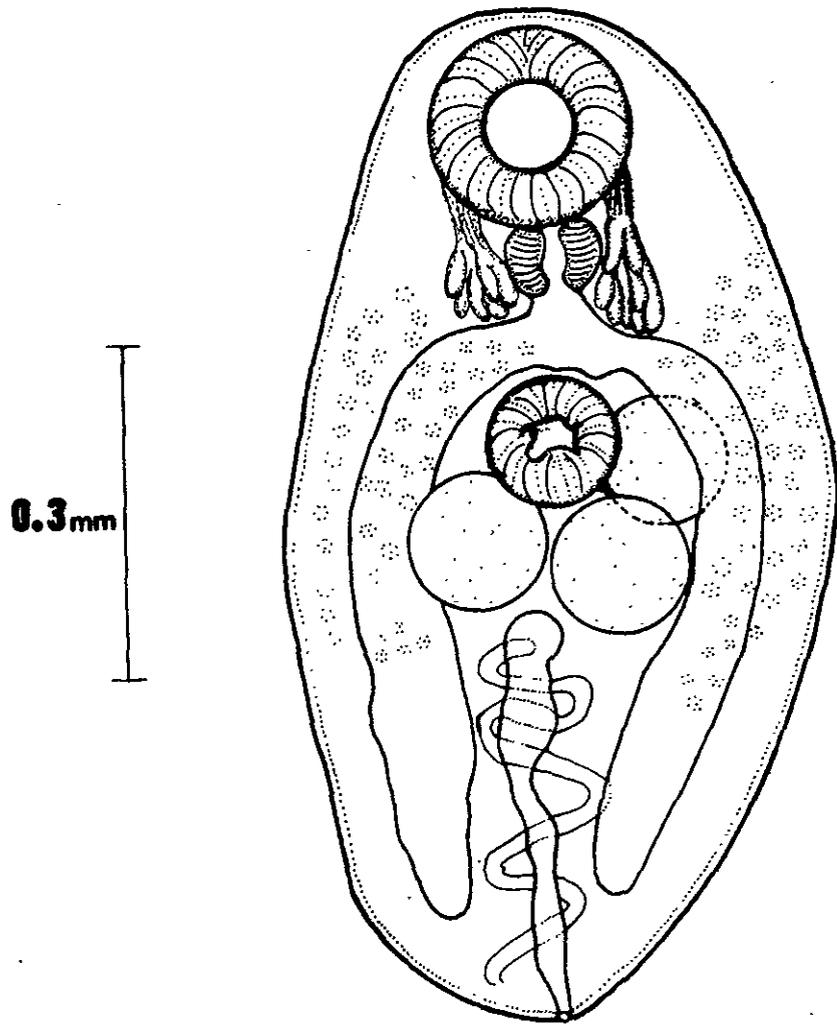


Fig. 3. Preparación total de *G. quieta* en estado inmaduro. Vista ventral. Parásito de *Rana montezumae* (Ciénaga de Lerma, Edo. Mex.).

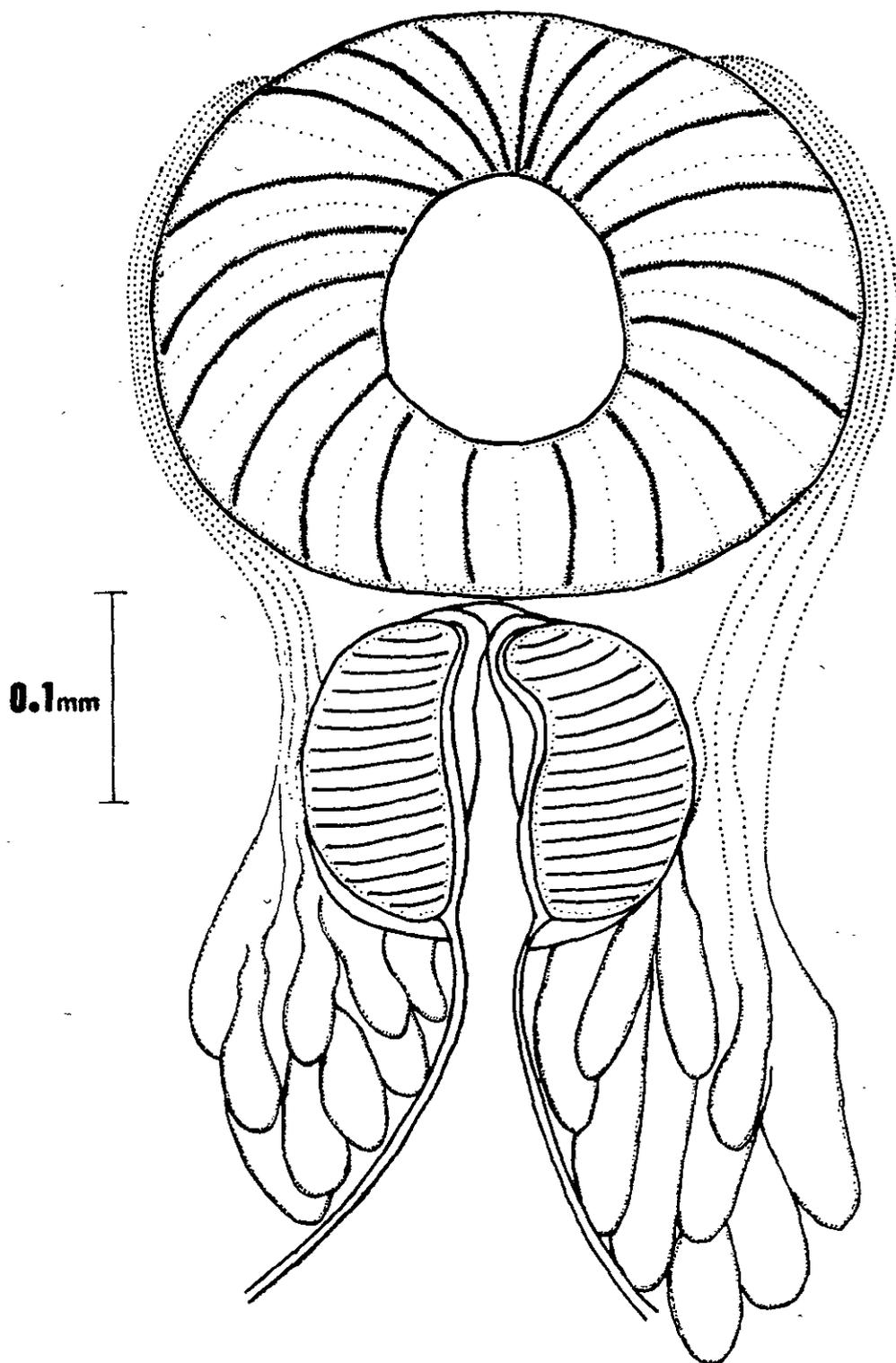


Fig. 4. Detalle de la farínge y de las glándulas perifaríngeas de un ejemplar de *G. quieta*, recolectado de *Rana neovolcanica* (Manantiales de Cointzio, Mich.).

Familia	Macroderoididae	McMullen, 1937
Subfamilia	Glyphelminthinae	Yamaguti, 1971 (pro Glyphelminae Cheng, 1919)
Género	<i>Glyphelmins</i>	Stafford, 1905
	<i>Glyphelmins californiensis</i>	(Cort, 1919) Miller, 1930

(Figuras 5, 6, 7)

La presente redescrición está basada en el estudio de 53 ejemplares adultos, colectados en las ranas de las especies *R. aurora* (Columbia Británica), *R. dunni* (Lagos de Pátzcuaro y Zacapu) y *R. montezumae* (Ciénaga de Lerma). Las medidas de los ejemplares de cada área de estudio se presentan en la Tabla 5.

Los individuos de la especie presentan un cuerpo alargado u oval, con el extremo anterior y posterior redondeados. Los ejemplares *in vivo* están cubiertos por numerosas espinas, abundantes en la región anterior, con excepción de la ventosa oral; posterior al acetábulo, éstas van disminuyendo en número hasta desaparecer en el último tercio del cuerpo. En organismos montados, las espinas en los bordes del cuerpo no se observan, debido a que éstas se desprenden durante el procesamiento de los mismos. Al igual que otras especies del género, las espinas de la superficie del cuerpo son similares a escamas.

La ventosa oral es subterminal y de apariencia subsférica, ya que en todos los digéneos estudiados, ésta es más ancha que larga; el acetábulo es esférico y de menor tamaño que la ventosa oral; está ubicado en la región preecuatorial, por delante de los testículos y posterior al poro genital. La relación existente entre la ventosa oral y el acetábulo es de 1 : 0.58 de largo por 1 : 0.55 de ancho; considerando a la primera como 1.

El aparato digestivo se inicia con la boca, que se abre en el centro de la ventosa oral y se continúa con una pequeña prefaringe, observada solamente en un ejemplar, que desemboca en la faringe, con forma globosa y muscular, rodeada ventral, dorsal y lateralmente por pequeñas glándulas perifaringeas amorfas; dichas estructuras se tiñen claramente, haciéndolas fácilmente distinguibles de otras estructuras, como lo son las glándulas vitelógenas. Dorsalmente, sobrepasan ligeramente el borde posterior de la faringe y a diferencia de las glándulas perifaringeas de otras especies del género como *G. quieta* y *G. pennsylvaniensis*, jamás ocupan el área comprendida entre el esófago y la bifurcación cecal. Además, los

conductos de las glándulas están dirigidos hacia la prefaringe. La relación que hay entre la ventosa oral y la faringe es de 1 : 0.50 de largo por 1 : 0.53 de ancho. El esófago, corto, se bifurca para dar origen a los ciegos intestinales, los cuales se extienden paralelamente al cuerpo hasta terminar cerca del extremo posterior. El ciego izquierdo es ligeramente más largo que el derecho, pero menos ancho que este último.

Los testículos están localizados en la región ecuatorial del cuerpo, son completamente intercecales y de forma esférica; se ubican en la región posterior al acetábulo y están situados uno al lado del otro. El testículo derecho, desplazado ligeramente hacia adelante, es un poco más anterior que el izquierdo. Del borde anterior de cada testículo se originan los conductos eferentes, que atraviesan el área del acetábulo y se incorporan a la bolsa del cirro en su extremo posterior. Dispuesta ventralmente y hacia el lado derecho del acetábulo, la bolsa del cirro es alargada y voluminosa, siendo más larga que ancha; aloja a la vesícula seminal bipartita, a la glándula prostática y a un cirro liso; por último, desemboca en el poro genital, situado a corta distancia del acetábulo, sobre la línea media ventral.

El ovario, situado al lado izquierdo del acetábulo, es de forma redonda; en algunos ejemplares está sobrelapado ligeramente por el mismo. En algunas ocasiones, el borde posterior del ovario se translapa con el borde anterior del testículo izquierdo. El receptáculo seminal esférico, se localiza dorsalmente al ovario, al testículo izquierdo y a las asas uterinas ascendentes, por lo que no se puede observar con facilidad.

El útero sinuoso y completamente intercecal, está formado por numerosas asas dispuestas transversalmente, que se extienden desde el borde anterior de los testículos hasta casi el final del cuerpo. Al nivel de los testículos, las asas pasan por debajo de estas estructuras, por lo que en algunas ocasiones los llegan a cubrir por completo al igual que al ootipo, a la glándula de Mehlis y al canal de Laurer, por lo que en ninguno de los ejemplares pudieron ser observadas estas tres estructuras; al llegar a la región en donde se ubica el acetábulo, el asa ascendente forma el metratermo glandular, que recorre el área del acetábulo y de la bolsa del cirro y finalmente desemboca en el poro genital, situado en el espacio comprendido entre la bifurcación cecal y el acetábulo.

Las glándulas vitelógenas están constituidas por numerosos folículos que se encuentran distribuidos anteriormente desde la faringe y en algunas ocasiones, desde el borde posterior de

la ventosa oral. Posteriormente se extienden hasta el borde posterior del ovario; en muy pocas ocasiones llegan hasta el borde anterior de los testículos y solamente en un ejemplar se observaron hasta el borde posterior del testículo izquierdo. Los folículos están distribuidos dorsal, ventral y lateralmente a los ciegos intestinales. En la región dorsal, a nivel de la bifurcación cecal, los folículos confluyen entre sí, formando un continuo entre los dos extremos del cuerpo.

Los huevos son de cáscara amarilla, presentan un opérculo en el extremo anterior; son más largos que anchos.

El aparato excretor está constituido por una vesícula excretora con forma de "Y", que se extiende anteriormente hasta el borde posterior de los testículos; el poro excretor está situado en el extremo posterior del cuerpo.

Hospederos: *R. aurora*, *R. dumni*, *R. montezumae*

Habitat: Intestino anterior y medio

Ejemplares: Depositados en la CNHE con Nos. de catálogo 3280, 3281 , 3282, 3283 y 3284

Tabla 5. Medidas de los ejemplares de *G. californiensis* recolectados en las diferentes localidades.

LOCALIDAD	LERMA	PAÍZCUARO	ZACAPU	COLUMBIA		TOTAL
				BRITANICA	R. aurora	
HOSPEDERO	<i>R. montezumae</i>	<i>R. dumii</i>	<i>R. dumii</i>			
NÚMERO DE EJEMPLARES MEDIDOS	19	4	28		2	53
CUERPO						
LONGITUD	1.625 - 2.975 (1.991)	1.725 - 2.100 (1.871)	1.675 - 2.662 (2.049)	3.212 - 3.612 (3.412)		1.625 - 3.612 (2.068)
ANCHO A NIVEL DEL ACETÁBULO	0.625 - 0.95 (0.793)	0.725 - 0.900 (0.840)	0.525 - 0.850 (0.687)	0.887 - 1.0 (0.943)		0.525 - 1.0 (0.746)
ANCHO MÁXIMO	0.637 - 0.975 (0.815)	0.812 - 0.925 (0.875)	0.562 - 0.875 (0.717)	0.900 - 1.062 (0.981)		0.562 - 1.062 (0.774)
VENTOSA ORAL						
LONGITUD	0.138 - 0.325 (0.243)	0.234 - 0.300 (0.264)	0.174 - 0.272 (0.220)	0.288 - 0.297 (0.292)		0.138 - 0.325 (0.234)
ANCHO	0.238 - 0.400 (0.288)	0.258 - 0.309 (0.282)	0.210 - 0.327 (0.264)	0.300 - 0.325 (0.312)		0.210 - 0.400 (0.276)
BOCA						
LONGITUD	0.099 - 0.141 (0.122)	0.087 - 0.147 (0.118)	0.072 - 0.147 (0.096)	0.126 - 0.135 (0.130)		0.072 - 0.147 (0.107)
ANCHO	0.114 - 0.174 (0.138)	0.099 - 0.135 (0.111)	0.078 - 0.141 (0.105)	0.138 - 0.165 (0.151)		0.078 - 0.174 (0.117)
FARÍNGE						
LONGITUD	0.096 - 0.171 (0.127)	0.114 - 0.153 (0.134)	0.084 - 0.162 (0.110)	0.129 - 0.141 (0.135)		0.084 - 0.171 (0.118)
ANCHO	0.129 - 0.195 (0.152)	0.153 - 0.204 (0.176)	0.096 - 0.204 (0.143)	0.144 - 0.168 (0.156)		0.096 - 0.204 (0.149)
RELACIÓN VENTOSA ORAL - FARÍNGE						
LARGO	1 : 0.522	1 : 0.507	1 : 0.5	1 : 0.462		1 : 0.504
ANCHO	1 : 0.527	1 : 0.624	1 : 0.541	1 : 0.5		1 : 0.539
ESÓFAGO						
LARGO	0.045 - 0.117 (0.079)	0.078	0.030 - 0.105 (0.064)	0.216		0.030 - 0.216 (0.077)
ANCHO	0.069 - 0.138 (0.099)	0.093	0.045 - 0.120 (0.073)	0.171		0.045 - 0.171 (0.085)
DISTANCIA DE LA BIFURCACIÓN CECAL AL EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO	0.375 - 0.552 (0.472)	0.486	0.312 - 0.537 (0.426)	0.654		0.312 - 0.654 (0.446)
CIEGO IZQUIERDO						
LONGITUD	0.95 - 1.712 (1.227)	1.200 - 1.412 (1.265)	1.025 - 1.700 (1.301)	2.075 - 2.325 (2.200)		0.950 - 2.325 (1.307)
ANCHO MÁXIMO	0.063 - 0.135 (0.098)	0.084 - 0.138 (0.102)	0.060 - 0.120 (0.079)	0.087 - 0.105 (0.096)		0.060 - 0.138 (0.088)
DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO	0.275 - 0.562 (0.345)	0.200 - 0.287 (0.246)	0.212 - 0.475 (0.348)	0.675 - 0.812 (0.743)		0.200 - 0.812 (0.354)
CIEGO DERECHO						
LONGITUD	0.950 - 1.700 (1.213)	1.137 - 1.350 (1.228)	1.012 - 1.687 (1.262)	1.650 - 2.412 (2.031)		0.950 - 2.412 (1.272)
ANCHO MÁXIMO	0.069 - 0.144 (0.100)	0.066 - 0.165 (0.106)	0.060 - 0.111 (0.081)	0.090 - 0.120 (0.105)		0.060 - 0.165 (0.090)
DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO	0.300 - 0.562 (0.349)	0.175 - 0.275 (0.228)	0.225 - 0.462 (0.339)	0.650 - 0.837 (0.743)		0.175 - 0.837 (0.350)
ACETÁBULO						
LARGO	0.102 - 0.187 (0.132)	0.123 - 0.153 (0.136)	0.105 - 0.165 (0.134)	0.186 - 0.189 (0.187)		0.102 - 0.189 (0.136)
ANCHO	0.144 - 0.200 (0.164)	0.153 - 0.186 (0.170)	0.096 - 0.174 (0.140)	0.162 - 0.189 (0.175)		0.096 - 0.200 (0.152)

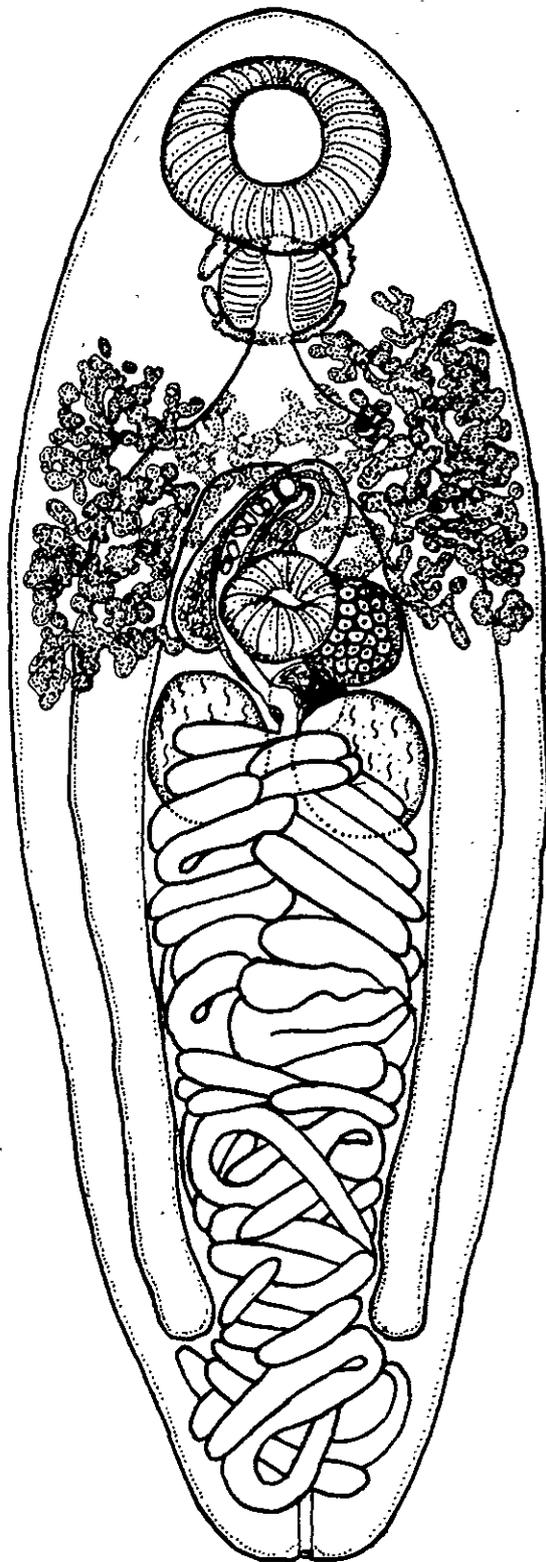
Tabla 5. (Continuación)

LOCALIDAD	LERMA	PÁTZCUARO	ZACAPU	COLUMBIA BRITÁNICA, E. U.	TOTAL
RELACIÓN VENTOSA ORAL - ACETÁBULO					
LARGO	1 : 0.543	1 : 0.515	1 : 0.609	1 : 0.640	1 : 0.581
ANCHO	1 : 0.569	1 : 0.602	1 : 0.530	1 : 0.560	1 : 0.550
DISTANCIA PORO GENITAL - ACETÁBULO					
	0.027 - 0.111 (0.054)	0.033 - 0.084 (0.061)	0.033 - 0.084 (0.061)	0.057	0.027 - 0.111 (0.059)
TESTÍCULO IZQUIERDO					
LARGO	0.108 - 0.261 (0.196)	0.183 - 0.255 (0.207)	0.150 - 0.287 (0.220)	0.285 - 0.387 (0.336)	0.108 - 0.387 (0.214)
ANCHO	0.150 - 0.250 (0.197)	0.225 - 0.309 (0.268)	0.156 - 0.275 (0.202)	0.189 - 0.312 (0.250)	0.150 - 0.312 (0.207)
TESTÍCULO DERECHO					
LARGO	0.174 - 0.262 (0.209)	0.168 - 0.262 (0.220)	0.137 - 0.300 (0.219)	0.240 - 0.375 (0.307)	0.137 - 0.375 (0.219)
ANCHO	0.153 - 0.225 (0.191)	0.187 - 0.27 (0.232)	0.129 - 0.237 (0.183)	0.183 - 0.287 (0.235)	0.129 - 0.287 (0.192)
BOLSA DEL CIRRO					
LARGO	0.189 - 0.348 (0.276)	0.201 - 0.279 (0.238)	0.102 - 0.285 (0.227)	0.255 - 0.285 (0.270)	0.102 - 0.348 (0.247)
ANCHO	0.090 - 0.171 (0.119)	0.096 - 0.135 (0.12)	0.063 - 0.213 (0.111)	0.117 - 0.132 (0.124)	0.063 - 0.213 (0.115)
RELACIÓN BOLSA DEL CIRRO - ACETÁBULO					
LARGO	1 : 0.478	1 : 0.571	1 : 0.590	1 : 0.692	1 : 0.550
ANCHO	1 : 1.378	1 : 1.416	1 : 1.261	1 : 1.411	1 : 1.321
VESÍCULA SEMINAL (Extremo Anterior)					
LARGO	0.030 - 0.051 (0.043)	0.042	0.027 - 0.054 (0.041)	-	0.027 - 0.054 (0.042)
ANCHO	0.036 - 0.054 (0.046)	0.051	0.03 - 0.054 (0.044)	-	0.030 - 0.054 (0.045)
VESÍCULA SEMINAL (Extremo Posterior)					
LARGO	0.090 - 0.216 (0.148)	0.111	0.090 - 0.162 (0.131)	-	0.09 - 0.216 (0.139)
ANCHO	0.045 - 0.102 (0.072)	0.072	0.051 - 0.099 (0.070)	-	0.045 - 0.102 (0.071)
DISTANCIA PORO GENITAL EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO					
	0.425 - 0.780 (0.527)	0.600 - 0.725 (0.650)	0.489 - 0.887 (0.605)	1.025	0.425 - 1.025 (0.591)
OVARIO					
LARGO	0.111 - 0.186 (0.143)	0.129 - 0.153 (0.141)	0.114 - 0.189 (0.143)	0.237 - 0.270 (0.253)	0.111 - 0.270 (0.147)
ANCHO	0.099 - 0.171 (0.141)	0.144 - 0.180 (0.166)	0.090 - 0.180 (0.137)	0.204 - 0.240 (0.222)	0.090 - 0.240 (0.144)
RECEPTÁCULO SEMINAL					
LARGO	-	0.081 - 0.186 (0.117)	0.033 - 0.120 (0.091)	0.090 - 0.123 (0.106)	0.033 - 0.123 (0.093)
ANCHO	-	0.093 - 0.165 (0.124)	0.075 - 0.123 (0.100)	0.111 - 0.129 (0.12)	0.075 - 0.129 (0.103)
EXTENSIÓN DE GLÁNDULAS VITELÓGENAS					
DERECHA	0.337 - 0.950 (0.532)	0.587 - 0.650 (0.617)	0.487 - 0.937 (0.612)	1.0 - 1.050 (1.025)	0.487 - 1.050 (0.641)
IZQUIERDA	0.354 - 0.800 (0.503)	0.525 - 0.675 (0.582)	0.429 - 0.812 (0.579)	0.800 - 0.875 (0.837)	0.429 - 0.875 (0.598)
HUEVOS					
LARGO	0.038 - 0.046 (0.043)	0.045 - 0.048 (0.045)	0.037 - 0.043 (0.039)	0.045	0.037 - 0.045 (0.039)
ANCHO	0.015 - 0.018 (0.016)	0.015 - 0.018 (0.016)	0.014 - 0.019 (0.015)	0.018 - 0.021 (0.019)	0.014 - 0.021 (0.016)

*Las medidas están dadas en mm; se expresan los intervalos y entre paréntesis el promedio.

LERMA: Ciénega de Lerma, Estado de México. PÁTZCUARO: Lago de Pátzcuaro, Michoacán. ZACAPU: Lago de Zacapu, Michoacán. COLUMBIA BRITÁNICA: Canadá

‡MATERIAL PROVENIENTE DE LA COLECCIÓN PARTICULAR DEL DOCTOR DANIEL BROOKS



0.5mm

Fig. 5. Preparación total de *G. californiensis*. Vista ventral. Parásito de *Rana montezumae* (Ciénaga de Lerma, Edo. Mex.).

0.3mm

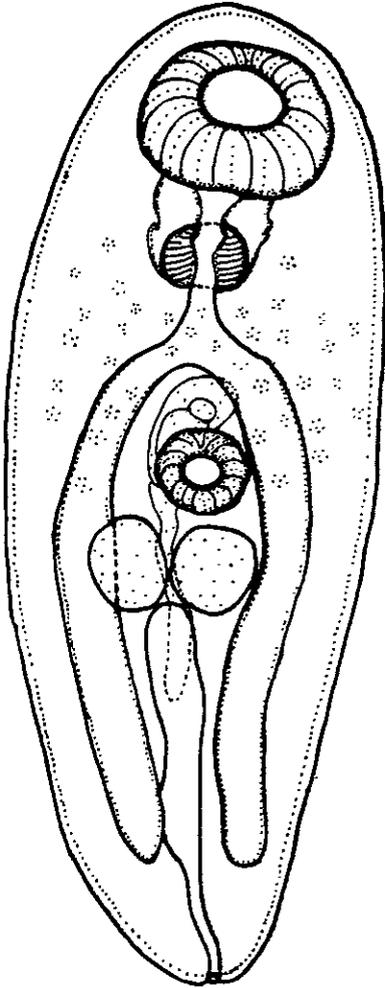


Fig. 6. Preparación total de *G. californiensis* en estado inmaduro. Vista ventral. Parásito de *Rana montezumae* (Ciénaga de Lerma, Edo. Mex.).

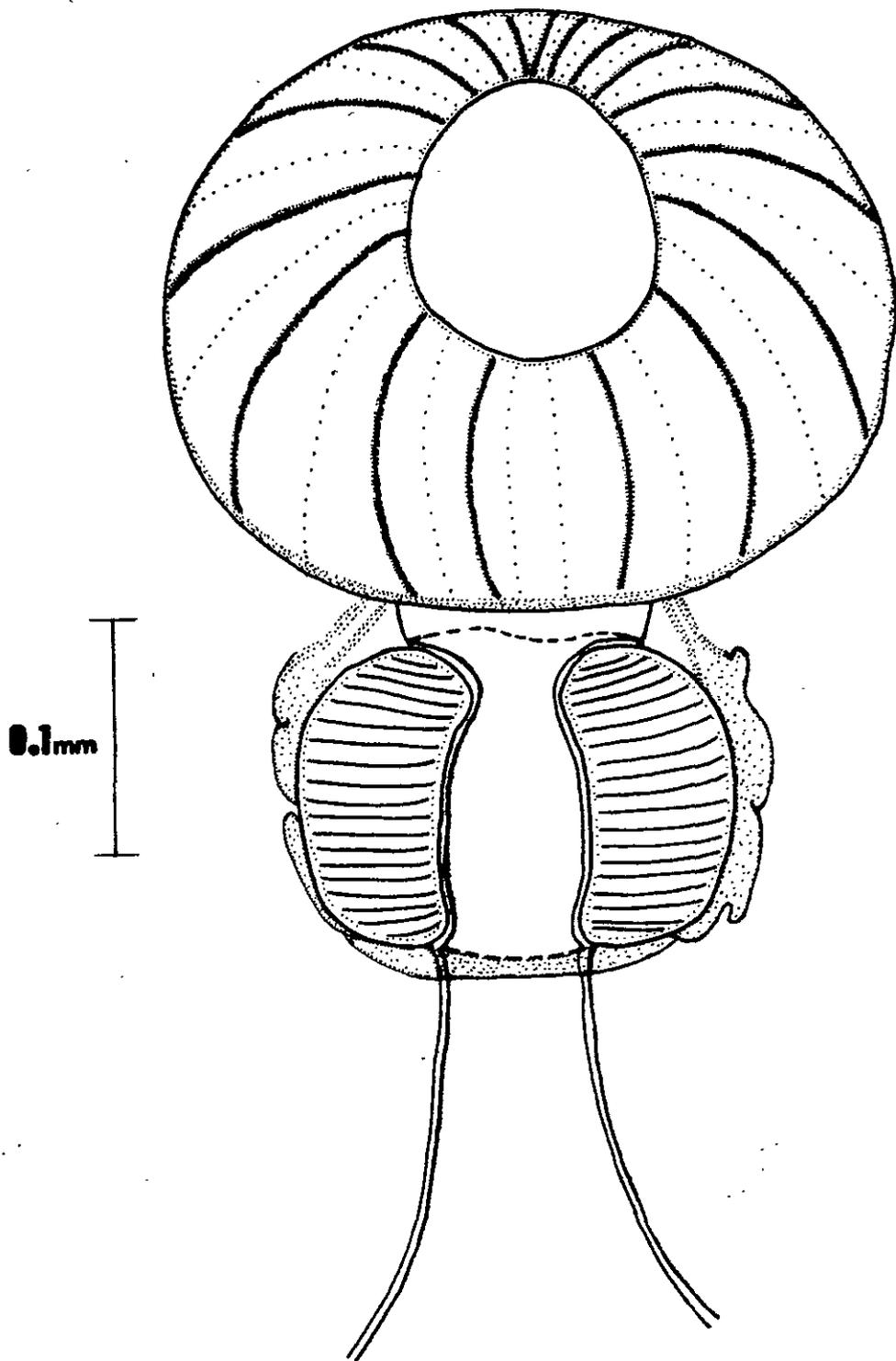


Fig. 7. Detalle de la farínge y de las glándulas perifaríngeas de un ejemplar de *G. californiensis*, obtenido de *Rana montezumae* (Ciénaga de Lerma, Edo. Mex.).

Familia	Macroderoididae	McMullen, 1937
Subfamilia	Gyphelminthinae	Yamaguti, 1971 (pro Glyphelminae Cheng, 1959)
Género	<i>Glyphelmins</i>	Stafford, 1905
	<i>Glyphelmins facioi</i>	Brenes, Arroyo, Jiménez & Delgado, 1959
		(Figuras 8, 9, 10)

El análisis morfológico presentado a continuación, está basado en cinco ejemplares sexualmente maduros y dos inmaduros, provenientes de *R. vaillanti*. Las medidas de las estructuras morfológicas se presentan en la Tabla 6.

Digéneos de cuerpo alargado, con los extremos redondeados; presentándose el ancho máximo generalmente en la región posterior a los testículos. El tegumento está cubierto por pequeñas espinas, más evidentes en la región anterior, desde donde disminuyen en número hasta desaparecer en el último tercio del cuerpo. Las espinas sobre la superficie del cuerpo se presentan como escamas, pero en los bordes son puntiagudas y al igual que en las dos especies anteriores éstas se pierden durante el procesamiento de los ejemplares.

La ventosa oral es subterminal y subsférica, siendo más ancha que larga; el acetábulo de menor tamaño que la ventosa oral, se localiza en la región preecuatorial del cuerpo, anterior a los testículos y por debajo del poro genital. La relación existente entre las medidas de la ventosa oral y el acetábulo es 1 : 0.62 de largo por 1 : 0.53 de ancho.

La boca es casi redonda, se abre en el centro de la ventosa oral y se continúa con una pequeña prefaringe, observada solamente en un ejemplar en estado inmaduro. La faringe es muscular y globosa, más ancha que larga y no presenta glándulas perifaringeas. Existe una relación de 1 : 0.55 de largo por 1 : 0.55 de ancho, entre la ventosa oral y la faringe. Posterior a ésta estructura, se localiza el esófago en cuyo extremo posterior se origina la bifurcación cecal. A continuación de ésta última, se localizan los ciegos intestinales, que se extienden lateralmente y finalizan próximos al extremo posterior del cuerpo. El ciego derecho es ligeramente más largo y ancho que el izquierdo.

Los testículos están localizados ligeramente hacia adelante de la línea media longitudinal del organismo, posteriores al acetábulo; son redondos, de bordes regulares y dispuestos diagonalmente; el testículo derecho es más anterior y de menor tamaño que el

testículo izquierdo. Al igual que en las otras dos especies estudiadas en este trabajo, del borde anterior de cada testículo se originan los conductos eferente, que se unen e incorporan a la bolsa del cirro por su extremo posterior. La bolsa del cirro es alargada, se extiende de derecha a izquierda desde el nivel en donde se localiza el ovario hasta la región preacetabular y se sitúa a la derecha del acetábulo. En su interior, se localiza la vesícula seminal bipartita, cuyo extremo anterior es esférico y de menor tamaño que el extremo posterior de la misma; la glándula prostática es de difícil observación y se continúa con el cirro el cual, es liso y evertible.

El ovario, esférico y pretesticular, se localiza al lado izquierdo del borde posterior del acetábulo; generalmente se dispone a cierta distancia del mismo o en algunas ocasiones, una parte puede sobrelaparse con esta estructura. El receptáculo seminal es esférico y de menor tamaño que los demás órganos reproductores; se localiza entre el ovario y el testículo izquierdo, y ocasionalmente puede estar junto al borde anterior del testículo derecho.

El útero ocupa por completo el área intercecal del cuerpo; se extiende desde la región testicular hasta el extremo posterior; está constituido por numerosas asas, ausentes en la región pretesticular, que en algunas ocasiones llegan a invadir a los ciegos y que en la región donde se localiza el testículo izquierdo, pasan ventralmente al mismo, dificultando su observación. En la región pretesticular, las asas se continúan con el metratermo, que desemboca en el poro genital, el cual se sitúa a la mitad de la distancia que existe entre el acetábulo y la bifurcación cecal. El metratermo y la bolsa del cirro abren separadamente en un pequeño atrio genital. Debido a la gran cantidad de huevos presentes en la región en donde se localiza el ootipo, la glándula de Mehlis y el canal de Laurer, no pudieron ser observados.

Las glándulas vitelógenas se extienden desde el nivel de la bifurcación cecal hasta la región posterior al testículo izquierdo; están constituidas por numerosos folículos distribuidos lateralmente, sobrelapándose en los ciegos dorsal y ventralmente sin confluir en el centro. Las glándulas vitelógenas localizadas al lado derecho del cuerpo, ocupan un área mayor que las dispuestas al lado izquierdo del mismo.

Los huevos son operculados, más largos que anchos y presentan color amarillo - pardo.

La observación del aparato excretor solo es posible en ejemplares inmaduros, los cuales presentan una vesícula excretora en forma de "T", que se extiende casi hasta alcanzar el borde

posterior del testículo izquierdo. A este nivel, se conectan dos conductos colectores que se dirigen oblicuamente hacia el extremo anterior del cuerpo, llegando a la región postovárica en donde se bifurcan, formando otros dos conductos, dirigidos anterior y posteriormente.

Hospedero: *Rana vaillanti*

Hábitat: Intestino anterior

Ejemplares: Depositados en la CNHE con No. de catálogo 3285

Tabla 6. Medidas de los ejemplares de *G. facioi* Brenes, Arroyo, Jiménez & Delgado, 1959 recolectados de *R. vaillanti*

LOCALIDAD	LAGUNA ESCONDIDA	RELACIÓN VENTOSA ORAL - ACETÁBULO
HOSPEDERO	Rana vaillanti	LARGO
NÚMERO DE EJEMPLARES MEDIDOS	7	ANCHO
CUERPO		DISTANCIA PORO GENITAL - ACETÁBULO
LARGO	1.312 - 2.487 (1.845)	TESTÍCULO IZQUIERDO
ANCHO A NIVEL DEL ACETÁBULO	0.437 - 0.650 (0.518)	LARGO
ANCHO MÁXIMO	0.437 - 0.675 (0.518)	ANCHO
VENTOSA ORAL		TESTÍCULO DERECHO
LARGO	0.132 - 0.204 (0.170)	LARGO
ANCHO	0.153 - 0.228 (0.202)	ANCHO
BOCA		BOLSA DEL CIRRO
LARGO	0.060 - 0.090 (0.078)	LARGO
ANCHO	0.060 - 0.108 (0.092)	ANCHO
FARÍNGE		RELACIÓN BOLSA DEL CIRRO - ACETÁBULO
LARGO	0.069 - 0.120 (0.095)	LARGO
ANCHO	0.084 - 0.132 (0.113)	ANCHO
RELACIÓN VENTOSA ORAL - FARÍNGE		VESÍCULA SEMINAL (Extremo Anterior)
LARGO	1 : 0.55	LARGO
ANCHO	1 : 0.55	ANCHO
ESÓFAGO		VESÍCULA SEMINAL (Extremo Posterior)
LARGO	0.075 - 0.213 (0.138)	LARGO
ANCHO	0.060 - 0.129 (0.104)	ANCHO
DISTANCIA BIFURCACIÓN CECAL - EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO	0.297 - 0.519 (0.436)	DISTANCIA PORO GENITAL - EXTREMO ANTERIOR DEL CUERPO
CIEGO IZQUIERDO		OVARIO
LARGO	0.837 - 1.812 (1.252)	LARGO
ANCHO	0.060 - 0.111 (0.079)	ANCHO
DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO	0.100 - 0.325 (0.222)	RECEPTÁCULO SEMINAL
CIEGO DERECHO		LARGO
LARGO	0.837 - 1.812 (1.265)	ANCHO
ANCHO	0.060 - 0.120 (0.084)	EXTENSIÓN DE GLANDULAS VITELÓGENAS
DISTANCIA AL EXTREMO POSTERIOR DEL CUERPO	0.112 - 0.237 (0.192)	DERECHA
ACETÁBULO		IZQUIERDA
LARGO	0.081 - 0.123 (0.106)	HUEVOS
ANCHO	0.078 - 0.129 (0.108)	LARGO
		ANCHO

Las medidas están dadas en mm; se expresan los intervalos y el promedio entre paréntesis.
LAGUNA ESCONDIDA: Región de "Los Tuxtías", Veracruz.

0.5mm

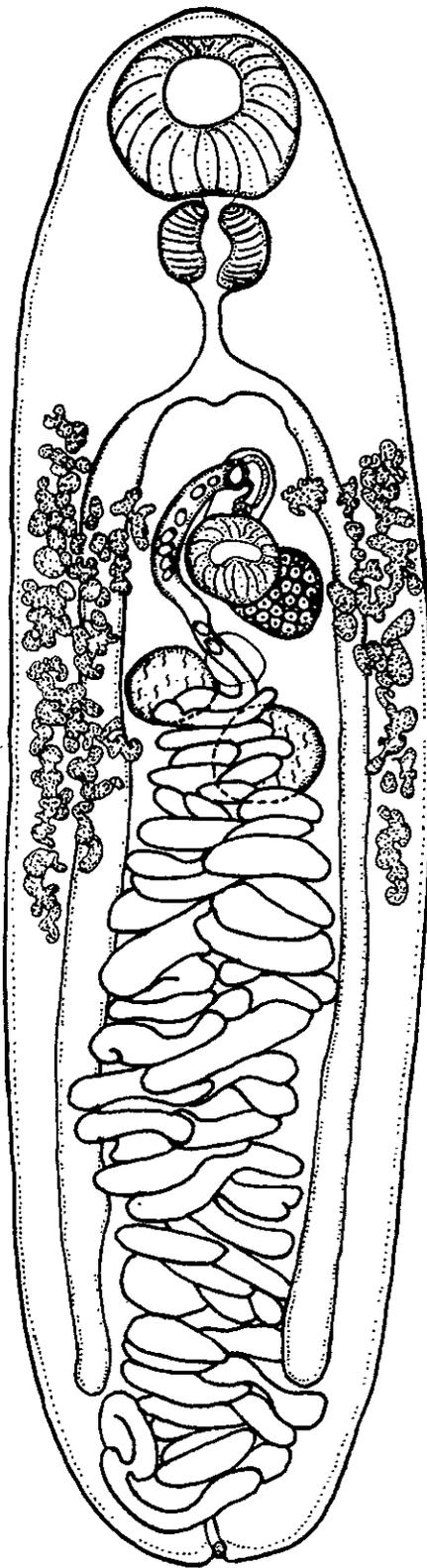


Fig. 8. Preparación total de *G. facioi*. Vista ventral. Parásito de *Rana vaillanti* (Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Ver.).

0.3mm

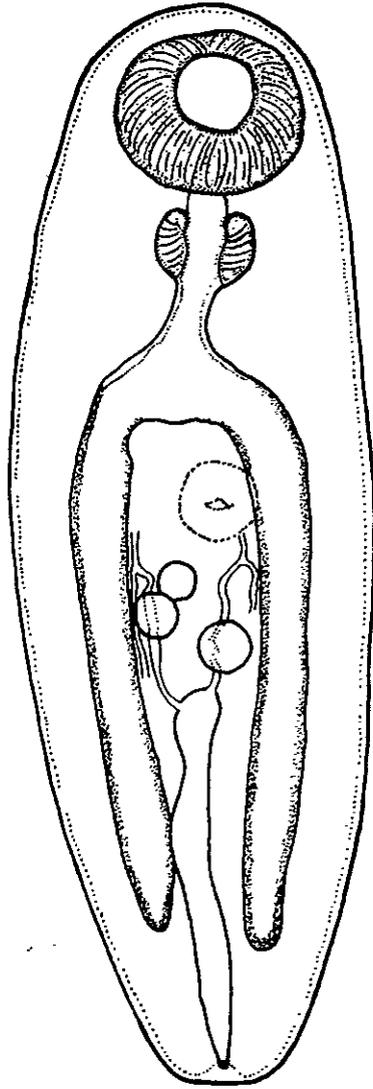


Fig. 9. Preparación total de *G. facioi* en estado inmaduro. Vista dorsal. Parásito de *Rana vaillanti* (Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Ver.).

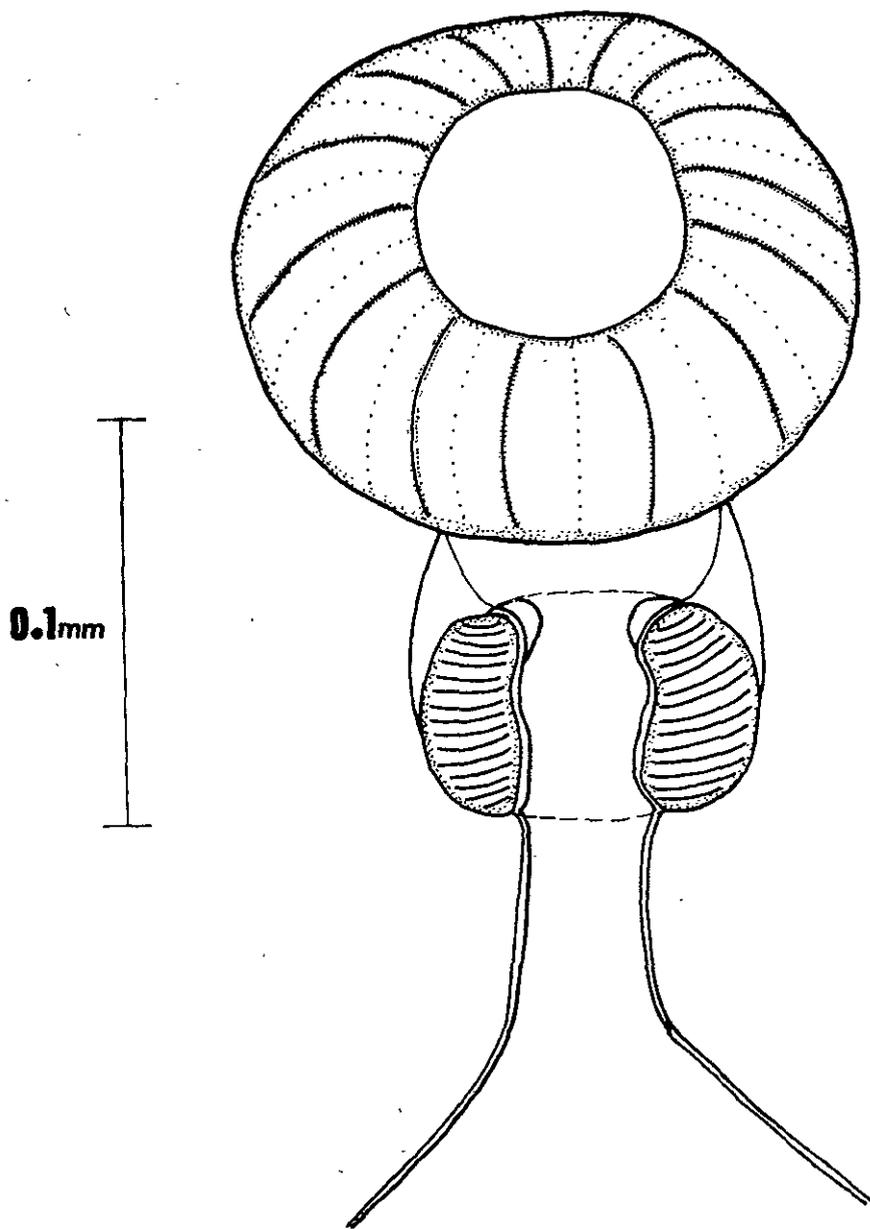


Fig. 10. Detalle de la farínge de un ejemplar de *G. facioi*, recolectado de *Rana vaillanti* (Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Ver.).

Tabla 7. Especies de anuros parasitados por alguna de las tres especies de *Glyphelmins*, obtenidas en el presente estudio.

LOCALIDAD	HOSPEDERO	ESPECIE
Ciénaga de Lerma, Estado de México	<i>Rana montezumae</i>	<i>Glyphelmins californiensis</i>
		<i>Glyphelmins quieta</i>
Lago de Pátzcuaro, Michoacán	<i>Rana dunni</i>	<i>Glyphelmins californiensis</i>
		<i>Glyphelmins quieta</i>
Lago de Zacapu, Michoacán	<i>Rana dunni</i>	<i>Glyphelmins californiensis</i>
		<i>Glyphelmins quieta</i>
Laguna Escondida, "Los Tuxtlas", Veracruz	<i>Rana vaillanti</i>	<i>Glyphelmins facioi</i>
Manantiales de Cointzio, Michoacán	<i>Rana neovolcanica</i>	<i>Glyphelmins quieta</i>
	<i>Rana megapoda</i>	<i>Glyphelmins quieta</i>

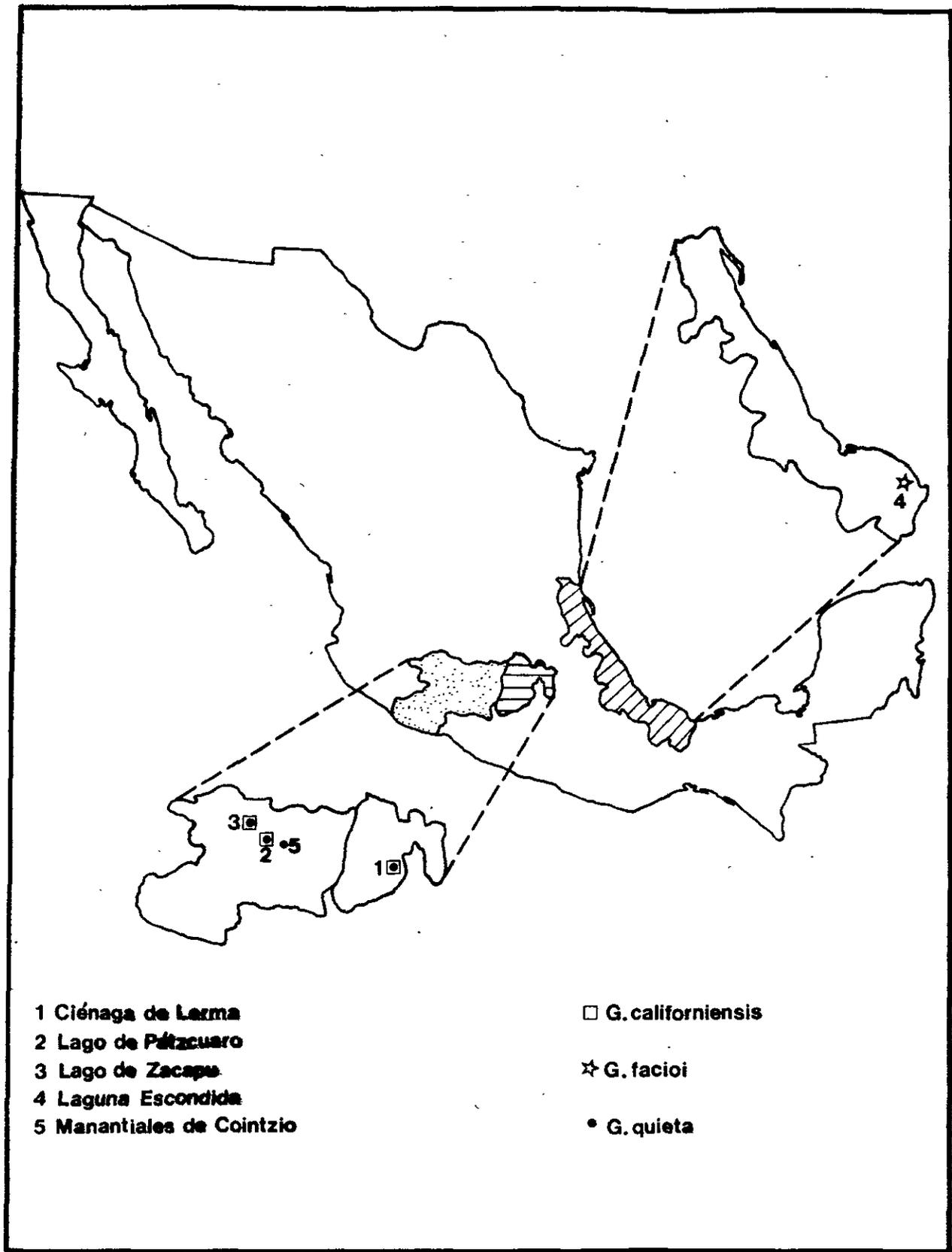


Fig. 11. Distribución en la República Mexicana de las tres especies de *Glythelmins* estudiadas en este trabajo.

ANÁLISIS MOLECULAR

A partir de DNA genómico de alto peso molecular ($> 23\text{kpb}$), extraído de gusanos maduros de *G. quieta* (*R. montezumae*), *G. californiensis* (procedente de *R. dunni*) y *G. facioi* (*R. vaillanti*), se obtuvieron las secuencias parciales de los genes ribosomales 18S de cada una de ellas. Dichas secuencias equivalen a casi el 75% del gen completo. La amplificación de los fragmentos de genes ribosomales 18S, se realizó por PCR usando como iniciadores un par de oligonucleótidos que se unen a secuencias específicas muy conservadas en los genes ribosomales de los eucariontes. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados directamente por la técnica de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Fig. 12).

Las secuencias parciales de los genes ribosomales 18S de las tres especies, constituidas por 1488 nucleótidos en el caso de *G. quieta* y *G. californiensis* y de 1486 en *G. facioi* se presentan alineadas en la Fig. 13. Las secuencias incluyen las regiones variables V4 y V7; la primera se localiza entre los nucleótidos 618 y 810, lo cual nos indica que en nuestras especies, ésta región está constituida por 193 pares de bases, siendo la que presenta el mayor número de diferencias entre los nucleótidos de las tres especies (21 sustituciones en total). La región V7 esta compuesta por un total de 147 pares de bases localizadas entre la posición 1,399 y la 1,545 del gen, esta región sólo presenta seis cambios en los nucleótidos de las tres especies.

El análisis comparativo de las secuencias se muestra en la Tabla 8, donde se puede observar que el mayor número de diferencias entre las secuencias, se presenta entre las especies *G. quieta* y *G. californiensis*, con 39 diferencias, 33 de las cuales corresponden a nucleótidos sustituidos y las seis restantes a inserciones. Entre las especies *G. quieta* y *G. facioi* existen 25 diferencias, 23 de las cuales son pares de bases distintos y dos inserciones. Por su parte *G. californiensis* y *G. facioi* exhiben un total de 32 cambios, 29 pertenecen a diferencias en los nucleótidos y tres a inserciones. La similitud total entre las secuencias de las especies expresadas en porcentaje arrojaron los siguientes resultados 2.62 %, 1.68% y 2.15% respectivamente. Para obtener el porcentaje anterior, se considero como 100 % al número total de nucleótidos de la secuencia consenso (1488 nucleótidos) y a las diferencias existentes entre las especies, como una variable para obtener la similitud total de cada una de ellas.

La obtención de las secuencias parciales de los genes ribosomales 18S permitió realizar un cladograma que se muestra en la Fig. 14. Este representa las relaciones entre grupos hermanos de las especies estudiadas en este trabajo. Se observa que las especies *G. quieta* y *G. californiensis* son especies hermanas y a su vez *G. facioi* es la especie hermana de las dos anteriores. La especie *Heronimus mollis* representa al grupo externo.

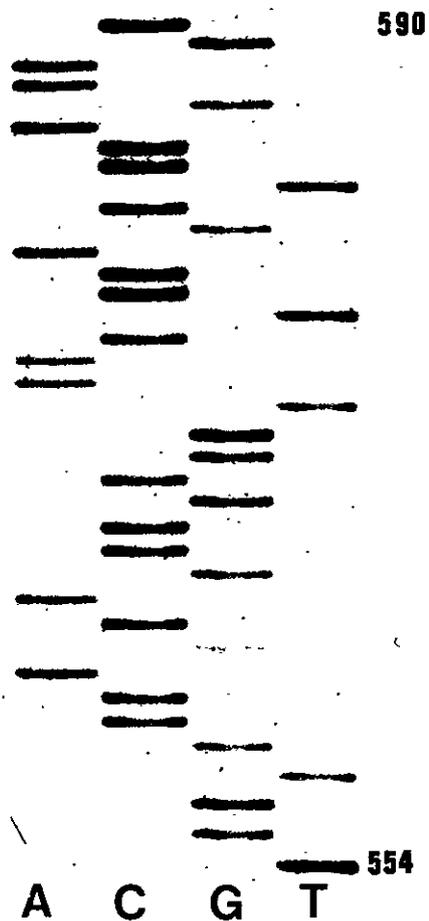


Fig. 12. Parte de la secuencia de *G. quieta* obtenida a partir del método combinado de PCR e inhibición de las cadenas por dideoxinucleótidos propuesto por Sanger, *et al.*, 1977.

G. qui. ACCCAATCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATACGGATACGGGACTCGAATGAGGC 493
G. cal.
G. fac.ta....

G. qui. TCCGTAATTCGAATGAGAACAATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGGAGGGCAAGTC 553
G. cal.ta.....
G. fac.

G. qui. TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTA 613
G. cal.
G. fac.

G. qui. AAAAGCTCGTAGTTGGATCTGGGTCGTATGGCTATGTACCGTCGCTCGTGAGCCTGGCTT 673
G. cal.G.....T..T.....
G. fac.G.....

G. qui. GGTTACGACTGGGTCGAGTTCATGGGTCGGTGTCTGGCTGTGCAGCCTTTCTGCCGTGT 733
G. cal.G.....AG...GC.....A.....
G. fac.A.....

G. qui. CTGTCTCAGGACAGGTGTCCGCCTTATCGGTGGGCTTGTCTCGTCCGTTGGTCCGCATGT 793
G. cal.CT.....T.....C.....T.....
G. fac.CT.....G.....

G. qui. ACTTTGATGCCTTTGAACGGGTGTCCGGTCCGGACGGTGCGTTTACTTTGAACAAATTTG 853
G. cal.C.....A.....
G. fac.

G. qui. AGTGCTCAAAGCAGGCTTGTGCCTGAAAAGTTTTCATGGAATAATGGAATAGGACTT-C 913
G. cal.C.....t.....
G. fac.C.....C.....-

G. qui. GGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAGACGGGGGCAT 973
G. cal.C.....
G. fac.

G. qui. TTGTATGGCGGTGTTAGAGGTCAAATTCTTGGATCGCCG--CCAGACAAACTACAGCGAA 1033
G. cal.g.....-..cg.....
G. fac.g.....--.....

G. qui. AGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTGATCTGGAGCGAAAGTCAGAGGTTCGAAGACGATC 1093
G. cal.
G. fac.

G. qui. AGATACCGTCCTAGTTCTGACCATAAACGATGCCAACTGACGATCCGTAGGCGCACTTTT 1153
G. cal.g..t..t.....
G. fac.g..t..t.....

G. qui. AATGCGCTGCGGGCAGTCCCCGGGAAACCTTTAAGTTTTTGGGCTCCGGGGGAAGTATGG 1213
G. cal.a-.....C.....
G. fac.t-.....

G. qui. TTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGACGCTGCGG 1273
G. cal.
G. fac.

G. qui. CTTAATTCGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGAGGATTGACAGAT 1333
G. cal.
G. fac.

G. qui. TGATAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCG 1393
G. cal.
G. fac.

G. qui. ATTTGCTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGGCCTGCTAAATAGCACTCCTGTC 1453
G. cal.T.....
G. fac.A.....T.....

G. qui. CTCTGTGCTCGTGCAGGTGGCGGTTCTCTCTGCCCGTTTTACGGGTGGCTGAGTCCGTTT 1513
G. cal.C.....
G. fac.

G. qui. GCCGGCGGGTACTGCGCAGGTGATTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCGGCCAGTCGCAC 1573
G. cal.T.....a.....
G. fac.T.....

G. qui. GAAAATGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTAC 1633
G. cal.
G. fac.

G. qui. AATGACGGTTTCAGCGAGTTTTAAAACCTGGCCCGAAAGGGTTGGGCAAACCTGTATCATC 1693
G. cal.
G. fac.a.....a.....t.....

G. qui. ACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGAGGAATTCCTGGTAA 1753
G. cal.
G. fac.

G. qui. GTGCAAGTCATAACGTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCT 1813
G. cal.
G. fac.

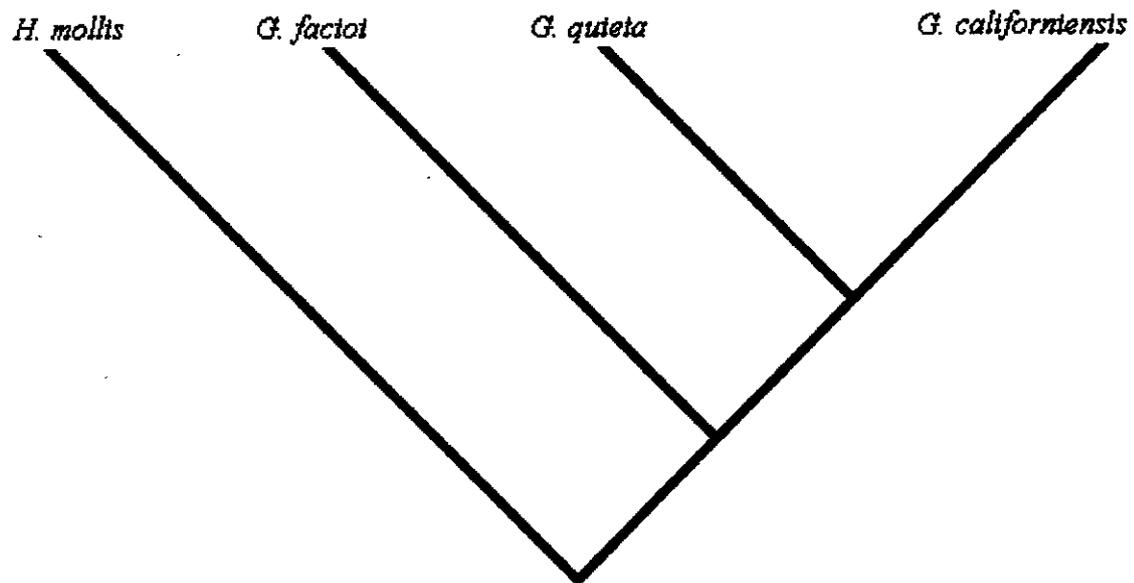
G. qui. ACTACCGATTGAATGGTTTAGCAAGGTCATCGGATCGGTGCCATTTGAGTTGTTTCGGCA 1873
G. cal.c.....
G. fac.t.....

G. qui. ACTTTAGCGGTGCTGAGAAGACGACCAAACCTTGATCCATTTAGAGGAAGTA 1924
G. cal.g....a.....-.....
G. fac.g....a.....-.....

Fig. 13. Secuencias alineadas de los genes ribosomales 18S de las especies G. qui. = *G. quieta*, G. cal. = *G. californiensis* y G. fac. = *G. facioi*. Los nucleótidos numerados corresponden a la secuencia consenso relativa a *G. quieta*; las letras en negritas entre los nucleótidos 618-810 y 1399-1545 representan las regiones V4 y V7 respectivamente; los (.) son nucleótidos idénticos, las letras minúsculas substitutiones fuera de las dos regiones arriba mencionadas y los (-) inserciones. Las secuencias obtenidas de *G. quieta* y *G. californiensis* están formadas por 1488 nucleótidos, mientras que la de *G. facioi* está constituida por 1486.

Tabla 8. Diferencias numéricas entre las secuencias de *G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi*. Los números en los cuadros en blanco corresponden al número de diferencias en nucleótidos entre las especies y los cuadros sombreados representan el porcentaje de similitud total entre las secuencias de las tres especies.

	<i>G. quieta</i>	<i>G. facioi</i>
<i>G. californiensis</i>	39	
<i>G. facioi</i>		25
<i>G. californiensis</i>		32
<i>G. quieta</i>		2.15 %
<i>G. facioi</i>		1.68 %
<i>G. californiensis</i>	2.62 %	



I. C. = 0.975

Fig. 14. Relaciones filogenéticas de tres especies de *Glythelmins* basadas en las secuencias parciales de 1,491 nucleótidos de los genes ribosomales 18S (caracteres moleculares). *G. quieta* y *G. californiensis* son especies hermanas y a su vez *G. facioi* es hermana de las dos anteriores. *Heronimus mollis* representa el grupo externo.

VII. DISCUSIÓN

El género *Glythelmins* fue establecido por Stafford en 1905 para incluir a tremátodos digéneos intestinales de anuros de Canadá, designando como especie tipo a *G. quieta*. Stafford (1900, 1905) describió en forma incompleta a esta especie, presentando únicamente ilustraciones en donde se observan dos características prominentes: las glándulas perifaríngeas y las vitelógenas. Desafortunadamente, la insuficiente descripción que dicho autor presentó, aunado con el establecimiento de nuevos géneros a partir de un número reducido de ejemplares, así como la variación intraespecífica y la ambigüedad en las descripciones originales de las nuevas especies, a determinado que algunas especies aparentemente relacionadas con *Glythelmins* hayan sido asignadas al menos a cinco géneros distintos: *Margeana* Cort, 1919; *Choledocystus* Pereira & Cuocolo, 1941; *Rauschiella* Babero, 1951; *Reynoldstrema* Cheng, 1959 y *Repandum* Byrd & Maples 1963.

Uno de los caracteres taxonómicos que mayor controversia ha causado en el estudio de la sistemática del género *Glythelmins*, es la presencia o ausencia de glándulas perifaríngeas. Cort (1919), erigió la especie *Margeana californiensis* para incluir organismos con morfología similar a la de *Glythelmins*, pero con ausencia de tales glándulas, por lo cual el autor confiere importancia genérica a dicho carácter. Posteriormente Miller (1930), realizó una revisión de la especie tipo del género *Glythelmins* y de *M. californiensis*, llegando a la conclusión que las dos compartían características, por lo que transfirió a *M. californiensis* al género *Glythelmins*. Para este autor, la ausencia de glándulas perifaríngeas no es un carácter distintivo entre los géneros, por lo que propuso que éste no debía considerarse dentro de la diagnosis genérica. A partir de esto, han surgido opiniones encontradas entre los diferentes investigadores, acerca de la presencia o ausencia de glándulas perifaríngeas como criterio para el establecimiento de otros géneros. De esta manera, Cheng (1959) reestableció a *Margeana*, argumentando que la ausencia de estas estructuras en los ejemplares, es un carácter importante dentro de la diagnosis genérica. Adicionalmente Mañe-Garzón & Holcman-Spector (1974) concuerdan con Cheng al considerar a *Margeana* como un género independiente de *Glythelmins*.

A pesar del reestablecimiento de *Margeana* realizado por estos autores, la gran mayoría de los investigadores, entre ellos Miller (1930), Byrd & Maples (1963), Nasir & Diaz (1970), Yamaguti (1971), Brooks (1977) y Prudhoe & Bray (1982), concuerdan en considerar al mismo, como sinónimo de *Glythelmins*, en base a que la ausencia de glándulas perifaringeas en *Margeana* no es considerada como una característica distintiva del género; criterio que aquí compartimos.

Las tres especies de *Glythelmins* estudiadas en este trabajo, presentan características distintivas que las sitúan como miembros del género en cuestión tales como: a) presencia de dos testículos situados uno junto del otro u oblicuamente, enteramente intercecales, b) poro genital localizado sobre la línea media del cuerpo, c) presencia de receptáculo seminal d) vesícula seminal bipartita y e) vesícula excretora en forma de "I" o "Y".

La identificación de *G. californiensis* estuvo basada en la descripción original de Cort (1919) y en los trabajos de Caballero (1944) y Caballero & Sokoloff (1934). El estudio de una gran cantidad de ejemplares de ésta especie nos permitió evidenciar características morfológicas que la distinguen de las dos especie restantes estudiadas en este trabajo, y las cuales son las siguientes: presenta pequeñas glándulas perifaringeas que rodean dorsal y ventralmente a la faringe y cuyos conductos se dirigen hacia la prefaringe. Las glándulas vitelógenas son foliculares y en la mayoría de los ejemplares se distribuyen anteriormente, desde el borde posterior de la faringe u ocasionalmente desde el borde anterior de la ventosa oral, sin extenderse jamás más allá del borde posterior de los testículos; generalmente se les observa mucho antes del borde anterior de los mismos. Los folículos confluyen dorsalmente al nivel de la bifurcación cecal, formando un continuo entre las glándulas dispuestas lateralmente. Dos caracteres adicionales a los anteriores son la presencia de asas uterinas dispuestas enteramente dentro de los ciegos y la presencia de una vesícula excretora en forma de "Y" (Fig. 15).

Cabe puntualizar que ni en la descripción original, ni en trabajos posteriores en los que se ha estudiado a ésta especie (*G. californiensis*), se ha mencionado la presencia de glándulas perifaringeas, por el contrario, la ausencia de estas estructuras, fue considerado como un

carácter distintivo para erigir un género independiente de *Glyphelmins*. Por lo tanto, la presencia de dichas estructuras en nuestros ejemplares hace dudar de la buena identificación de este material. Sin embargo, es importante mencionar que la descripción original de *G. californiensis*, llevada a cabo por Cort, fue a partir de observaciones de material *in vivo*, lo cual hace pensar que tales estructuras no fueron observadas, debido a que éstas se encuentran pegadas al contorno de la faringe y son de tamaño pequeño, por lo que en observaciones *in vivo* su observación se dificulta. Por otro lado, la mención en este trabajo de la presencia de dichas glándulas, no debe ser tomado como algo absoluto, sino que debe ser estudiado el holotipo y de ésta manera ratificar la ausencia o la presencia de las mismas, en la especie. Lo cual conllevaría a dar mayor peso al criterio de sinonimizar a *Margeana* con *Glyphelmins* en el caso de que estuvieran presentes en el holotipo o por otra parte, crear una nueva especie en la cual colocar el material obtenido en el presente estudio, si dichas estructuras efectivamente no estuvieran presentes.

Adicionalmente, en trabajos sucesivos al de la descripción original, los autores probablemente pasaron por alto la presencia de éstas glándulas, debido en cierta forma a que tenían muy presente la idea de que la especie carecía de las mismas y por lo tanto, no llevaron a cabo un estudio más profundo en relación a la observación de éstas estructuras. Por otro lado, en los estudios posteriores a los años 60's, tal vez a influido la idea externada por Byrd & Maples (1963), en la cual enfatizaron que de acuerdo al colorante que fuera utilizado para la tinción de los organismos, las glándulas podían teñirse total o parcialmente o bien, definitivamente no teñirse, por lo que los autores no han hecho mucho caso de la presencia o de la ausencia de las glándulas. No obstante, nuestras observaciones, basadas en el estudio de más de 160 ejemplares, procesados con tres de los cuatro colorantes mencionados por los autores (paracarmín de Mayer, hematoxilina de Delafield y tricrómica de Gomori) nos permiten dudar de tal idea, pues las glándulas perifaringeas se tiñeron claramente, tanto en adultos inmaduros como en adultos grávidos, independientemente del colorante utilizado. Por lo tanto, la observación de tales estructuras no depende de la técnica de tinción usada, sino de la presencia de las mismas, así como de la revisión cuidadosa de un elevado número de ejemplares.

Anteriormente a la realización del presente estudio, *G. californiensis* había sido recolectada en anuros de las especies *Rana dunni* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, y en *Rana montezumae* y *Rana pipiens* del Distrito Federal y de la Ciénaga de Lerma, en el Estado de México, así como en *Rana berlandieri* y *Rana vaillanti* de la región de "Los Tuxtlas", Veracruz. En este trabajo, ratificamos la existencia de *G. californiensis* en los huéspedes *R. dunni* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán y *R. montezumae* recolectada en la Ciénaga de Lerma, Estado de México. Sin embargo, uno de los registros que no pudo ser confirmado es el de la región de "Los Tuxtlas", debido a que los ejemplares recolectados de *R. vaillanti* efectivamente pertenecen al género *Glythelmins*, pero la especie no corresponde a la señalada por Guillén (1992). Adicionalmente, en este trabajo ampliamos el intervalo de distribución geográfica de *G. californiensis* en la República Mexicana, ya que también se le encontró como parásito de *R. dunni* del Lago de Zacapu, Michoacán (Fig.16, Tabla 9).

La comparación e identificación del material perteneciente a *Glythelmins facioi* se realizó a partir de la descripción original hecha por Brenes *et al.*, (1959) y de la redesccripción de la especie por Sullivan (1976). *G. facioi* se distingue de *G. californiensis* y *G. quieta* por la ausencia de glándulas perifaríngeas; además, las espinas tegumentales posteriores se extienden únicamente hasta el inicio del último tercio del cuerpo, rasgo que no comparten *G. californiensis* y *G. quieta*. Asimismo, los testículos están dispuestos oblicuamente, siendo el testículo derecho más anterior que el izquierdo. Por otro lado, los folículos vitelinos, se extienden, en el extremo anterior del cuerpo, ligeramente posteriores a la bifurcación cecal; posteriormente, alcanzan a sobrepasar el borde posterior del testículo izquierdo. La disposición de las asas uterinas es intra e intercecal; finalmente, el tamaño de los huevos es menor en comparación con el tamaño presente en otras especies, ya que miden en promedio 0.025 mm de largo por 0.014 mm de ancho (ver Fig. 15).

La especie *G. facioi*, descrita por Brenes *et al.*, (1959) como parásito de *R. pipiens* de Costa Rica y redescrita posteriormente por Sullivan (1976), fue considerada por Brooks (1977) como una especie aparentemente endémica del país previamente mencionado. Sin embargo, en nuestro trabajo es registrada en el anuro *R. vaillanti* colectado en Laguna

Escondida en "Los Tuxtlas", Veracruz, con lo que se amplía el intervalo de distribución geográfica de la misma y se adiciona un nuevo registro de huéspedes (Fig. 16, Tabla 9).

Por su parte, *Glythelmins quieta* fue identificada, comparando los trabajos de Stafford (1900, 1905), Miller (1930) y Rankin (1944). Los ejemplares de dicha especie se diferencian por la presencia de glándulas perifaríngeas prominentes en forma de racimo, las que en ejemplares preparados se observan ligeramente posteriores a la faringe, es decir, casi siempre se localizan en el espacio comprendido entre la faringe y el inicio de la bifurcación cecal, en cuya región algunas veces se llegan a sobrelapar con las glándulas vitelógenas; a pesar de lo anterior, se logra diferenciarlas debido a constitución particular de las mismas. En observaciones *in vivo*, las estructuras citadas se ubican a los lados de la faringe. Tanto en gusanos preparados como *in vivo* los conductos de estas glándulas están dirigidos anteriormente, desembocando en el borde inicial de la ventosa oral. Otra de las particularidades de la especie es la referente a la extensión de las glándulas vitelógenas, cuyos folículos se localizan anteriormente desde el borde posterior de la faringe, o pueden localizarse en la región media del esófago o en el nivel en el cual se originan los ciegos; posteriormente se despliegan más allá del borde posterior de los testículos. De igual modo, las asas uterinas se localizan en el área intercecal, cecal y extracecal (Fig. 15).

En México, *G. quieta* solamente había sido registrada en el huésped *R. montezumae* del Lago de Texcoco y Xochimilco (ver Lamothe *et al.*, 1997), por lo que en este trabajo se amplía el intervalo de distribución geográfica y se registran tres nuevos huéspedes parasitados por la misma, puesto que se recolectó de los anuros *R. montezumae* de la Ciénaga de Lerma, Edo. Mex., *R. dunni* de los Lagos de Pátzcuaro y Zacapu, Mich. y *R. neovolcanica* y *R. megapoda* de los Manantiales de Cointzio, Mich. (Fig. 16). Los huéspedes *R. dunni*, *R. neovolcanica* y *R. megapoda* constituyen los nuevos registros de huéspedes (Tabla 9).

Por último, nuestro trabajo permitió determinar, a partir del estudio de algunos lotes depositados en la CNHE, que varios ejemplares fueron erróneamente asignados a la especie *G. californiensis*. Los lotes catalogados con los números 1461, 1514 y 1561, recolectados en los huéspedes *R. montezumae* (San Pedro Tlaltizapan, Edo. de Mex.), *Rana berlandieri* ("Los

Tuxtlas", Ver.) y *R. dunni* (Lago de Pátzcuaro, Mich.), respectivamente, fueron reexaminados y podemos decir que uno de los diez ejemplares, del lote 1561 corresponde a *G. quieta*. Por otro lado, el material con número de catálogo 1461, no pertenece a la especie a la que fueron asignados, correspondiendo los ocho a *G. quieta*. Por su parte, los cinco digéneos catalogados con el número 1514 e identificados como *G. californiensis*, pertenecen a la especie *G. facioi*. Adicionalmente, se revisaron otros lotes de organismos asociados a alguna de las especies del género *Glyphelmings* (1181, 2495, 1562 y 1563); encontrando que éstos si fueron correctamente determinados y que sus poblaciones no se encuentran mezcladas. Todo lo anterior es de gran importancia, como un primer paso para reexaminar las relaciones filogenéticas de este grupo de tremátodos digéneos.

La idea de integrar en este trabajo la secuenciación de un marcador molecular (gen ribosomal 18S), se debió principalmente, a que el uso de secuencias génicas está siendo aplicado actualmente para resolver problemas taxonómicos relacionados con un gran número de organismos, desde bacterias hasta primates. Adicionalmente, algunas de las razones por las cuales, en el presente estudio utilizamos secuencias génicas fueron: el hecho de que aportan una mayor cantidad de información (potencialmente cada nucleótido de la secuencia) comparada con la proporcionada por caracteres morfológicos; el que poseen diferentes propiedades estructurales y funcionales; que presentan diferentes tasas evolutivas y dan la resolución más fina, ya que permiten muestrear en mayor detalle la variación a nivel molecular. No obstante, las secuencias génicas no son la única fuente de datos, por lo que no deben reemplazar a otros, especialmente a los que no son moleculares. Por el contrario, un estudio taxonómico se debe basar en toda la información disponible, molecular y no molecular, para los organismos de interés.

La aplicación de secuencias parciales de los genes ribosomales 18S en el presente estudio, se sustenta principalmente en que este gen a sido ampliamente empleado en estudios relacionados con Platelminotos, ya que a permitido analizar relaciones entre especies muy cercanas (Johnston *et al.*, 1993) o relaciones muy lejanas a nivel de Clase o Phylum (Campos *et al.*, 1998), debido principalmente a que, presentan regiones conservadas y regiones

variables. Además, de que éstos genes están altamente repetidos en el genoma de todos los eucariontes (~100 copias), lo que hace que sean fácilmente detectados y caracterizados. Otra de las ventajas de que se encuentren formando grandes grupos de copias, permite una recombinación continua que los homogeniza por evolución conservada, lo que quiere decir que el gen que se logre clonar y secuenciar de un individuo de una especie, es idéntico a los otros genes del mismo individuo, y aun más sorprendente, la semejanza que existe con los genes de otros individuos de la misma población o de una población distante.

A pesar de que tradicionalmente han sido utilizadas las secuencias del gen ribosomal 18S en diferentes grupos de organismos, existen otros marcadores como los genes mitocondriales o los que codifican para las subunidades de la enzima citocromo oxidasa y el citocromo b, los cuales proporcionan una mayor cantidad de información a diferentes niveles, a diferencia del gen ribosomal 18S.

En lo que respecta a este trabajo, la validez acerca de la existencia de tres especies pertenecientes al género *Glypthelmins*, fue ratificada a partir de la secuenciación parcial de los genes ribosomales 18S, obteniéndose un total de 1,488 nucleótidos de las especies *G. quieta* y *G. californiensis* y de 1,486 pares de bases para *G. facioi*. Los datos obtenidos nos permitieron cuantificar las diferencias a nivel molecular entre las especies; la mayor cantidad de cambios entre las secuencias, lo presentan las especies *G. quieta* y *G. californiensis*, las cuales difieren en 39 nucleótidos. Por su parte, *G. californiensis* y *G. facioi* varían en 32 posiciones dentro de la secuencia y a la vez, *G. facioi* y *G. quieta* muestran 25 diferencias. El índice de similitud total obtenido al comparar las secuencias de las tres especies, nos proporcionó los siguientes datos 2.62 %, 2.15 % y 1.68 % respectivamente. Desafortunadamente, éstos resultados nos dan una idea somera acerca de las diferencias existentes entre los nucleótidos de las tres especies del género, ya que no fue posible hacer la comparación con otras especies de géneros distintos a *Glypthelmins*, con lo cual se hubiera podido establecer que los valores obtenidos en este estudio, fueron significativos o no. Por otro lado, no existen trabajos en los cuales se manifieste un valor a partir del cual se establezca a nivel molecular la existencia e identidad de las especies. Por lo tanto, es necesario hacer la comparación de secuencias de diferentes poblaciones de una especie, así como la comparación con otras especies y de ésta

manera fijar un valor a partir del cual se puedan distinguir a las especies. Por último, la región que nos proporcionó la mayor parte de la información fue la región variable V4, ya que en ésta, se presentaron un gran número de diferencias entre los nucleótidos.

La existencia de tres especies de *Glyphelmings*, ratificada a partir de las secuencias parciales de los genes ribosomales 18S, conlleva a la reevaluación del material que de éstas existe en la CNHE, obtenido de anuros de varias localidades de la República Mexicana. Adicionalmente, la información de las secuencias permitió examinar las relaciones filogenéticas entre las tres especies. De acuerdo con Brooks (1977) y Brooks & McLennan (1993), éstas tres especies de *Glyphelmings* constituyen un clado junto con otras cuatro especies congénicas que habitan en Norteamérica, siendo *G. facioi* la especie hermana de *G. quieta* y *G. californiensis*, como puede apreciarse en la Fig. 17.

El análisis filogenético realizado a partir de los datos moleculares, considerando como grupo externo al miembro más basal de la filogenia de los digéneos según Brooks *et al.*, (1985) es decir, *Heronimus*, reveló que las relaciones entre éstas concuerdan con lo obtenido con evidencias morfológicas, con lo que se robustece el análisis de la historia evolutiva del grupo. Interesante será buscar explicaciones al patrón encontrado, tanto desde el punto de vista de la infección de los anuros, como desde el punto de vista biogeográfico. Con respecto al primero, *G. quieta* muestra una escasa especificidad, ya que se ha encontrado parasitando al menos a 24 especies de anuros incluidos en cinco géneros, mientras que las dos especies restantes de *Glyphelmings* lo hacen únicamente en el género *Rana* (siete especies en *G. californiensis* y dos en *G. facioi*). Por otro lado, con relación a la biogeografía, el análisis preliminar basado en la información que aportamos en este trabajo, revela la imperiosa necesidad de analizar con detalle el material de diferentes especies de *Glyphelmings* en Norte y Centroamérica, con el fin de ratificar los registros realizados y de establecer el intervalo tanto hospedatorio como distribucional de las mismas y una vez realizado ésto, reexaminar la hipótesis filogenética del género en busca de explicaciones a los procesos que determinan los patrones evolutivos encontrados.

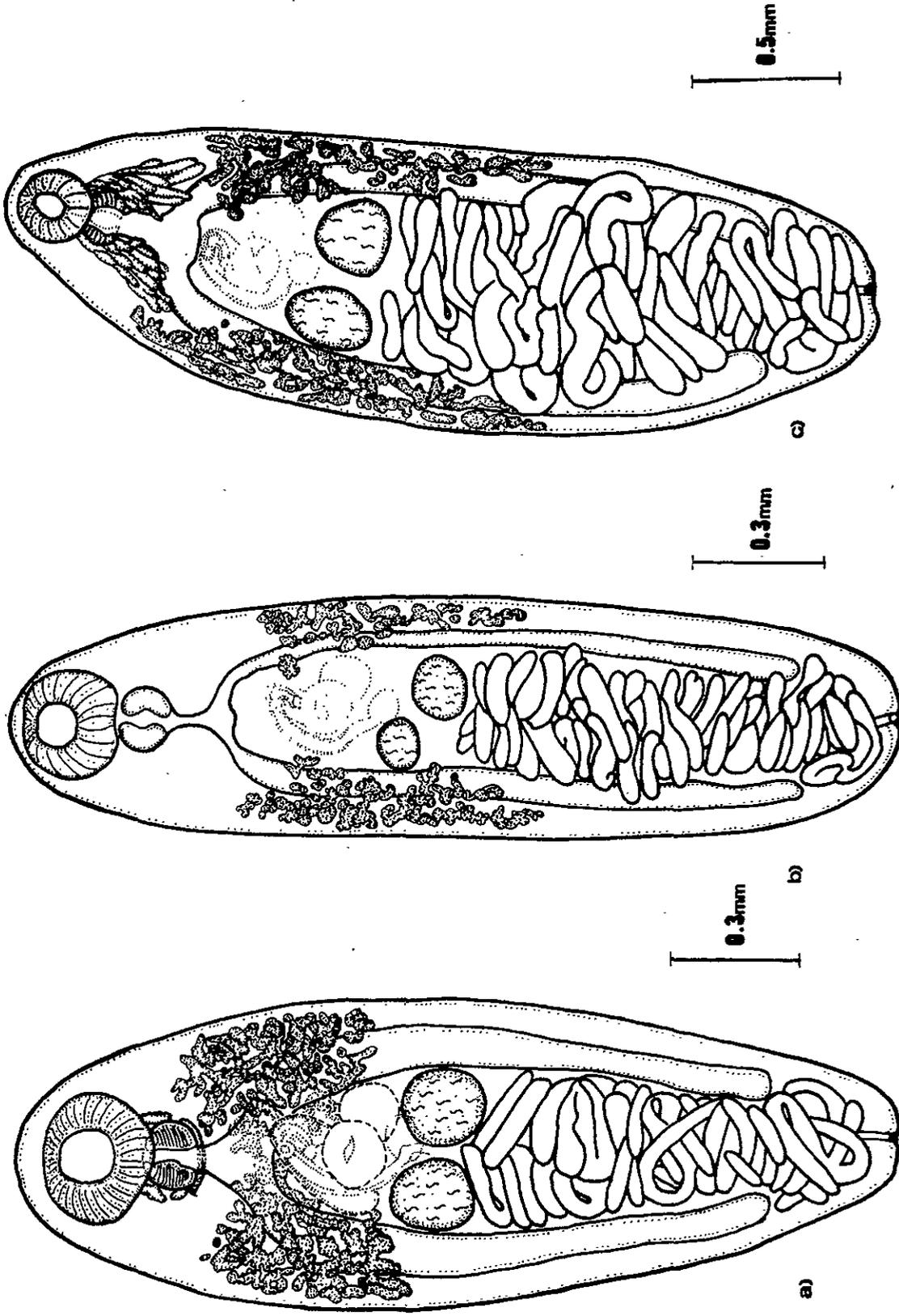


Fig. 15. Diferencias morfológicas entre las tres especies de *Glyphelminis* estudiadas en el presente trabajo. a) *G. californiensis*, b) *G. facioi* y c) *G. quieta*.

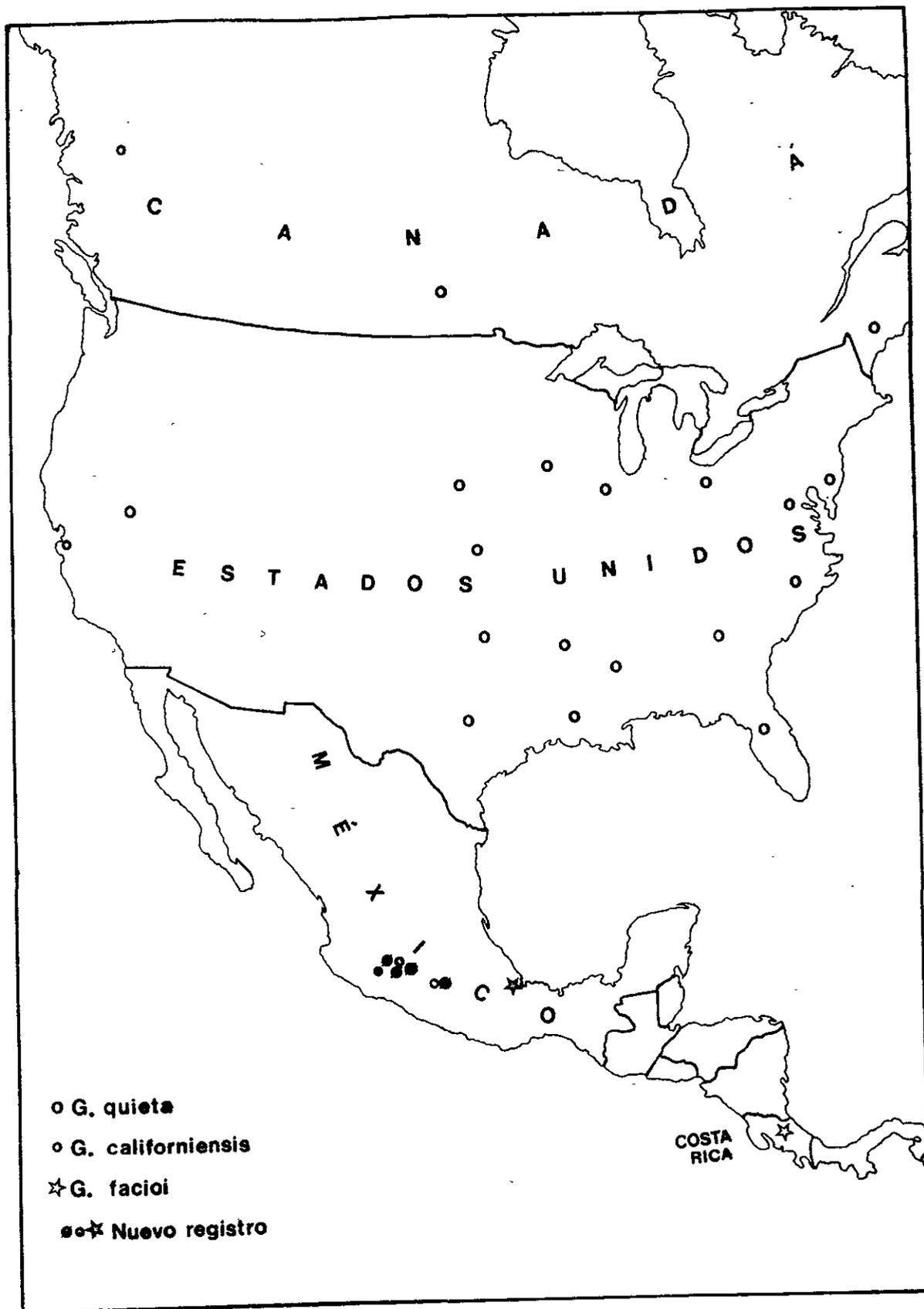


Fig. 16. Mapa de distribución de *G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi*.

Tabla 9. Lista de las especies de anuros registrados como hospederos de *G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi* en el Continente Americano.

<i>Glythelmins quieta</i>	<i>Glythelmins californiensis</i>	<i>Glythelmins facioi</i>
<i>Acris crepitans</i>	<i>Rana aurora</i>	<i>Rana pipiens</i>
<i>Bufo americanus</i>	<i>Rana aurora draytoni</i>	☒ <i>Rana vaillanti</i>
<i>Bufo microscaphus</i>	<i>Rana berlandieri</i>	
<i>Bufo woodhousei</i>	<i>Rana boyli</i>	
<i>Hyla crucifer</i>	<i>Rana dunni</i>	
<i>Hyla crucifer crucifer</i>	<i>Rana montezumae</i>	
<i>Hyla pickeringii</i>	<i>Rana pipiens</i>	
<i>Pseudacris nigrata</i>	<i>Rana pretiosa</i>	
<i>Pseudacris triseriata</i>		
<i>Rana aurora draytoni</i>		
<i>Rana blairi</i>		
<i>Rana catesbeiana</i>		
<i>Rana clamitans</i>		
<i>Rana chiricahuensis</i>		
☒ <i>Rana dunni</i>		
☒ <i>Rana megapoda</i>		
<i>Rana montezumae</i>		
☒ <i>Rana neovolcanica</i>		
<i>Rana palustris.</i>		
<i>Rana pipiens</i>		
<i>R. pipiens sphenoccephala</i>		
<i>Rana septentrionalis</i>		
<i>Rana utricularia</i>		
<i>Rana virescens</i>		
<i>Rana yavapaiensis</i>		

☒ Nuevo registro de hospedero

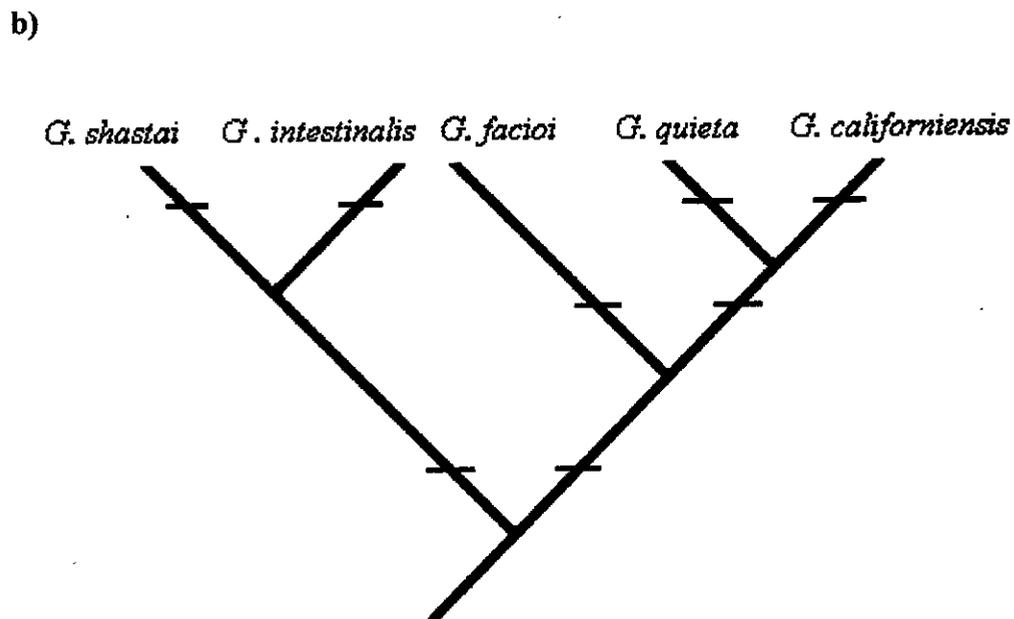
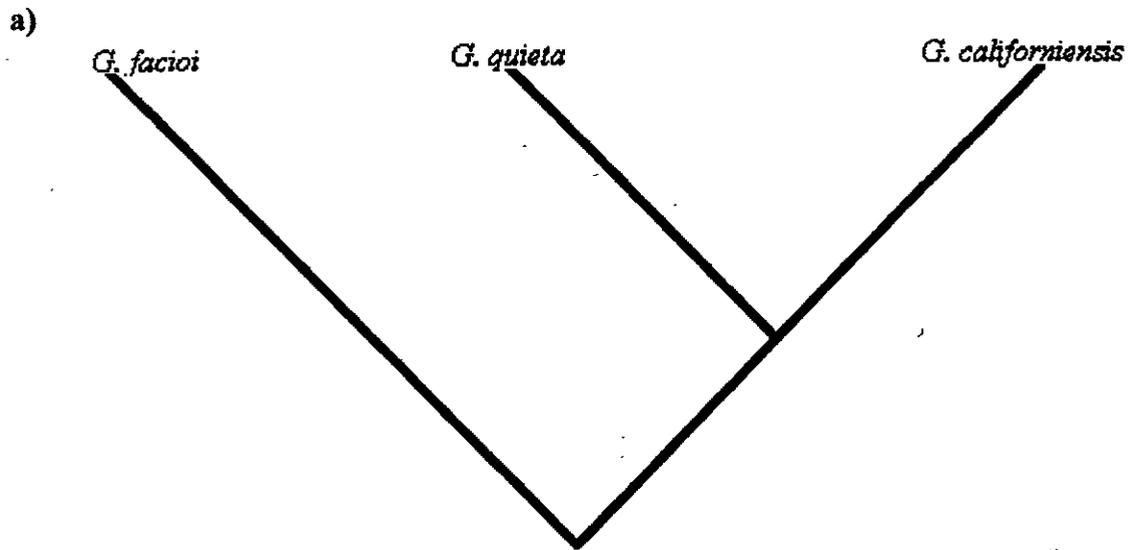


Fig. 17 Comparación de los cladogramas obtenidos a partir de datos moleculares (a) y datos morfológicos (b), tomado de Brooks & McLennan (1993). Podemos observar que existe congruencia en cuanto las relaciones de parentesco establecidas por los dos métodos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se establece el registro de las especies: *Glythelmins quieta*, *Glythelmins californiensis* y *Glythelmins facioi*, en cinco especies de anuros de México.
- Se amplía el intervalo de distribución geográfica de las tres especies.
- El Lago de Zacapu representa una nueva localidad para *G. californiensis*.
- La Ciénaga de Lerma, los Lagos de Pátzcuaro y Zacapu, así como los Manantiales de Cointzio, constituyen nuevas localidades para *G. quieta*.
- Se registra por primera a la especie *G. facioi* en el huésped *R. vaillanti*.
- Los anuros *Rana dunni*, *R. neovolcanica*, *R. megapoda* y *R. vaillanti* constituyen nuevos registros, en cuanto a especies de huéspedes parasitados por alguna especie de *Glythelmins*.
- El material depositado en la CNHE con Nos. de catálogo, 1461, 1514 y 1561 no corresponde en su totalidad a la especie a la cual fue asignado.
- La existencia de las especies *G. quieta*, *G. californiensis* y *G. facioi* es ratificada a partir de las diferencias existentes en las secuencias de 1,488, 1488 y 1486 nucleótidos de los genes ribosomales 18S, de cada una de las especies.
- La secuenciación de los genes ribosomales 18S, es integrada como una herramienta complementaria a los caracteres morfológicos para la diferenciación de especies de helmintos.
- El análisis de los datos moleculares permite establecer las relaciones de parentesco entre las especies, las cuales concuerdan con las derivadas a partir de caracteres morfológicos, siendo *G. facioi* la especie hermana de *G. quieta* y *G. californiensis*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- BABERO B. B.** 1951a. Notes on the trematode genus *Glyphelmins* Stafford, 1905. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 18(2): 103-106.
- BABERO B. B.** 1951b. *Rauschiella tineri* n. g., n. s., a trematode (Plagiorchiinae) from a frog. *J. Parasitol.* 37(6): 560-562.
- BANDI C., G. LA ROSA, S. COMINCINI, G. DAMIANI & E. POZIO.** 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology.* 107: 419-424.
- BLAIR D., A. CAMPOS, M. P. CUMMINGS & J. P. LACLETTE.** 1996. Evolutionary Biology of Parasitic Platyhelminthes: The Role of Molecular Phylogenetics. *Parasitology Today* 12(2): 66-71.
- BRENES MADRIGAL. R. R., S. ARROYO, G., O. JIMENEZ-QUIROZ & E. DELGADO FLORES.** 1959. Algunos tremátodos de *Rana pipiens*. Descripción de *Glyphelmins facioi* n. sp. *Rev. Biol. Trop.* 7(2): 191-197.
- BRAVO H. M.** 1948. Descripción de dos especies de tremátodos parásitos de *Bufo marinus* L. procedentes de Tuxtepec, Oaxaca. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 19(1): 153-161.
- BROOKS D. R.** 1976. Five species of platyhelminths from *Bufo marinus* L. (Anura: Bufonidae) in Colombia with descriptions of *Creptotrema lynchi* sp. n. (Digenea: Allocreadiidae) and *Glyphelmins robustus* sp. n. (Digenea: Macroderoididae). *J. Parasitol.* 62(3): 429-433.
- BROOKS D. R.** 1977. Evolutionary history of some plagiorchioid trematodes of anurans. *Syst. Zool.* 26:277-289.
- BROOKS D. R. & D. A. McLENNAN.** 1993. PARASCIPT. PARASITES AND THE LANGUAGE OF EVOLUTION. Smithsonian Institution Press, Washington. 429 pp.
- BYRD E. E. & W. P. MAPLES** 1963. The glyphelminths (Trematoda: Digenea), an the erection of a new genus. *Ztschr. Parasitenk.* 22: 521-536.
- CABALLERO C. E.** 1938. Contribución al conocimiento de la Helmintofauna de México. Tesis Doctoral Facultad de Filosofía y Estudios Superiores, UNAM, México. 149 pp.
- CABALLERO C. E.** 1942. Tremátodos de las ranas de la ciénaga de Lerma, Estado de México. III. Redescrípción de una forma norteamericana de *Haematoloechus* y algunas consideraciones sobre *Glyphelmins californiensis* (Cort, 1919). *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 13(1): 71-79.
- CABALLERO C. E. & D. SOKOLOFF.** 1934. Tercera contribución al conocimiento de la parasitología de *Rana montezumae*. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 5: 337-340.

- CABALLERO C. E., M. BRAVO H. & C. ZERECERO.** 1944. Estudios helmintológicos de la región Oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda I. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 15(1): 59-72
- CARRANZA S., G. GIRIBET, C. RIBERA, J. BAGUÑA & M. RIUTORT.** 1996. Evidence that Two Types of 18S rDNA Coexist in the Genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Mol. Biol. Ecol.* 13(6): 824-832.
- CORDERO E. H.** 1944. Dos nuevas especies de tremátodos del género *Glyphelmins* de los batracios del Uruguay. *An. Acad. Brasil Cienc.* 16(1): 1-8.
- CORT W. W.** 1919. A new distome from *Rana aurora*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 19(8): 283-298.
- CUNNINGHAM C. O., D. M. MCGILLIVRAY, K. MACKENZIE & W. M. MELVIN.** 1995. 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
- CHENG T. C.** 1959. Studies on the trematode family Brachycoeliidae, II. Revision of the genera *Glyphelmins* (Stafford, 1900) Stafford, 1905, and *Margeana* Cort, 1919; and the description of *Reynoldstrema* n. g. (Glyphelminae, n. subfam.). *Am. Midl. Nat.* 61: 68-88.
- CHENG T. C.** 1961. Description, life history, and developmental pattern of *Glyphelmins pennsylvaniensis* n. sp. (Trematoda: Brachycoeliidae), new parasite of frogs. *J. Parasitol.* 47 (3): 469-477.
- DOBBIN J. E. (Jr.).** 1958. *Glyphelmins vitellinophilum* sp. n., parásito de *Hyla raniceps*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 56(1): 153-161.
- FLORES V. O.** 1994. BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN EN MÉXICO: VERTEBRADOS, VEGETACIÓN Y USO DEL SUELO. CONABIO. México: 439 pp.
- GONZÁLEZ D.** 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Bol Soc. Bot. México* 60: 137-157
- GUILLÉN H. S.** 1992. Comunidades de helmintos de algunos anuros de "Los Tuxtlas", Veracruz. Tesis Maestría Facultad de Ciencias, UNAM, México. 90 pp.
- HARWOOD P. D.** 1932. The helminths parasitic in the amphibia and reptilia of Houston, Texas and vicinity. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 81: 1-71.
- INGLES L. G.** 1936. Worm parasites of California amphibia. *Tr. Am. Micr. Soc.* 55(1): 73-92.
- HILLIS D. M. & C. MORITZ** 1990. MOLECULAR SYSTEMATICS. Sinauer, Sunderland, MA.
- JOHNSTON D.A., R. A. KANE & D. ROLLINSON.** 1993. Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. *Parasitology.* 107: 147-156.

- KAUKAS A., E. D. NETO, A. J. G. SIMPSON, V. R. SOUTHGATE & D. ROLLINSON.** 1994. A phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA. *Inter. J. Parasitol.* 24: 285-290
- LAMOTHE-ARGUMEDO R.** 1983. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA DE LOS PLATELMINTOS. A.G.T., México. 143 pp.
- LAMOTHE A. R., L. GARCÍA P., D. OSORIO S., & G. PÉREZ PONCE DE LEÓN** 1997. CATÁLOGO DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE HELMINTOS. IBUNAM. CONABIO, México: 211 pp.
- LEIGNEL V., J. F. HUMBERT & L. ELARD.** 1997. Study by ribosomal DNA ITS 2 sequencing and RAPD Analysis on the sistematics of four *Metastrongylus* species (Nematoda: Metastrongyloidea). *J. Parasitol.* 83(4): 606-611.
- LEÓN R. V.** 1990. Contribución al conocimiento de la helmintofauna de vertebrados acuáticos de San Pedro Tlaltizapán, Estado de México. Tesis Facultad de Ciencias, UNAM, México. 85 pp.
- LEÓN R. V.** 1992. Fauna helmintológica de algunos vertebrados acuáticos de la ciénaga de Lerma, Estado de México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool.* 63(1): 151-153.
- LUI J. & R. E. BERRY.** 1995. Differentiation of isolates in the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) by random amplified polimorphic DNA fragments and morphological characters. *Parasitology.* 111: 119-125
- MAÑÉ-GARZON F & B. HOLCMAN SPECTOR** 1967a. *Margeana cháquensis* n. sp., (Digenea) parasita de *Leptodactylus laticeps* del chaco argentino. *Comun. Zool. Mus. Hist. Nat. Montev.* 9(115): 1-4.
- MAÑÉ-GARZON F. & B. HOLCMAN-SPECTOR** 1967b. Una nueva especie del género *Margeana* (Digenea), parásita de *Pseudis mantidactylus* (Cope). *Comun. Zool. Mus. Hist. Nat. Montev.* 9(113):1-4.
- MAÑÉ-GARZON F & B. HOLCMAN SPECTOR** 1974. Trematodos de los anfibios del Uruguay. I. *Rev. Biol. Uruguay.* 11(2): 101-117.
- MARTIN G. W.** 1969. Description and life cycle of *Glypthelmins hyloreus* sp. n. (Digenea: Plagiorchiidae). *J. Parasitol.* 55(4): 747-752.
- MILLER E. L.** 1930. Studies on *Glypthelmins quieta* Stafford. *J. Parasitol.* 16: 237-243.
- NADLER A. S.** 1995. Advantages and Disadvantages of Molecular Phylogenetics: A case Study of Ascaridoid Nematodes. *J. of Nematology* 27(4): 423-432.
- NASIR P.** 1966. Two new species of digenetic trematodes from venezuelan amphibians. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 33(2): 166-170.

- NASIR P. & M. T. DIAZ.** 1970. A redescription of *Glythelmins linguatula* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1924 and *G. vesicalis* (Ruiz & Leao, 1942) Yamaguti, 1958 with a key to the valid species. *Riv. Parassit.* 31(4): 261-274.
- NIETO A. & J. LLORENTE.** 1989. Caracteres bioquímicos y nucleares en los métodos de la Sistemática moderna. *Ciencias No. Especial* 3. pp. 56-77.
- NOBLE E. R., G. A. NOBLE, G. A. SCHAD & A. J. MACINNES** 1989. PARASITOLOGY. The Biology of Animal Parasites. Lea Febiger, Philadelphia. 574 pp.
- OLSEN O. W.** 1937. A systematic study of the trematode subfamily Plagiorchiinae Pratt, 1902. *Trans. Am. Micr. Soc.* 56(3): 311-339.
- PRUDHOE S. & R. A. BRAY** 1982. PLATYHELMINTH PARASITES OF THE AMPHIBIA. Oxford University Press, Great Britain. 217 pp.
- PULIDO F. G.** 1992. Helmintos de *Rana dunni* Zweifel, 1957, especie endémica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis Facultad de Ciencias, UNAM, México. 72 pp.
- PULIDO F. G.** 1994. Helmintos de *Rana dunni* especie endémica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool.* 65(1): 205-207.
- RANNALA B. H.** 1990. Electrophoretic evidence concerning the relationship between *Haplometrana* and *Glythelmins* (Digenea: Plagiorchiiformes). *J. Parasitol.* 76: 746-748.
- RANKIN J. S. (Jr.)** 1944. A review of the trematode genus *Glythelmins* Stafford, 1905, with an account of the life cycle of *G. quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905. *Trans. Am. Micr. Soc.* 63(1): 30-43
- REID A. P. & W. M. HOMINICK.** 1993. Cloning of the rDNA repeat unit from British entomopathogenic nematode (Steinernematidae) and its potential for species identification. *Parasitology.* 107: 529-536.
- ROLLINSON D., T. K. WALKER & A. J. G. SIMPSON.** 1986. The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology* 92: S53-S71
- ROOSIEN J., P. M. VAN ZANDVOORT, R. T. FOLKERTSMA, N. A. M. ROUPPE VAN DER VOORT, A. GOVERSE, F. J. GOMMERS & J. BAKKER.** 1993. Single juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* differentiated by randomly amplified polymorphic DNA. *Parasitology.* 107: 567-572.
- RUIZ J. M.** 1949. Consideracoes sôbre o gênero "*Choledocystus*" Pereira and Cuocolo, 1941 (Trematoda, Plagiorchiidae). *Rev. Brasil. Biol.* 9(2): 167-174.
- RUIZ J. M. & LEO A. T.** 1942. *Choledocystus vesicalis* n. sp., parasita de vesícula biliar de *Bufo marinus* (L.). (Trematoda: Plagiorchiidae). *Mem. Inst. Butantan.* 16: 209-217.

- SANGER F., S. NICKLEN & A. COULSON.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74(12): 5463-5467.
- SCHMIDT G. D. & L. S. ROBERTS.** 1977. FOUNDATIONS OF PARASITOLOGY. The C. V. Mosby company Saint Louis. 655 pp.
- STAFFORD J.** 1900. Some undescribed trematode. *Zool. Jahrb. Abt. Syst.* 13(5): 399-415.
- STAFFORD J.** 1905. Trematodes from canadian vertebrates. *Zool. Anz.* 28(21-22): 681-694.
- SULLIVAN J. J.** 1976. The trematode genus *Glypthelmins* Stafford, 1905 (Plagiorchioidea: Macroderoididae) with a redescription of *G. facioi* from Costa Rican frogs. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 43(2):116-125.
- SWOFFORD D.** 1993. PHYLOGENETIC ANALYSIS USING PARSIMONY. VERSION 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Urbana, Illinois.
- TEIXEIRA DE FREITAS J.** 1941. Sobre alguns trematodeos parasitos de ras. *Rev. Brasil. Biol.* 1(1): 31-40.
- TRAVASSOS L.** 1924. Contribuicoes para o conhecimento dos helminthos dos batraquios do Brasil. *Sc. Med.* 2(11): 2-11.
- TRAVASSOS L.** 1926. Trematodeos novos. (V). *Bol. Biol.* 1: 16-19.
- TUBANGUI M. A.** 1928. Trematode parasites of phillippine vertebrates. *Philipp. J. Sci.* 36(3): 351-371.
- YAMAGUTI, S.** 1971. SYNOPSIS OF DIGENETIC TREMATODES OF VERTEBRATES I. Keigaku Publishing Co. Tokyo, Japan. I & II. 1074 pp.