



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

“Variación genética de *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda:
Bothriocephalidae) en peces dulceacuícolas del estado de
Durango, utilizando rDNA (ITS1, 5.8S e ITS2) y mtDNA (*Cox1*)”

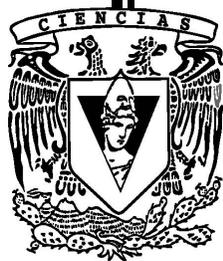
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ROSARIO BRIOSIO AGUILAR



Director de Tesis: Dr. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN

MÉXICO, D. F.

2011



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Variación genética de *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda: Bothriocephalidae) en peces dulceacuícolas del estado de Durango, utilizando rDNA (ITS1, 5.8S e ITS2) y mtDNA (*Cox1*)”

realizado por **Briosio Aguilar Rosario** con número de cuenta **3-0117232-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

Propietario Tutor Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Suplente Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo

Suplente Dr. Rogelio Aguilar Aguilar

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 01 de marzo de 2011

EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/CZS/cigs

Agradecimientos

Agradezco a CONACYT 83043 por el apoyo concedido al proyecto: Diversidad y riqueza de especies de helmintos parásitos en peces dulceacuícolas mexicanos: un enfoque sistemático y biogeográfico desde las moléculas hasta los ecosistemas. De igual manera agradezco a PAPIIT IN-209608 por el financiamiento al proyecto: Evolución y biogeografía histórica de helmintos parásitos de peces dulceacuícolas en la zona de transición mexicana II. El uso de marcadores moleculares para el reconocimiento de límites entre especies y descripción de patrones filogeográficos así como a CONABIO FM001 por el apoyo al proyecto: Helmintos parásitos de peces dulceacuícolas de cuencas hidrológicas del Centro-Norte de México (Durango).

Al grupo sinodal conformado por *Dr. Daniel Piñero Dalmau*, *Dra. América Nitxin Casteñeda Sortibrán*, *Dra. Maria del Carmen Guzmán Cornejo* y *Dr. Rogelio Aguilar Aguilar* a quienes les agradezco enormemente el tiempo dedicado a las revisiones así como las sugerencias y los acertados comentarios que mejoraron y enriquecieron este trabajo. A todos ustedes mil gracias.

Debo agradecer reconocimiento al *Dr. Gerardo Pérez Ponce de León* a quien dedico también este trabajo por darme la oportunidad de participar en el grupo de investigación del Laboratorio de Helmintología del IBUNAM y quien a lo largo de diversas formas me apoyó en el asesoramiento y realización desde la primera hasta la última parte de este trabajo y cuyas reflexiones me sirvieron de incentivo permanente, quien además de formar parte de mi mundo del pensamiento, de la disciplina, los viajes y la aventura, me ha mostrado el camino del fascinante mundo de la investigación y quien con humildad me ha encaminado en la solución de este rompecabezas científico. Así mismo representa una fuente de inspiración, perseverancia y fuerza, y valoro mucho el que esté presente en mi vida y que haya procurado activamente el desarrollo de mis propias capacidades.

Debo mi enorme agradecimiento al *Dr. Rogelio Rosas Valdéz* quien incansablemente me permitió comprobar aspectos fundamentales de este estudio y que con indulgencia y paciencia inagotables me haya alentado con su actitud inteligente y su discurso de tolerancia en el proceso de este trabajo y con quien comprendí que la objetividad nos hace ver las cosas como son, lejos de nuestros deseos y temores.

Agradezco inmensamente a la *M. en C. Liliana Cervantes Martínez* por el apoyo en la secuenciación de ejemplares, así como el apoyo en el Laboratorio de Sistemática Molecular 3 y por los comentarios que mejoraron este trabajo.

A la *M. en C. Laura Márquez Valdelamar* por la obtención de secuencias y por los comentarios oportunos que me ayudaron en suma a realizar este trabajo.

A la *M. en C. Berenit Mendoza Garfias* por las fotos realizadas del ejemplar presentado en este trabajo.

Mucho agradecimiento merecen el *Dr. Martin García Varela* especialmente a lo que se refiere a las sugerencias en los análisis presentados y *M. en C. Luis García Prieto* por el préstamo de ejemplares y apoyo en la literatura y todas aquellas personas que desinteresadamente me hayan procurado su ayuda en el procedimiento de éste trabajo: *Dr. Ulises Razo Mendivil*, *M. en C. Andrés Martínez Aquino*, y *M. en C. Jorge D. López Caballero*.

Estoy enormemente agradecida a todas las personas que participaron en la salida a campo donde fueron colectados los organismos utilizados en este presenta trabajo: *Dr. Gerardo Pérez Ponce de León*, *Dr. Rogelio Rosas Valdez*, *Dr. Rogelio Aguilar Aguilar*, *Dr. Jorge Falcón Ordaz*, *Dr. Omar Dominguez Dominguez*, *M. en C. Luis García Prieto*, *M. en C. Berenit Mendoza Garfias*, *M. en C. Rodolfo Pérez Rodríguez*, *M. en C. Mirza Ortega Olivares* y a los compañeros *Biol. Aline Rojas Sanchez* y *Biol. David Hernandez*, a los compañeros ictiólogos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Además a todos lo compañeros del Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología *M. en C. David Osorio Sarabia*, *M. en C. Lorena Garrido Olvera*, *Dr. Rosario Mata López*, *Biol. Angeles Romero Mayén*, *Guadalupe Velarde Aguilar*, *Biol. Javier Alcántar Escalera* y *Leticia Barragán*.

Agradezco también al *M. en C. Carlos Mendoza Palmero* que amablemente me proporcionó ejemplares que fueron incluidos en los análisis de este estudio.

Un reconocimiento especial merece la *Dr. Sara Ceccarelli* por sus comentarios tanto en este trabajo, así como en la gramática alemana.

A toda la colectividad que forma la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a compañeros y profesores de la Facultad de Ciencias, Instituto de Biología e Instituto de Ecología.

Dedicatoria

Deseo dedicar esta tesis

A mis Padres que han sido un referente de tenacidad, fortaleza y progreso, a mi madre por su entrega, amor y paciencia a mi padre que continuamente me ha apoyado sin pedir nada a cambio

A mi hermana y hermanos que son un ejemplo de bondad, comprensión y que con afecto y confianza me han apoyado en todo con cariño y solidaridad

Für dich Lieber, weil du geduldig auf den Abschluss dieser Arbeit gewartet has. Ich danke dir für deine Bereicherung durch alle deine Ausdrücke, jede Erfahrung erhöherte die Gefühle meines Lebens, danke dass du dafür sorgtest, dass unsere Relation stärken wurde, dass du die Stärke hattest um die Hindernisse zu zerstören, die Sicherheit und die Ruhe. Danke für den Mut um den Sprung zu machen, für das Tippen für alle deine Werte und Leitungsgrundsätze. Danke dass du mir gezeigt hast, dass mein Vertrauen in meine Fähigkeit der Erfolg meine Ziele zu erreichen ist das Resultat von Disziplin, beständig Bemühugen, Verantwortung und das Bewältigen meines selbst Narzissmus. Danke für alle liebe.

A Fabo por su inquebrantable compromiso social, por fomentar en mi la decisión, el libre pensamiento, el deber de la lucha social, por compartir tu conocimiento y por impulsarme a la búsqueda de mi misma, por los ilustrados consejos de no reducir la vida a una sola experiencia y sobre todo por ver hacia adelante siempre.

A Aldi por sus sabias reflexiones y comentarios que me enriquecieron en el trabajo personal de trascender el límite de mis propios miedos, con amor y gratitud.

A los amigos que han formado parte de mi vida en estos varios años de la universidad y de los cuales he aprendido muchas cosas valiosas y a la Familia Muñoz Arroyo, que me apoyo incondicionalmente, a todos ustedes con mucho agradecimiento.

A todas y todos aquellos que cuestionan este mundo y se atreven a soñar un uno mejor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Características generales de <i>Bothriocephalus acheilognathi</i> , Yamaguti 1934.....	3
I.2 Patogenicidad.....	3
I.3 Caracterización morfológica de <i>Bothriocephalus acheilognathi</i>	4
I.4 Información taxonómica.....	6
I.5 Ciclo de vida.....	6
I.6 Especificidad hospedatoria.....	7
I.7 <i>Bothriocephalus acheilognathi</i> como especie invasora.....	8
I.8 Distribución actual en México.....	9
I.9 Variación genética.....	11
I.9.1 Organización de genes ribosomales.....	12
I.9.2 Genes mitocondriales.....	12
II. OBJETIVOS.....	15
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
<i>Trabajo de campo</i>	
III.1 Zona de estudio.....	16
III.2 Recolecta de peces y análisis helmintológico.....	16
III.3 Fijación de parásitos.....	17
<i>Trabajo de laboratorio</i>	
III.4 Tinción y montaje.....	18
<i>Técnicas moleculares</i>	
III.5 Extracción del DNA.....	18
III.6 Amplificación de ITS's y 5.8S.....	18
III.7 Amplificación de gen mitocondrial <i>Cox1</i>	19
III.8 Reacción de secuenciación.....	20
III.9 Alineamientos.....	20
III.10 Análisis filogenéticos.....	21
III.11 Divergencias genéticas.....	22
III.12 Generación de red de genotipos.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1 Distribución de <i>Bothriocephalus acheilognathi</i> en el estado de Durango, México.....	23
IV.2 Variación genética de poblaciones de <i>Bothriocephalus acheilognathi</i> en peces de Durango.....	29
IV.2.1 Análisis de ITS1, 5.8S e ITS2.....	29
IV.2.2 Análisis de <i>Cox1</i>	34
IV.3 Comparación de la variabilidad genética de <i>Bothriocephalus acheilognathi</i> de ejemplares de Durango México con poblaciones de diferentes localidades del mundo.....	40
V. CONCLUSIÓN.....	54
VI. LITERATURA CITADA.....	55
APÉNDICE.....	61
GLOSARIO.....	64

Resumen

Bothriocephalus acheilognathi Yamaguti, 1934 es un céstodo de la familia Bothriocephalidae cuya distribución natural se limitaba a provincias de Asia, particularmente de China, Japón y el río Amur; fue descrito como parásito de *Acheilognathus rhombea* (Cyprinidae) de Japón. En México fue introducido en 1965 al centro piscícola de Tezontepec de Aldama en el estado de Hidalgo, con sus hospederos definitivos: la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*). Actualmente este céstodo se encuentra propagado prácticamente por los cinco continentes, debido a la introducción de algunos ciprínidos en distintos países con fines de cultivo extensivo. Se ha reportado que *B. acheilognathi* afecta la mucosa intestinal de los hospederos a los que parasita causándoles hemorragias y degenerando el tejido muscular, por lo cual los peces infectados pueden llegar a morir.

Como objetivos de este trabajo destacan determinar la distribución de *B. acheilognathi* en dos cuencas hidrológicas (Nazas y Mezquital) del estado de Durango así como determinar la variación genética intraespecífica de individuos de *B. acheilognathi* en diversas especies de peces dulceacuícolas de dichas cuencas hidrológicas, utilizando marcadores ribosomales y mitocondriales. Los marcadores ribosomales son utilizados además para contrastar la variación genética de las poblaciones de Durango con aquellas de una distribución más amplia a nivel mundial.

En el periodo de julio de 2005 a diciembre 2008 se colectaron 1,967 peces dulceacuícolas (31 especies 11 familias) en 46 localidades de las cuencas hidrológicas de los ríos Nazas y Mezquital en el estado de Durango. Se encontró que *B. acheilognathi* parasita a 21 de las 31 especies colectadas, y a nueve de las 11 familias analizadas, lo cual deja de manifiesto la baja especificidad hospedatoria del parásito. De estas 21 especies, ocho pertenecen a la familia Cyprinidae, lo cual sugiere un cierto grado de preferencia del parásito hacia esta familia. *Bothriocephalus acheilognathi* estuvo presente en 28 de las 46 localidades muestreadas, (es decir 61%) lo que habla de su amplia distribución.

El análisis de variación genética de poblaciones de *Bothriocephalus acheilognathi* en peces de Durango reveló que la divergencia intraespecífica del ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S para 28 secuencias es muy baja, entre 0 y 1.29%. La variación entre las secuencias de *B. acheilognathi* y *B.*

claviceps, designado como grupo externo, osciló entre 17.4 y 18.4%. De igual forma las 18 secuencias producidas para el gen mitocondrial *Cox1* mostró una variación nula, a excepción de un ejemplar perteneciente al hospedero *Gila conspersa* de la localidad Río Covadonga, la cual fue de 1.22%, y con respecto a *B. cuspidatus* varió de 16.71 a 17.02%. Los análisis filogenéticos basados en máxima parsimonia y máxima verosimilitud tanto para las 28 secuencias de los ITS's como las 18 del gen mitocondrial *Cox1*, no muestran la formación de grupos, ya sea por afinidad con un grupo de hospederos o bien, con una cuenca hidrológica o incluso con alguna localidad particular.

En este trabajo se discute la baja variación genética de *B. acheilognathi* en peces dulceacuícolas de Durango como resultado de su relativamente reciente introducción, y se contrasta brevemente este resultado con el de otras especies invasoras que experimentan cambios genéticos rápidos al ser introducidas a nuevos ambientes, mismos que colonizan exitosamente.

I. Introducción

I.1 Características generales de *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934.

Bothriocephalus acheilognathi es un céstodo de la familia Botriocephalidae, parásito del intestino de peces dulceacuícolas. Fue descrito originalmente por Yamaguti en 1934 del intestino de *Acheilognathus rhombea* (Cyprinidae) de Japón. La distribución natural de este céstodo incluye provincias de Asia, particularmente de China, Japón y el río Amur en su trayecto al Mar de Ojotsk en Rusia. De acuerdo con su distribución natural se considera que *B. acheilognathi* es un parásito de ciprínidos y se le encuentra frecuentemente en la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Salgado-Maldonado *et al.*, 1986). Actualmente este céstodo se encuentra propagado prácticamente por los cinco continentes, debido a la introducción de algunos ciprínidos en distintos países con fines de cultivo extensivo. Cabe destacar que en México *B. acheilognathi* parasita no solo especies de hospederos con las que fueron introducidos, sino también a especies de peces nativos (Salgado-Maldonado, 2006; Rojas-Sánchez y García-Prieto, 2008; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2009; Pérez-Ponde de León *et al.*, 2010).

I.2 Patogenicidad

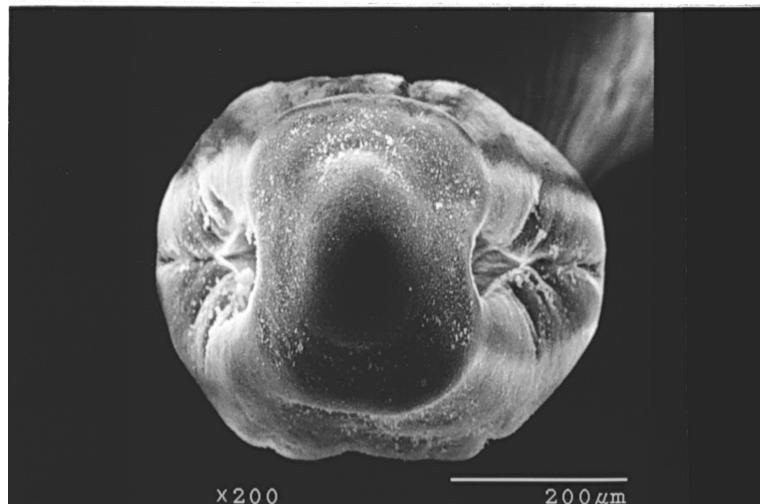
El céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* puede causar varios problemas en peces de tamaño pequeño y provocar la muerte masiva de peces en centros piscícolas. (Salgado-Maldonado y Pineda-López, 2003). Se ha observado que este parásito afecta la mucosa intestinal de los hospederos a los que parasita causándoles hemorragias y degenerando el tejido muscular. Cuando la infección se prolonga, la mucosa intestinal se destruye cada vez más, por lo cual los peces infectados pueden llegar a morir. Se ha encontrado evidencia de que el parásito excreta una toxina que intoxica los órganos de los hospederos produciendo un proceso de degeneración en varios órganos parenquimatosos (Schäperclaus *et al.*, 1991).

I.3 Caracterización morfológica de *Bothriocephalus acheilognathi* (Tomada de López-Jiménez, 1980)

Este céstodo se caracteriza por poseer un escólex en forma de corazón visto lateralmente (Fig. 1-A). Presenta dos botrios, uno dorsal y uno ventral (Fig. 1-B). La segmentación comienza después del escólex (López-Jiménez, 1980). Los segmentos inmaduros son de menor tamaño que los segmentos grávidos.



A)



B)

Fig. 1. (A) Microfotografía electrónica de barrido que muestra el escólex en forma de corazón de un individuo inmaduro de *B. acheilognathi*. (B) Acercamiento frontal del escólex mostrando los botrios característicos de la familia Bothriocephalidae. Fotos: M. en C. Berenit Mendoza Garfias.

Aparato reproductor femenino: Representado por un ovario alargado, situado en la línea media cerca del margen posterior del segmento en el parénquima medular. Consiste de dos lóbulos dorsolaterales y un istmo del cual parte el oviducto sobre el lado dorsal. El oviducto se amplia dando una apariencia globosa en la unión con la vagina, pero después vuelve a estrecharse y se dirige hacia adelante haciendo una ligera curvatura hasta unirse al reservorio vitelino. Esta región comprendida entre las uniones de la vagina y el reservorio vitelino, es llamada por algunos autores canal de fertilización. Un poco más adelante de la unión del oviducto y el reservorio vitelino parte el conducto uterino. en cuya región inicial se encuentra el ootipo, en el cual desemboca la glándula de Mehlis. La vagina es un poco contorneada y desemboca en el atrio genital enfrente de la bolsa del cirro. El conducto uterino, situado en la línea media es muy sinuoso y ancho, desemboca en el saco uterino muscular, el cual se comunica con el orificio uterino que se abre en línea media de la superficie ventral cerca del borde anterior del segmento.

Aparato reproductor masculino: Representado por testículos en número de 62 a 76 por proglótido, pequeños y esféricos. Son relativamente más grandes que los folículos vitelinos. Están distribuidos en el parénquima mediar ocupando los campos laterales del segmento. El conducto deferente está muy plegado, se encuentra situado ventrolateralmente al extremo proximal de la bolsa del cirro, opuesto al conducto uterino. La bolsa del cirro es muscular y piriforme, está situada en la línea media o desplazada ligeramente a la derecha o a la izquierda de cada segmento, oblicuamente y en dirección opuesta al conducto uterino. Ocupa la porción ecuatorial o postecuatorial, posterior al saco uterino. Desemboca al poro genital. Dentro de la bolsa del cirro el conducto eyaculador es muy contorneado, haciéndose casi recto a medida que se acerca al cirro. El cirro es de forma cilíndrica, de doble pared, algo ensanchado en su porción inicial y en su porción final es redondeado. Está situado en el último tercio de la bolsa del cirro. En corte transversal. El orificio genital está situado en la mayoría sobre la línea media del cuerpo o ligeramente desplazado a un lado, en dirección opuesta al conducto uterino. Se abre en la superficie dorsal.

Las glándulas vitelógenas, de naturaleza folicular, son muy numerosas, esféricas o ligeramente ovals, se localizan en el parénquima cortical, ocupando los campos laterales del segmento. De cada folículo vitelino salen pequeños canales que se unen a dos conductos situados en la región dorsal, uno a la derecha y otro a la izquierda de cada segmento. Los dos conductos se unen en la línea media,

dorsalmente el oviducto y forman el reservorio vitelino el cual es alargado y amplio, estrechándose en la unión con la parte inicial del útero.

Los huevos son ovales, de cáscara delgada, operculados, aunque el opérculo no es notorio sino hasta que ha salido el coracidio; presentan diversos grados de desarrollo del embrión y sólo en algunos huevos se observa la larva con los ganchos.

El aparato excretor está representado por dos conductos longitudinales principales que se localizan en el parénquima medular en las partes laterales de cada segmento.

I.4 Información Taxonómica

Bothriocephalus acheilognathi Yamaguti, 1934 se encuentra ubicado en el género *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808, este género incluye aproximadamente 70 especies que parasitan mayoritariamente intestinos de peces marinos, si bien se han registrado algunas especies de peces de agua dulce y unas pocas de anfibios; está clasificado en la familia Bothriocephalidae Blanchard, 1849, en el orden Pseudophyllidea y la clase Cestoda (Skerikova *et al.*, 2004).

Dominio: Eukaryota

Reino: Metazoa

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Pseudophyllidea

Familia: Bothriocephalidae Blanchard, 1849

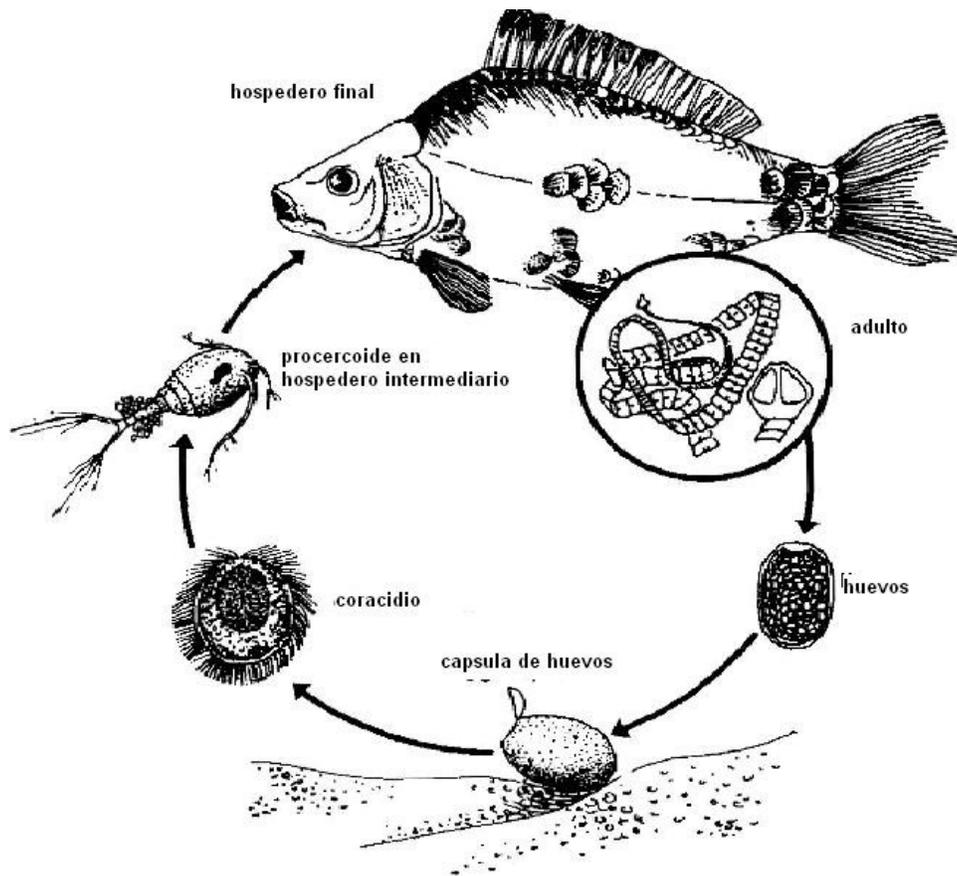
Género: *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808

Especie: *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934

I.5 Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Bothriocephalus acheilognathi* involucra dos hospederos, uno definitivo que es el pez y uno intermediario, un crustáceo (Fig. 2). Los huevos son producidos dentro del huésped definitivo y son expulsados al ambiente junto con las heces. Posteriormente a su expulsión son

incubados y de este huevo emerge la larva **coracidio** que es ingerida por el copépodo, en el hemocele del copépodo la larva coracidio desarrolla a **procercoide**. Cuando el hospedero definitivo come a un copépodo infectado, el procercoide, desarrolla primero a un estado **plerocercoide** en el intestino del pez y si los estímulos son apropiados desarrolla posteriormente a un adulto (Bush *et al.*, 2001).



Ciclo de vida de *Bothriocephalus acheilognathi*

Fig. 2. Ciclo de Vida de *Bothriocephalus acheilognathi*. Tomado de Schäperclaus *et al.*, (1991)

I.6 Especificidad hospedatoria

La especificidad hospedatoria es una característica fundamental de los parásitos (Poulin y Keeney, 2008). Existen dos factores que la determinan, por un lado ecológicos y por otro filogenéticos (Rosas-Valdez, 2008). La especificidad hospedatoria es la capacidad del parásito de especializarse por los

recursos que le provee un hospedero, ya sea el hábitat, nutrientes y otros recursos que el parásito necesita para llevar a cabo su ciclo de vida. La especificidad aumenta en tanto el número de taxa que el parásito infecta disminuye (Leung y Poulin, 2010). Los parásitos con una alta especificidad presentan una única especie de hospedero mientras los parásitos generalistas pueden sobrevivir a pesar de la extinción de un hospedero ya que explotan hospederos alternativos, es decir, muestra que tan hábil es el parásito para colonizar nuevos hospederos (Poulin y Keeney, 2008).

El céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* representa un parásito generalista, ya que los peces que parasita se encuentran en diferentes familias; tan solo en México, el céstodo se encuentra parasitando a peces de las familias: Catostomidae, Characidae, Goodeidae, Centrarchidae, Cichlidae, Cyprinodontidae, Atherinopsidae, Poecilidae y Cyprinidae. En peces pertenecientes a las tres últimas, la infección es más frecuente (ver inciso I.8 Distribución actual en México pág. 9).

I.7 *Bothriocephalus acheilognathi* como especie invasora.

Bothriocephalus acheilognathi fue introducido a México en el año 1965 al centro piscícola de Tezontepec de Aldama en el estado de Hidalgo junto con su hospedero definitivo: la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) procedente de China y con ellos el problema de la botriocéfalo-sis (López-Jiménez, 1980). Esta parasitosis ha llegado a afectar poblaciones de peces endémicos mexicanos ya que es necesario señalar que *B. acheilognathi* se ha dispersado indiscriminadamente por todo el país debido a las distintas introducciones de sus hospederos definitivos (Rojas-Sánchez y García-Prieto, 2008; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2009; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2010). La dispersión del hospedero definitivo en centros de cultivo fomentan el crecimiento de la enfermedad (Salgado-Maldonado y Pineda-López, 2003) actuando éstos como reservorio del parásito.

No sólo la introducción de carpas favorece la dispersión, sino también el traslado de peces nativos que han sido infectados con el parásito como es el caso del pescado blanco (*Chirostoma estor*) (Salgado-Maldonado y Pineda-López, 2003). Desde la introducción de *B. acheilognathi* hasta el día de hoy ya hay una gran cantidad de especies de hospederos con al menos 72 especies en 8 familias sólo en México (Rojas-Sánchez y García-Prieto, 2008) que albergan este parásito en distintas localidades del territorio mexicano. Esta amplia distribución es debida a distintos factores, entre ellos la baja

especificidad hospedatoria, las características ambientales favorables, la presencia de hospederos definitivos e intermediarios aptos. Todos estos factores han hecho de este helminto una especie común de encontrar en los cuerpos de agua tanto del norte, centro y sur de México (García-Prieto y Osorio-Sarabia, 1991).

Cabe señalar que la presencia de parásitos altamente patógenos representa un peligro para la biodiversidad en general y para la preservación de la diversidad genética (Brooks *et al.*, 2001), ya que la pérdida de biodiversidad no debe verse solo en el contexto del deterioro ambiental, sino también en la crisis de enfermedades parasitarias producidas por el traslado especies exóticas que afectan tanto a humanos, ganado, cultivos y animales silvestres (Brooks y Hoberg, 2006).

I.8 Distribución actual de *Bothriocephalus acheilognathi* en México.

Rojas-Sánchez y García-Prieto (2008) actualizaron la distribución de *B. acheilognathi* en México y señalan que este céstodo se encuentra parasitando a 72 especies de hospederos pertenecientes a ocho familias en 102 localidades distribuidas en 19 estados y el Distrito Federal (Tabla 1).

El estado de Michoacán cuenta con un mayor número de especies de hospederos infectados registrados a la fecha y reportados en diferentes trabajos como artículos, tesis, tesinas y bases de datos electrónicas. En este mismo estado, en el lago de Pátzcuaro, el céstodo *B. acheilognathi* parasita además a un anfibio, el ajolote *Ambystoma dumerilli* y un reptil, la culebra de agua dulce, *Thamnophis melanogaster* ambos casos considerados huéspedes accidentales (García-Prieto y Osorio-Sarabia, 1991).

Rojas-Sánchez y García-Prieto (2008) señalan que la familia Cyprinidae es aquella con el mayor número de especies parasitadas (16 especies), seguida de Atherinopsidae y Poecilidae (15 especies) (Tabla 2). En términos del número de localidades, las especies de peces de la familia Cyprinidae son también aquellas que se distribuyen más ampliamente en la República Mexicana, pues el céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* se ha registrado en ciprínidos de 43 localidades.

Tabla 1. Número de registros y localidades de los estados de la República Mexicana donde se distribuye *Bothriocephalus acheilognathi*

Estado	Número de registros	Número de spp. infectadas	Número de localidades
Michoacán	46	29	11
Guanajuato	43	15	16
Hidalgo	34	18	10
Estado de México	29	9	18
Querétaro	22	10	13
Jalisco	11	7	6
Morelos	6	4	5
Puebla	5	4	5
Tlaxcala	3	3	1
Oaxaca	3	3	2
D. F., Guerrero, S. L. P., Tabasco y Yucatán	2	2	2
Coahuila, Nayarit , Campeche, Chiapas y Durango	1	1	1

Modificado de Rojas-Sánchez y García-Prieto, 2008.

Tabla 2. Familias de peces dulceacuícolas con mayor número de especies registradas con *Bothriocephalus acheilognathi*.

Familias	Numero Localidades registradas	Especies Infectadas	Especies con mayor número de registros	Localidades en las que se reporta dicha especie
Atherinopsidae	30	15	<i>Chirostoma jordani</i>	12
Cichlidae	16	8	<i>Herichthys labridens</i>	3
Cyprinidae	43	16	<i>Cyprinus carpio</i>	22
Goodeidae	35	12	<i>Xenotoca variata</i> y <i>Girardinichthys multiradiatus</i>	13
Poeciliidae	26	15	<i>Poecilia mexicana</i>	5

Modificado de Rojas-Sánchez y García-Prieto, 2008

Las familias de peces cuyas especies se encuentran infectadas con *B. acheilognathi* en un menor número son: Centrarchidae (*Micropterus salmoides*) en tres localidades y Characidae (*Astyanax fasciatus* y *Astyanax mexicanus*) en cuatro localidades (Salgado-Maldonado, 2006). En la familia Profundulidae la especie *Profundulus hildebrandi*, endémica de la sierra de San Cristóbal en Chiapas, ha sido reportada por Velázquez-Velázquez *et al.*, (2008) como hospedero de *B. acheilognathi* (Tabla 3).

Tabla 3. Familias de peces con menor número de especies registradas con *Bothriocephalus acheilognathi*.

Familias	Número Localidades registradas	Especies infectadas	Especie con mayor número de registros	Localidades en las que se reporta dicha especie.
Centrarchidae	1	1	<i>Micropterus salmoides</i>	3*
Characidae	4	2	<i>Astyanax fasciatus</i> y <i>Astyanax mexicanus</i>	4*
Profundulidae	1	1	<i>Profundulus hildebrandi</i>	1**

*Salgado-Maldonado, 2006 ** Velázquez-Velázquez *et al.*, 2008

Por último, la carpa común, *Cyprinus carpio*, es la especie de hospedero más ampliamente distribuida (mayor número de localidades) donde se ha reportado la presencia de este parásito resultado de su continua introducción a diferentes cuerpos de agua con fines acuaculturales (Salgado-Maldonado y Pineda-López, 2003).

I.9 Variación genética

En los últimos 60 años ha ocurrido un enorme progreso en los avances tecnológicos para secuenciar DNA a la par de una enorme capacidad de cómputo que nos ha permitido resolver problemas como las relaciones filogenéticas de grandes grupos de organismos (Futuyma, 2003). Estas técnicas han ayudado a definir relaciones entre organismos con más claridad. Se han utilizado marcadores genéticos cuyo potencial se ha demostrado en el análisis para limitar especies, aunque también algunos estudios han aportado importante información en el área del conocimiento sobre el origen y evolución de los organismos así como en estudios de variabilidad genética (Razo-Mendivil, 1998, 2004; Olson y Tkach, 2005). En la actualidad se reconoce que la llamada taxonomía basada en DNA es una herramienta

fundamental en el establecimiento del inventario de la diversidad de helmintos en peces de agua dulce (Pérez-Ponce de León y Choudhury, 2010). En este sentido, los marcadores genéticos han facilitado la comparación entre especies y poblaciones.

I.9.1 Organización de genes ribosomales.

Existen relativamente pocos caracteres morfológicos homólogos que pueden ser comparados entre todos los organismos. En contraste, un número de genes con funciones bioquímicas fundamentales se encuentran en todos los organismos y ellos pueden ser secuenciados, alineados y analizados para estudiar las relaciones filogenéticas de manera más profunda. Con base en los análisis hechos con DNA ribosomal se ha demostrado la capacidad de inferir a partir de sus resultados, historias filogenéticas, así como las relaciones entre especies cercanamente emparentadas ya que las diferentes regiones de las unidades repetidas evolucionan a tasas muy diferentes (Hillis y Dixon, 1991)

El DNA ribosomal de un organismo Eucariota está constituido por una región no traducida pero transcrita: los espaciadores internos 1 y 2 (Internal Transcribed Spacer 1 y 2) y el espaciador externo transcrito (External Transcribed Spacer), y por los genes 18S, 5.8S y 28S que forman la unidad transcrita y codificadora. Tanto espaciadores como genes se encuentran conformados por copias repetidas en cadena (Hillis y Dixon, 1991; Razo-Mendivil, 1998, 2004) (Fig. 3).

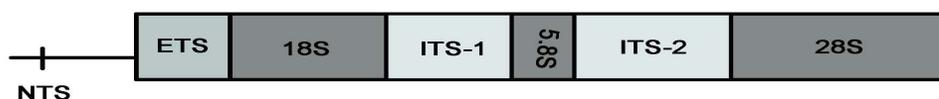


Fig. 3 Organización de los genes ribosomales y los espaciadores internos. Modificado de Hillis y Dixon, 1991.

I.9.2 Genes mitocondriales

Hay varias características que hacen del DNA mitocondrial una buena herramienta de trabajo en la inferencia filogenética. Es una molécula circular covalentemente cerrada de 13 a 20 Kb, formada por 37 genes, 13 RNA mensajeros, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia además de una región

Para el céstodo *B. acheilognathi* se han realizado algunos estudios utilizando los espaciadores internos (ITS1 e ITS2) (Luo *et al.*, 2002). Estos autores analizaron la variación molecular de *B. acheilognathi* en diferentes especies de hospederos de 27 localidades situadas en seis países; La mayor parte de los hospederos considerados en este estudio provinieron de distintas localidades de China (20), República Checa (1), Australia (1), Inglaterra (1), Hawaii (3) y Japón (1). Los autores analizaron la variabilidad de los ITS's por separado, dado que los ITS's se encuentran en regiones separadas en el DNA ribosomal y pueden tener diferentes tasas de evolución. Los resultados obtenidos mostraron mayor variabilidad en el ITS2 (de 0 a 6.6%) en comparación al ITS1 que fue más baja (de 0.07 a 0.09%) (Luo *et al.*, 2002). Asimismo, el análisis filogenético realizado por estos autores reveló que las poblaciones de *Bothriocephalus acheilognathi* consistieron de tres genotipos cercanamente relacionados y con un cierto grado de especificidad hospedatoria.

Con base en todo lo anterior, se reconoce el gran éxito que *B. acheilognathi* ha tenido como especie invasora en México, pues a 45 años de su introducción ha sido capaz de parasitar no sólo a la fauna ictiológica introducida, sino también a la endémica. Este trabajo se inserta precisamente dentro del contexto de la evaluación de una especie invasora con importancia, al aportar datos sobre su caracterización genética, siendo los primeros que se aportan para esta especie en nuestro país.

II. Objetivos

De acuerdo con lo anterior nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Caracterizar genéticamente a las poblaciones de *Bothriocephalus acheilognathi* en diversas especies de peces dulceacuícolas en dos cuencas hidrológicas (Nazas y Mezquital) del estado de Durango, utilizando marcadores ribosomales y mitocondriales.

Objetivos particulares:

Registrar la presencia del céstodo *B. acheilognathi* en el intestino de peces dulceacuícolas nativos e introducidos en distintas localidades de las cuencas de los ríos Nazas y Mezquital en el estado de Durango.

Determinar la variación genética de individuos representantes de distintas poblaciones utilizando los espaciadores internos ITS1 e ITS2, el gen ribosomal 5.8S y el gen mitocondrial *Cox1*.

Comparar la variabilidad genética de los marcadores ribosomales entre los individuos de *B. acheilognathi* del presente estudio y aquellos obtenidos del trabajo de Luo *et al.*, (2002) (Genbank).

III. Material y Métodos.

Trabajo de campo

III.1 Zona de estudio

El Río Nazas es un cuenca endorreica localizada en el norte de México en el estado de Durango y no presenta conexión con otros ríos del centro de México se extiende a lo largo de los estados de Coahuila y Durango. Tiene 560 Km de longitud aunque también se encuentra irrigando una área de 71, 906 Km² en la mitad del desierto de Coahuila y el estado de Durango. La cuenca del Nazas es nutrida por distintos ríos: San Juan, Ramos, Potreritos, del Oro, Nazas, Santiago, Tepehuanes y Peñón Blanco. La cuenca comienza en la Sierra madre Occidental y desemboca en la laguna del Mayran, actualmente seca, en el estado de Coahuila (Fig. 5) (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2010).

La cuenca alta del Mezquital recibe afluentes de los ríos Poanas, Suchel y Tunal, cercanos a la ciudad de Durango. Pero también del río Toboso, Guadalupe Aguilera, Amado Nervo y los Berros. La cuenca del Mezquital es el único río que se origina al oriente y cruza la sierra madre occidental, donde se transforma en el río San Pedro para desembocar en el océano Pacífico en el estado de Nayarit. Se cree que la cuenca alta del río mezquital en el pasado fluía en dirección al río Bravo al Norte de México (Río Grande en Estados Unidos) (Fig. 5) (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2009).

III.2 Recolecta de peces y análisis helmintológico.

Entre julio de 2005 y diciembre de 2008, se colectaron 1,967 peces dulceacuícolas pertenecientes a 31 especies contenidas en 11 familias de 46 localidades de las cuencas hidrológicas del río Nazas y la zona alta del Río Mezquital en el estado de Durango.

Para obtener las muestras, se utilizaron distintos artes de pesca, entre ellos electropesca, la red tipo chinchorro y la red de cuchara. Los peces fueron capturados y trasportados vivos a la estación de trabajo. Se identificó el hospedero hasta especie con la ayuda de claves especializadas y se sacrificaron los peces perforando la parte posterior del cráneo. Posteriormente se realizó una incisión desde el poro genital hasta la región del opérculo para posteriormente obtener las vísceras y colocarlas en una caja

Petri con suero fisiológico al 0.65%, separando órgano por órgano. El análisis de cada órgano se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico. La observación de cada órgano primero se realizó externamente y después de forma interna. Este estudio se basa en la observación del intestino en particular, que es el hábitat en el que se encuentra el céstodo *Bothriocephalus acheilognathi*. Las técnicas de tinción en detalles son presentadas en el Apéndice de este trabajo.

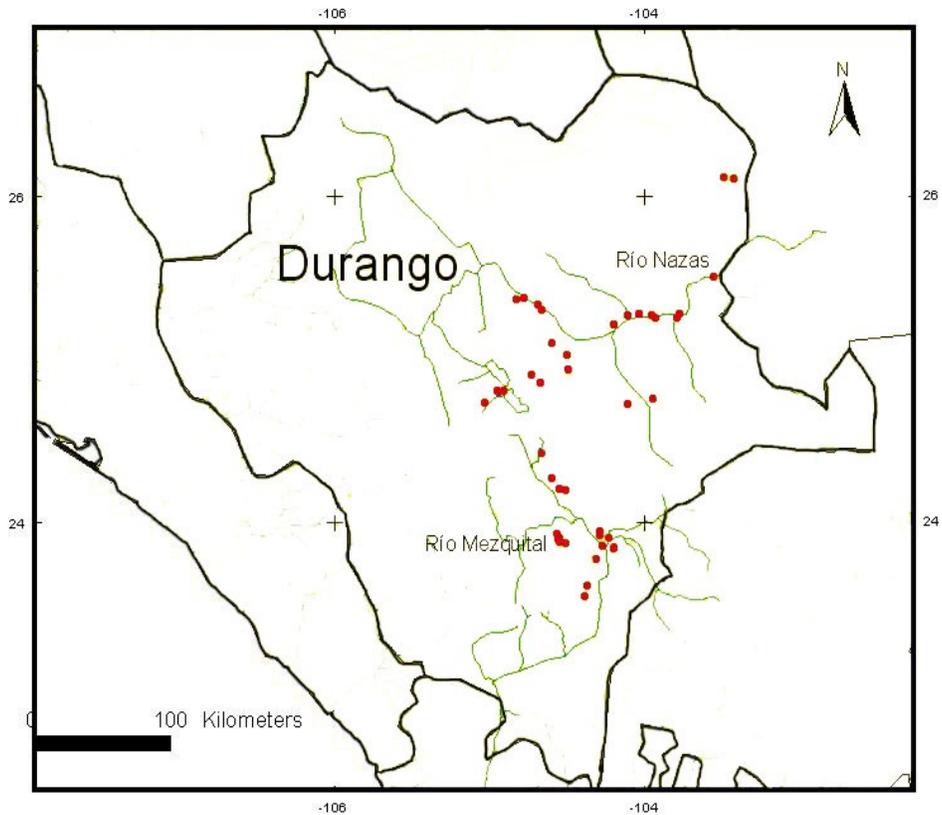


Fig. 5. Mapa de localidades de colecta de hospederos infectados con *B. acheilognathi* en la cuenca del río Nazas y el río Mezquital.

III.3 Fijación de parásitos

Los parásitos fueron fijados con las técnicas convencionales, mismas que incluyeron formol al 10% para el estudio morfológico y alcohol absoluto, para el estudio molecular.

III.4 Tinción y montaje

Los ejemplares fijados en formol al 10% fueron primeramente lavados con alcohol al 70% y se tiñeron utilizando Paracarmin de Meyer. Los ejemplares se montaron en preparaciones permanentes con balsamo de Canadá y todos los ejemplares recolectados fueron depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) (Ver Tabla.5). Para mayor detalle de la técnica de tinción referirse al Apéndice de este trabajo.

Técnicas moleculares

Se obtuvieron secuencias de *Bothriocephalus acheilognathi* de 26 individuos colectados en 16 localidades del estado de Durango, además de 2 individuos colectados en la Cantera Oriente ubicada en la reserva del Pedregal de San Ángel, en Ciudad Universitaria, sumando un total 28 individuos. Los marcadores moleculares que se usaron en este trabajo son los espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2 por sus siglas en inglés), el gen ribosomal 5.8S y el gen mitocondrial *Cox1*.

III.5 Extracción del DNA.

Ejemplares adultos e inmaduros (una porción de 0.5cm aproximadamente) de *Bothriocephalus acheilognathi* fueron digeridos individualmente en una solución estándar de extracción. Dicha solución se incubó en un thermoblock por 24 horas a 50°C. La extracción se realizó con la técnica de fenol-cloroformo (Hillis *et al.*, 1996)(ver apéndice para detalles).

III.6 Amplificación de ITS1, 5.8S e ITS2.

Para la reacción en cadena la polimerasa (PCR) de los espaciadores internos de transcripción y el gen ribosomal 5.8S se usaron los siguientes primers (Fig. 6).

BD1: 5' GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA 3' (Forward)

BOTF1: 5' ACG CTG CAT TCC CTA GAC AAA CGT 3' (Forward)

BOTF2: 5' TGC CCT GCC CTG TCA ACG CAT AGC 3' (Forward)

BD2: 5' TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT 3' (Reverse)



Fig. 6. Diagrama que muestra la ubicación de los primers en los ITS's y los genes 18S y 28S.

Para la obtención de las secuencias fueron diseñados los primers BOTF1 y BOTF2 (Dr. Rogelio Rosas Valdez), los cuales mostraron tener una gran eficacia, secuenciando así alrededor de 600 y 650 pares de bases abarcando parte del ITS1, del gen ribosomal 5.8S y el ITS2.

La reacción de PCR para los ITS's y el gen ribosomal 5.8S se realizó bajo las siguientes características: 94°C por cinco minutos para la primera desnaturalización 94°C por 30 segundos para la siguiente. El alineamiento se llevó a cabo en 56°C por 30 segundos para todos los primers, posteriormente la extensión de 72°C por un minuto seguida por una extensión final de 72°C por cinco minutos, la reacción estuvo sujeta a 30 ciclos, las muestras se mantuvieron a 4°C (Luo *et al.*, 2002).

III.7 Amplificación de gen mitocondrial *Cox1*

Para el gen mitocondrial *Cox1* las características fueron primera desnaturalización 94°C por cinco minutos la siguiente fue de 94°C 30 segundos, el alineamiento consistió en 47°C para algunas muestras y 50°C para otras por 30 segundos, la primera extensión se llevo a cabo a 72°C por un minuto 30 segundos y la extensión final fue de 72°C por un minuto. La reacción se realizó 35 ciclos y permaneció a 4°C. Los primers usados tanto para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como la reacción de secuencia fueron los siguientes:

COI-F: 5' TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT 3' (Forward)

COI-R: 5' TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG 3' (Reverse)

Los volúmenes de reactivos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa tanto para los ITS's y el gen ribosomal 5.8S como para el gen mitocondrial *Cox1* se muestran en el apéndice de este trabajo.

III.8 Reacción de secuenciación

Se realizó una valoración de la cantidad del DNA contenido en el producto de PCR ya purificado a partir de un gel de agarosa, la cantidad de agua igualmente dependió de la cantidad de DNA aforando la reacción a 10 µl, para todos los primers utilizados en este trabajo (ver Apéndice para detalles).

El programa para la reacción de secuenciación de los ITS's y el gen 5.8S se basó en la primera desnaturalización a 94°C por 2 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C durante 120 segundos. Posteriormente, el alineamiento se llevo a cabo a 56°C por 15 segundos para los primers BD1, BD2, BOTF1 y BOTF2. La extensión en 60°C por 4 minutos y la extensión final en 60°C por 5 minutos para finalmente mantenerse la reacción a 4°C en oscuridad. Mientras para el gen mitocondrial *Cox1* el programa a seguir fue para la primera desnaturalización 94°C por 5 minutos, la siguiente desnaturalización fue a 92°C por 30 segundos y 30 ciclos, las temperaturas de alineamiento estuvieron entre los 47 y 50°C, la primera extensión consistió en 60°C por 4 minutos seguida de la extensión final a 60°C por 5 minutos. Por último el producto de estas reacciones fue purificado, secado y permaneció a 4°C en oscuridad hasta llevarse a cabo el procedimiento para la obtención de los cromatogramas y las secuencias. Los purificados fueron secuenciados en un secuenciador Applied Biosystems 3100 de 16 capilares. Las secuencias fueron editadas en el programa BIOEDIT.

III.9 Alineamientos

En este trabajo se generaron tres alineamientos. El primero corresponde a los marcadores ribosomales para 29 secuencias, una de las cuales representa a *B. claviceps* que fue utilizado como grupo externo, ya que son las únicas secuencias con las que se contaban para estos marcadores en el Genbank además, Skerikova *et al.* (2004) en un análisis del género reporta a *B. claviceps* agrupado dentro del mismo clado que *B. acheilognathi*. El alineamiento total constó de 1342 pares de bases.

La segunda matriz consistió de 19 secuencias del marcador mitocondrial *Cox1* una de las cuales pertenece a la especie *B. cuspidatus* que fue utilizada como grupo externo. En total este último alineamiento fue de 329 pares de bases. El último alineamiento consistió de los datos obtenidos de los genes ribosomales en este trabajo y aquellos obtenidos del trabajo de Luo *et al.*, (2002). Este consistió de 54 secuencias de *B. acheilognathi* y la secuencia de *B. claviceps* como grupo externo. En total el alineamiento consistió de 1420 pares de bases.

Los alineamientos de las secuencias fueron realizados en el programa ClustalW con las opciones dadas por default (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el programa BIOEDIT (Hall, 1999) y corregido a mano.

III.10 Análisis filogenéticos

Se llevaron a cabo los análisis bajo el criterio de Parsimonia y bajo el criterio de máxima verosimilitud (ML) en el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002).

Los tres alineamientos fueron analizados con el criterio de Parsimonia (MP) a través de una búsqueda heurística con las opciones de stepwise addition y el algoritmo TBR con 100 réplicas al azar. Para el alineamiento se utilizó la opción de guardar 10 000 árboles, mientras que para el alineamiento dos se utilizó la opción por default y para el alineamiento tres sólo se guardaron 1000 árboles. En los tres casos el apoyo de las ramas a través del método de Bootstrap consideró 1000 réplicas.

De igual manera los tres alineamientos fueron analizados por medio de máxima verosimilitud (ML) realizándose una búsqueda del mejor modelo de evolución que se adecuara a los datos a través del programa jModelTest (Posada, 2008), eligiendo el criterio de akaique y dejando las opciones por default. Para los alineamientos 1 y 3 el modelo resultante fue GTR+G, mientras que para el alineamiento 2 (*Cox1*), éste fue F81. Se realizó una búsqueda heurística con el algoritmo TBR con 100 réplicas al azar y el apoyo de las ramas consideró 1000 réplicas de bootstrap.

III.11 Divergencias genéticas

Para estimar las divergencias genéticas de los tres alineamientos considerados en este trabajo se implementó en PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002) el cálculo de las distancias “p” no corregidas (pairwise difference). De esta manera se construyeron tres matrices en donde se compara la distancia existente entre los individuos secuenciados, 29 para el alineamiento uno, 19 para el alineamiento dos y finalmente 55 para el alineamiento tres.

III.12 Generación de la red de genotipos

Se obtuvo una red de genotipos usando el programa TCS (Clement *et al.*, (2000) generada de 54 secuencias de *B. acheilognathi* basadas en ITS's (28 pertenecientes a localidades de Durango y 26 a diferentes partes del mundo, Tabla 6 y 9). La red se generó con una confiabilidad del 95% no tomando en cuenta Gap's.

IV. Resultados y Discusión.

Los resultados de este estudio se presentan en tres partes, la primera se refiere al registro de *Bothriocephalus acheilognathi* en peces de las cuencas de los ríos Mezquital y Nazas en el estado de Durango. La segunda incluye los resultados del análisis de la variación genética de las poblaciones de Durango empleando dos marcadores moleculares. La última parte incorpora la comparación de la variación genética entre las poblaciones de Durango y aquellas de peces dulceacuícolas de otras partes del mundo obtenidas del GenBank, considerando únicamente genes ribosomales.

IV.1. Distribución de *Bothriocephalus acheilognathi* en el estado de Durango, México

De los 1967 peces analizados en busca de *B. acheilognathi*, 188 estuvieron infectados, lo que refleja una incidencia general del 9.5%. De las 31 especies de peces estudiadas en dos cuencas hidrológicas en el estado de Durango, en 21 se registró la presencia del céstodo. La baja especificidad hospedatoria de *B. acheilognathi* también se refleja a nivel de familia de hospedero pues el céstodo se encontró parasitando a especies de nueve de las 11 familias analizadas. Los ciprínidos son el grupo principalmente parasitado por *B. acheilognathi*, pues 8 de las 21 especies infectadas pertenecen a esta familia de hospedero, estando varias de ellas parasitadas tanto en la cuenca del Río Mezquital como en la del Río Nazas (Tabla 4).

Otro aspecto que se observa en la Tabla 4 es que el céstodo parasita a numerosas especies de peces endémicos, además de dos especies de peces introducidos, tales como la tilapia *Oreochromis nilotica* y la carpa común, *Cyprinus carpio* (uno de los principales hospederos del parásito). Únicamente tres especies de peces, particularmente ciprínidos, se encontraron parasitados con *B. acheilognathi* en ambas cuencas hidrológicas donde se realizaron los muestreos, éstas son: *Campostoma ornatum*, *Codoma ornata* y *Gila conspersa* debido a que éstas especies se encuentran presentes en ambas cuencas y son igualmente susceptibles a parasitarse por este céstodo.

Tabla. 4. Registro de *Bothriocephalus acheilognathi* en peces dulceacuícolas de dos cuencas hidrológicas del estado de Durango.

	Cuenca San Pedro Mezquital	Cuenca Nazas
Atherinopsidae		
<i>Chirostoma mezquital</i> **	X	
Catostomidae		
<i>Catostomus nebuliferus</i> *	X	
Centrarchidae		
<i>Lepomis machrochirus</i>		X
Characidae		
<i>Astyanax mexicanus</i>		X
Cichlidae		
<i>Oreochromis nilotica</i> ^	X	
Cyprinidae		
<i>Campostoma ornatum</i>	X	X
<i>Codoma ornata</i> *	X	X
<i>Cyprinella garmani</i> *		X
<i>Cyprinus carpio</i> ^		X
<i>Gila conspersa</i> *	X	X
<i>Notropis nazas</i> **		X
<i>Notropis chihuahua</i>		X
<i>Pimephales promelas</i>		X
Cyprinodontidae		
<i>Cyprinodon nazas</i> **		X
Goodeidae		
<i>Characodon audax</i> **	X	
<i>Characodon lateralis</i> **	X	
Poeciliidae		
<i>Gambusia senilis</i>	X	
<i>Poecilopsis gracilis</i> *		X
<i>Xiphophorus hellerei</i>	X	

* Especies endémicas de México. ** Especies endémicas de las dos cuencas hidrológicas en estudio.

^ Especies introducidas (Miller *et al*, 2009). X Presencia de *Bothriocephalus acheilognathi*.

En términos de la distribución del céstodo en las localidades muestreadas a lo largo de las cuencas de los ríos Nazas y Mezquital, en la Tabla 5 se presenta la información de cada una de las localidades, con los hospederos en donde se recolectó a *B. acheilognathi*.

Esta tabla muestra que el céstodo estuvo presente en 29 de las 46 localidades muestreadas, es decir, en el 61% de éstas y que tiene una amplia distribución en los cuerpos de agua dulce del estado de Durango. El número de hospederos parasitados en cada una de las localidades varía entre 1 y 5, por ejemplo en las localidades de Camino a San Rafael Jicorica, Río Covadonga en el poblado de Peñón Blanco y del Río San Juan en el poblado de “El Cuarto” (correspondientes a la cuenca del Río Nazas), así como en manantial en el poblado 27 de Noviembre (dentro del Río Mezquital) fueron aquellas donde el céstodo se encontró entre cuatro y cinco especies de peces diferentes.

Tabla 5. Distribución del céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* en peces dulceacuícolas de las localidades muestreadas en dos cuencas hidrológicas del estado de Durango.

Cuenca del Río Nazas			
Localidad	Georeferencia	Hospederos	CNHE
Camino a San Rafael Jicorica	25°20'6" N; 104°40'12.4" W	<i>Cyprinella garmani</i>	-----
		<i>Gila conspersa</i>	-----
		<i>Notropis chihuahua</i>	-----
		<i>Pimephales promelas</i>	-----
Canal de Riego, poblado Doloroes Hidalgo	25°15'59.3" N; 104°5'24" W	<i>Notropis chihuahua</i>	6427 6428
El Palmito	25°2'1.6" N; 104°28'40.9" W	<i>Notropis nazas</i>	-----
Poza en el Arroyo Torreones	25°22'19"N; 104°48'34.4"W	<i>Codoma ornata</i>	6433 6449
		<i>Gila conspersa</i>*	6430 6431 6432 6457 6458
		<i>Notropis chihuahua</i>*	6434
Puente Carretera Peñón Blanco-Yerbaniz	24°45'46.7"N; 103°55'47.7"W	<i>Codoma ornata</i>*	6395 6396
		<i>Cyprinella garmani</i>	6514 6341
		<i>Gila conspersa</i> *	6220 6351
Puente Lajas I, poblado de San Juan Francisco Lajas	24°54'46.1" N; 104°42'25" W	<i>Astyanax mexicanus</i>	6439

		<i>Gila conspersa*</i>	6436 6437 6438 6447
Río Covadonga, poblado de Peñón Blanco	24°43'55.8" N; 104°5'23.2" W	<i>Astyanax mexicanus</i>	-----
		<i>Campostoma ornatum*</i>	6352
		<i>Codoma ornata</i>	6394
		<i>Gila conspersa*</i>	6216 6353 6354 6355
		<i>Notropis nazas*</i>	6556 6218 6397
Río Nazas, puente Nazas, poblado de Nazas	25°12'57.2" N; 104°10'31.2" W	<i>Gila conspersa</i>	6426 6454
		<i>Notropis nazas*</i>	6429
		<i>Pimephales promelas*</i>	6425
Río Nazas, puente en carretera Rodeo-Hidalgo de Parral, desviación Abasolo.	25°18'39.4" N; 104°38'19.5" W	<i>Pimephales promelas*</i>	6435
Río San Juan en "El Cuarto"	24°56'20.4"N; 104°28'3.3"W	<i>Astyanax mexicanus</i>	-----
		<i>Campostoma ornatum*</i>	6343/7129
		<i>Codoma ornata*</i>	6349/6350
		<i>Gila conspersa*</i>	6215/6345/6346 6347
		<i>Poecilopsis gracilis*</i>	6348/6455
Presa Francisco Zarco		<i>Cyprinus carpio</i>	6340/6342
Puente Carretera Paso Nacional	25°16'31.6"N; 104°0'57.7" W	<i>Lepomis machrochirus</i>	-----
		<i>Pimephales promelas*</i>	6339/6451
		<i>Cyprinella garmani</i>	
Río Nazas, poblado de Santa Rita	25°15'33.3" N; 103°54'44.2" W	<i>Pimephales promelas</i>	-----
Río Nazas, bomba de agua en Ciudad Lerdo	25°30'34.6" N; 103°32'9.9" W	<i>Astyanax mexicanus</i>	6452
		<i>Cyprinus carpio</i>	6338
Río en el Pueblo Emilio Carranza	25°16'12.6"N; 103°56'9.28"W	<i>Cyprinella garmani</i>	6219
		<i>Notropis Nazas</i>	6217
Cuenca del Río Mezquital			
Localidad	Georeferencia	Hospedero	CNHE
Arroyo en el poblado de Plan de Ayala 1	23°54'41.1"N; 104°31'54.7" W	<i>Gila conspersa</i>	-----
		<i>Codoma ornata</i>	6526
Arroyo en el poblado de Plan de Ayala 2	23°54'41.1"N; 104°32'7.4"W	<i>Gila conspersa*</i>	6446/6409/6410
		<i>Codoma ornata</i>	6408
Arroyo Pino Suárez 2	23°52'12.4" N;	<i>Characodon audax</i>	-----

	104°29'39.3" W		
Charco Azul, Río Guatimape en el ejido "El Molino"	24°44'36.5" N; 105°0'34.4" W	<i>Gila conspersa</i>*	6344 /6448
		<i>Campostoma ornatum</i>	6413/6414
La Barranca, Nombre de Dios	23°54'27.6"N; 104°12'33.3" W	<i>Catostomus nebuliferus</i>	-----
		<i>Gila conspersa</i>	-----
Manantial en el pueblo 27 de Noviembre	24°12'16.5" N; 104°29'38" W	<i>Characodon audax</i>	-----
		<i>Cyprinodon meeki</i>	-----
		<i>Gambusia senilis</i>	-----
		<i>Xiphophorus helleri</i>	-----
Manantial en la UMA de caza, poblado de Guadalupe Aguilera	24°25'59.5" N; 104°38'29" W	<i>Characodon audax</i>*	6400/6401
		<i>Chirostoma mezquital</i>*	6405/6529
Ojo de Agua San Juan	23°57'11.6" N; 104°16'15" W	<i>Characodon lateralis</i>*	6398/6399
		<i>Oreochromis nilotica</i>	6406
		<i>Xiphophorus helleri</i>	6407
Ojo de Agua en el poblado Los Berros	23°56'21.4" N; 104°16'27.8" W	<i>Gambusia senilis</i>	-----
Puente en el poblado de Pino Suárez, Carretera Durango Mezquital	23°52'43.5" N; 104°31'54.7" W	<i>Characodon audax</i>*	6402/6404
Río Guatimape antes de la presa en el poblado de Guatimape	24°48'17.2" N; 104°55'17.2" W	<i>Cyprinodon nazas</i>	-----
		<i>Gila conspersa</i>*	6358
Río Guatimape cortina de la presa en el poblado de Guatimape	24°48'33.4" N; 104°55'33.3" W	<i>Gila conspersa</i>	6356/6357
Río la Villa, La Alameda, en el pueblo Nombre de Dios	23°51'38.04" N; 104°14'51.48" W	<i>Gila conspersa</i>*	6411/6412
Río Tunal, puente ejido Nombre de Dios	23°46'30.5"N; 104°16'91.2"W	<i>Gila conspersa</i>	-----

En negritas se muestran aquellos hospederos de los cuales se obtuvieron secuencias de los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen ribosomal 5.8S. Las líneas punteadas son ausencias de preparaciones en la Colección Nacional de Helmintos. * Individuos donde se examinó la presencia de huevos en el útero.

De manera adicional, se examinó el estado de desarrollo de los ejemplares de *B. acheilognathi* obtenidos de peces pertenecientes a cuatro familias de peces (Tabla 5). En el estado grávido los individuos presentan proglótidos que contienen huevos en el útero. Se analizaron en total 92 céstodos individuales de los cuales uno fue colectado en el Aterinópsido *Chirostoma mezquital*, cinco en el godeido *Characodon audax* y tres en *Characodon lateralis* mientras que en el poecílido *Poeciliopsis gracilis* se estudiaron dos individuos. Los 81 céstodos restantes que se estudiaron provinieron de siete especies de ciprínidos (*Gila conspersa*, *Notropis chihuahua*, *Notropis nazas*, *Pimephales promelas*, *Codoma ornata*, *Campostoma ornatum* y *Cyprinus carpio*). De todos los céstodos examinados, el 34% (es decir 31 individuos) fueron grávidos. En su mayoría se encontró que los ejemplares grávidos

infectaban a ciprínidos, pues 28 de los 31 ejemplares pertenecieron a esta familia. El único ejemplar observado de *B. acheilognathi* en *Chirostoma mezquital*, uno de los ocho ejemplares de godeidos y uno de los dos ejemplares de poecílidos presentaron huevos en el útero. Todo lo anterior ratifica a los ciprínidos como el grupo de hospederos preferenciales de *B. acheilognathi*, es decir, que a pesar de ser un parásito generalista podemos sugerir que éste presenta un cierto grado de preferencia a parasitar y alcanzar la madurez sexual principalmente en peces pertenecientes a la familia Cyprinidae (Salgado-Maldonado *et al.*, 1986; Luo *et al.*, 2002).

También es preciso retomar la idea de Brooks *et al.*, (2001, 2006) con respecto al peligro potencial que representa el introducir especies parásitas a nuevos ambientes con relación a la pérdida de la biodiversidad en general, ya que al ser introducidos parásitos altamente patógenos a un nuevo ambiente podrían desencadenar un problema epidemiológico difícil de controlar.

IV.2 Variación genética de poblaciones de *Bothriocephalus acheilognathi* en peces de Durango.

IV.2.1 Análisis de ITS1, 5.8S e ITS2

Se estudio la variación genética de individuos con una amplia representatividad de localidades y de hospederos utilizando los espaciadores internos ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S. Para ello, se seleccionaron 26 ejemplares de *B. acheilognathi* de ocho localidades del Río Nazas y ocho del Río Mezquital del estado de Durango que se encontraron parasitando a 11 especies de hospederos mismos que se incluyen en cinco familias: Atherinopsidae, Cyprinidae, Cyprinodontidae, Goodeidae y Poeciliidae (Tabla 6) además de dos muestras de *B. acheilognathi* recolectadas del intestino de *Cyprinus carpio* en la cantera oriente, Ciudad Universitaria en el Distrito Federal.

Por otra parte, de una localidad en particular (Río San Juan en el poblado de “El Cuarto”) se incluyeron muestras de cuatro especies de hospederos, con el fin de evaluar la posible variabilidad genética entre éstos. Además, se incluyeron en el análisis individuos de *B. acheilognathi* de una misma especie de hospedero que tiene una amplia distribución en localidades de las dos cuencas hidrológicas. La especie seleccionada fue el ciprínido *Gila conspersa* que de acuerdo con nuestros resultados es aquella que exhibe la prevalencia más alta de infección por el céstodo. Para este hospedero se secuenciaron individuos de *B. acheilognathi* de 10 localidades, cinco del Río Nazas y cinco del Río Mezquital (Tabla 6).

La divergencia genética intraespecífica de 28 secuencias de los ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S del céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* del estado de Durango y una secuencia de *Bothriocephalus claviceps* que fue designada como el grupo externo, reveló una variación intraespecífica muy baja, entre 0 y 1.29% (Tabla 7). Así mismo la variación entre las secuencias de *B. acheilognathi* y *B. claviceps* (variación interespecífica) fue de entre 17.4 y 18.4%.

Tabla 6. Lista de ejemplares de *Bothriocephalus acheilognathi* colectados en dos cuencas en el estado de Durango utilizados para el análisis molecular.

Hospedero	Localidad	Abrev.	Cuenca
<i>Gila conspersa</i>	Arroyo en el poblado de Plan Ayala 2	P2*	Mezquital
<i>Gila conspersa</i>	Charco Azul, río Guatimape en ejido “El molino”	RG*	Mezquital
<i>Chirostoma mezquital</i>	Manantial en la UMA de caza Poblado Guadalupe Aguilera	M	Mezquital
<i>Characodon audax</i>	Manantial en la UMA de caza Poblado Guadalupe Aguilera	M*	
<i>Characodon lateralis</i>	Ojo de agua San Juan	SJ*	Mezquital
<i>Gila conspersa</i>	Poza en el Arroyo Torreones	AT	Nazas
<i>Notropis chihuahua</i>	Poza en el Arroyo Torreones	AT	
<i>Pimephales promelas</i>	Puente carretera paso Nacional -Lázaro	PN	Nazas
<i>Gila conspersa</i>	Puente carretera Peñón Blanco-Yerbaniz	PB*	Nazas
<i>Codoma ornata</i>	Puente carretera Peñón Blanco- Yerbaniz	PB*	
<i>Characodon audax</i>	Puente en el poblado de Pino Suárez	PS*	Mezquital
<i>Gila conspersa</i>	Puente Lajas 1, poblado de Sn Juan Francisco de Lajas	PL	Nazas
<i>Gila conspersa</i>	Río Covadonga, poblado de Peñón Blanco	RC*	Nazas
<i>Campostoma ornatum</i>	Río Covadonga, poblado de Peñón Blanco	RC*	
<i>Notropis nazas</i>	Río Covadonga, poblado de Peñón Blanco	RC	
<i>Cyprinodon nazas</i>	Río Guatimape antes de la presa en el	RG _a	Mezquital
<i>Gila conspersa</i>	Río Guatimape antes de la presa en el	RG _a	
<i>Gila conspersa</i>	Río la Villa, La Alameda en el pueblo Nombre de Dios	RV*	Mezquital
<i>Pimephales promelas</i>	Río Nazas en el puente Nazas 1	RN	Nazas
<i>Notropis nazas</i>	Río Nazas en el puente Nazas 1	RN*	
<i>Pimephales promelas</i>	Río Nazas, puente en la carretera Rodeo-	RN*	Nazas
<i>Gila conspersa</i>	Río San Juan en “el Cuarto”	RS	Nazas
<i>Campostoma ornatum</i>	Río San Juan en “el Cuarto”	RS*	
<i>Poeciliopsis gracilis</i>	Río San Juan en “el Cuarto”	RS*	
<i>Codoma ornata</i>	Río San Juan en “El Cuarto”	RS*	
<i>Gila conspersa</i>	Río Tunal (puente ejido Nombre de Dios)	RT*	Mezquital
<i>Cyprinus carpio</i>	Cantera Oriente, México, D.F.	CO*	
<i>Cyprinus carpio</i>	Cantera Oriente, México, D.F.	CO*	

*El asterisco indica aquellos individuos que fueron secuenciados para el gen mitocondrial *Cox1*. La abreviatura de la localidad se utiliza en las figuras 7 a 10

El ejemplar recolectado en *Gila conspersa* del Río la Villa (cuenca del Río Mezquital) fue el ejemplar secuenciado que mostró una mayor divergencia con respecto al resto de los ejemplares del Estado de Durango, pues varió de 0.76 a 1.29 %.

El análisis filogenético por medio de máxima parsimonia (MP) de las 28 secuencias de *B. acheilognathi*, más el grupo externo se limitó a la generación de 10000 árboles y éste constó de 1342 caracteres (incluyendo GAP's), de los cuales 1102 caracteres son constantes, 227 son no informativos y solo 13 caracteres son parsimoniosamente informativos. Sólo un sitio informativo se encontró en el ITS1, ninguno en el 5.8S y en el ITS2 se encontraron los 12 caracteres informativos restantes. La longitud del árbol constó de 254 pasos con un índice de consistencia (CI) de 0.961, el índice de retención (RI) fue de 0.697 mientras el índice de consistencia rescalado (RC) fue de 0.670.

La Figura 7 muestra el árbol de consenso estricto. Si bien el árbol muestra una politomía se aprecia un clado conformado por *Codoma ornata* de la localidad Peñón Blanco-Yerbaniz de la cuenca del Río Nazas y *Cyprinus carpio* colectado en la Cantera Oriente de Ciudad Universitaria, mismo que se mantiene en el árbol de máxima verosimilitud (Figura 8) y que el análisis de bootstrap soporta con un valor mayor del 50% (63%), sin embargo esta agrupación filogenética no es posible explicarla en este momento pues no representa una concordancia geográfica u hospedatoria.

Por otra parte en la figura 8 se muestra el árbol de máxima verosimilitud basado en las mismas 28 secuencias y el grupo externo. El árbol posee un valor de $-Ln=2852.98254$ y se observa a *Codoma ornata* de Peñón Blanco-Yerbaniz y *Cyprinus carpio* de la Cantera Oriente conformando un clado. Éste clado es apoyado en los árboles de MP y ML con un valor de soporte de Bootstrap de 63% y 73%, respectivamente.

El análisis de ML (Fig. 8) muestra que la secuencia de *B. acheilognathi* de *Gila conspersa* del Río la Villa representa la rama más larga y por ende alcanza la mayor divergencia (1.29%), sin que esto determine en ningún momento que pueda representar una especie diferente. Para los genes ITS1, ITS2 y 5.8S, ambos métodos de reconstrucción no muestran la formación de grupos, ya sea por afinidad con un grupo de hospederos o bien , con una cuenca hidrológica o incluso con alguna localidad particular.

Tabla 7. Distancias genéticas (mostradas en porcentajes) de 28 ejemplares de *B. acheilognathi* del estado de Durango usando ITS's y el gen ribosomal 5.8S con respecto al grupo externo *B. claviceps*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1GE	-											
2CISJ	17.97	-										
3CaoRS	18.05	0.15	-									
4GcRG	18.05	0.15	0.00	-								
5CaoRC	18.05	0.15	0.00	0.00	-							
6GcP2	18.05	0.15	0.00	0.00	0.00	-						
7PgRS	18.05	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	-					
8CoRS	18.05	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-				
9GcPB	18.05	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-			
10CaPS	18.05	0.23	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	-		
11NnRC	18.05	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.08	-	
12PpRN	18.05	0.23	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	-
13PpND	18.05	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
14CnRGa	18.13	0.30	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.08	0.15	0.08
15PpPN	18.07	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
16NcAT	18.12	0.23	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.15	0.23	0.15
17CoPB	18.43	0.68	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.61	0.68	0.61
18CcCO	18.29	0.53	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.46	0.53	0.46
19GeRGa	17.92	0.30	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.23	0.30	0.23
20GeAT	18.07	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
21GeRV	17.86	0.76	0.68	0.61	0.68							
22CmM	17.89	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
23GeRC	17.89	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
24GeRT	17.84	0.45	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.38	0.45	0.38
25GePL	17.84	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.15	0.08
26NnRN	17.65	0.31	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.23	0.31	0.23
27CaM	17.54	0.30	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.23	0.31	0.23
28GeRS	17.43	0.38	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.31	0.38	0.31
29CcCO	17.59	0.38	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.31	0.38	0.31

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
13PpND	-											
14CnRGa	0.15	-										
15PpPN	0.00	0.15	-									
16NcAT	0.08	0.23	0.08	-								
17CoPB	0.53	0.68	0.53	0.45	-							
18CcCO	0.38	0.53	0.38	0.30	0.45	-						
19GeRGa	0.15	0.30	0.15	0.08	0.30	0.15	-					
20GeAT	0.00	0.15	0.00	0.08	0.53	0.38	0.15	-				
21GeRV	0.76	0.61	0.76	0.83	1.29	1.14	0.91	0.76	-			
22CmM	0.00	0.15	0.00	0.08	0.53	0.38	0.15	0.00	0.76	-		
23GeRC	0.00	0.15	0.00	0.08	0.53	0.38	0.15	0.00	0.76	0.00	-	
24GeRT	0.30	0.45	0.30	0.38	0.84	0.68	0.46	0.30	0.46	0.30	0.30	-
25GePL	0.00	0.15	0.00	0.08	0.53	0.38	0.15	0.00	0.76	0.00	0.00	0.30
26NnRN	0.15	0.31	0.15	0.08	0.38	0.23	0.00	0.15	0.91	0.15	0.15	0.46
27CaM	0.15	0.31	0.15	0.08	0.31	0.23	0.00	0.15	0.91	0.15	0.15	0.46
28GeRS	0.23	0.38	0.23	0.15	0.46	0.30	0.08	0.23	0.84	0.23	0.23	0.38
29CcCO	0.23	0.38	0.23	0.15	0.46	0.31	0.08	0.23	0.84	0.23	0.23	0.38

	25	26	27	28	29
25GePL	-				
26NnRN	0.15	-			
27CaM	0.15	0.00	-		
28GeRS	0.23	0.08	0.08	-	
29CcCO	0.23	0.08	0.08	0.15	-

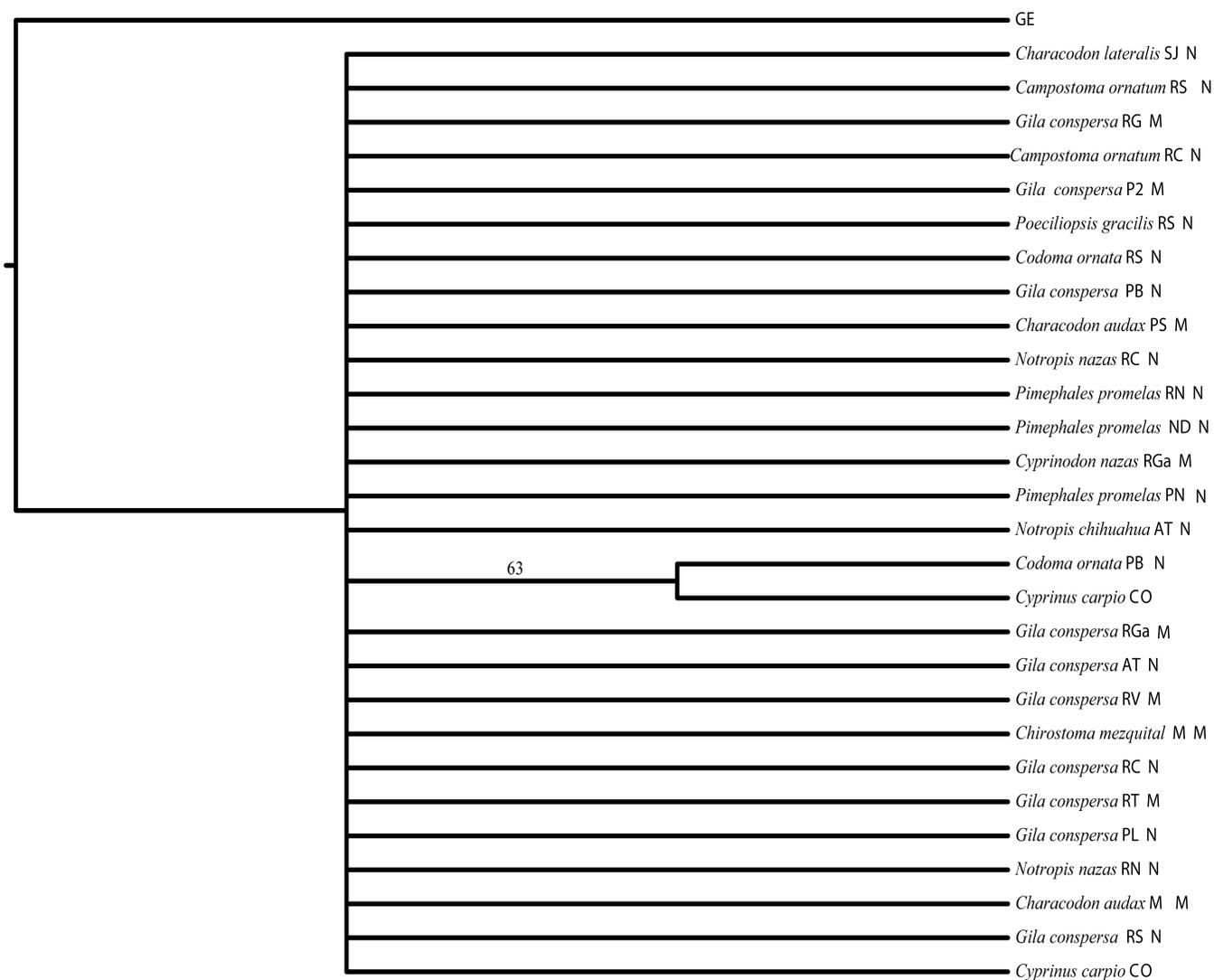


Fig. 7. Árbol de consenso estricto resultado del análisis de máxima parsimonia de 28 secuencias de *B. acheilognathi* basado en el ITS1, ITS2 y el gen 5.8S ribosomal. M=Cuenca del Río Mezquital N=Cuenca del Río Nazas. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver tabla 6 para puntualización de la localidad). El número por encima de la rama representa el valor de bootstrap.

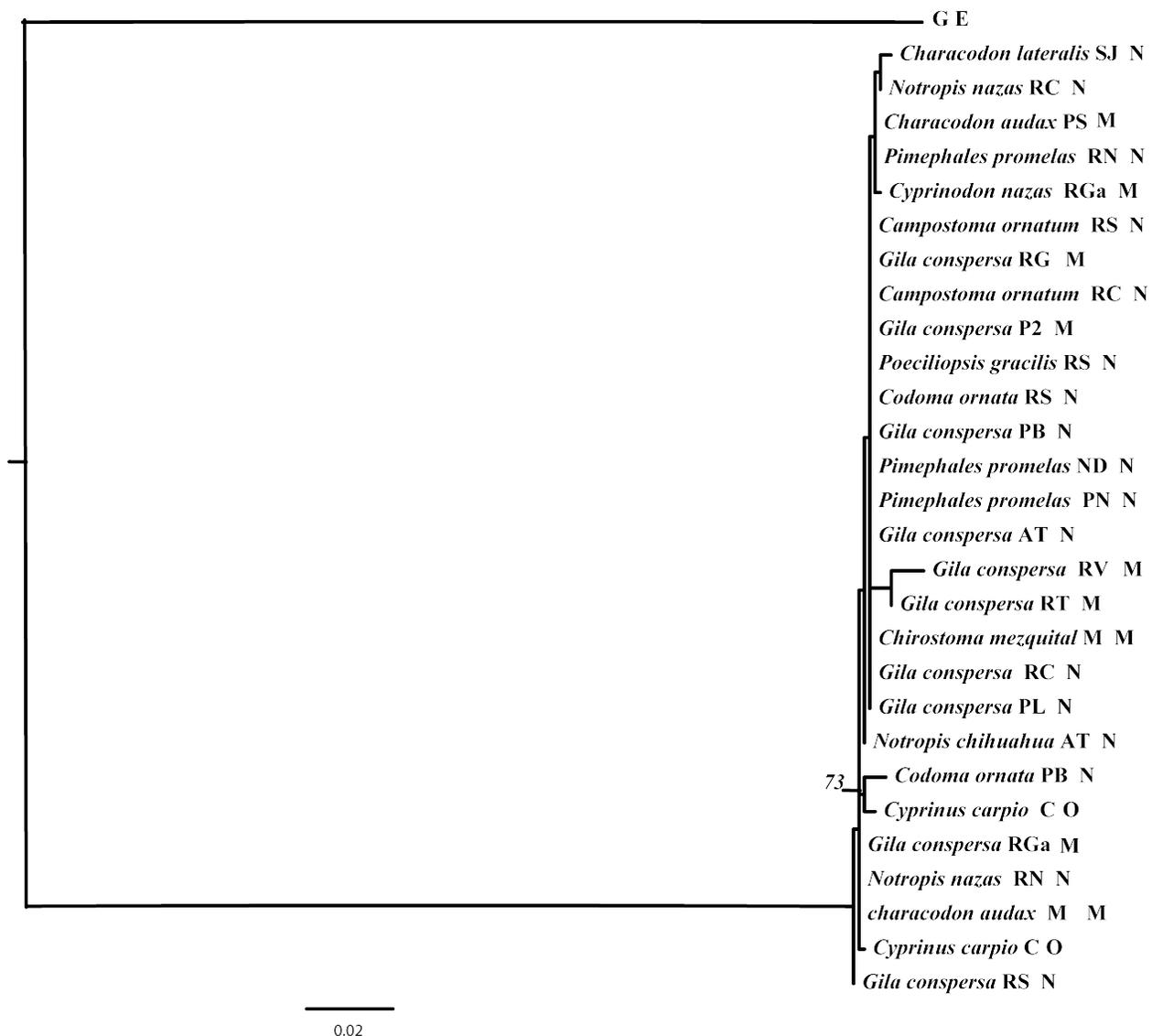


Fig 8. Árbol de máxima verosimilitud (ML) de 28 secuencias de *B. acheilognathi* en el estado de Durango basado en el ITS1, ITS2 y el gen 5.8S ribosomal. M=Cuenca del Río Mezquital N=Cuenca del Río Nazas. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver tabla 6 para puntualización de la localidad). El número por encima de la rama representa el valor de bootstrap.

IV.2.2 Análisis de *Cox1*

Se analizaron 18 secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (*Cox1*). En este caso se usó la secuencia del céstodo *Bothriocephalus cuspidatus* parásito de *Lepomis macrochirus* del Río Primero, Chihuahua como grupo externo, pues no se cuenta con secuencias del mismo

marcador para la especie *B. claviceps* utilizada en los genes ribosomales. El grupo externo varía de 16.71 a 17.02% con respecto a los 18 ejemplares de *B. acheilognathi*.

Por otro lado, la variación entre ejemplares de la misma especie fue nula, a excepción del ejemplar perteneciente al hospedero *Gila conspersa* de la localidad Río Covadonga que mostró 1.22% de variación con respecto al resto de los individuos presentes en el análisis.

Tabla 8. Distancias genéticas (mostradas en porcentajes) entre 18 ejemplares de *B. acheilognathi* utilizando *Cox1*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 GE																			
2GcP2	16.72																		
3 GcRG	16.72	0.00																	
4 CaM	16.71	0.00	0.00																
5 ClSJ	16.72	0.00	0.00	0.00															
6 GcPB	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00														
7CoPB	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
8 CaPS	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
9 GcRC	17.02	1.22																	
10CoRC	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22									
11GcRV	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00								
12NnRN	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00							
13 PpND	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00						
14CoRS	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00					
15PgRS	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
16GcRT	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
17 CoRS	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
18 CcCO	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
19 CcCO	16.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

El análisis de máxima parsimonia del gen mitocondrial *Cox1* incluyó un total de 329 pares de bases, 272 fueron constantes, 56 variables pero no informativos y solo 1 carácter parsimoniosamente informativo el cual se encontró en la base 320 del alineamiento. El análisis filogenético basado en el criterio de parsimonia resultó en un único árbol cuya longitud fue de 58 pasos (Fig. 10), con un índice de consistencia, índice de retención e índice de consistencia rescalado igual a uno. La topología del árbol muestra muy poca resolución reflejada en una politomía. Solo el ejemplar de *Gila conspersa* del Río Covadonga en la cuenca del Nazas mostró una mayor diferenciación.

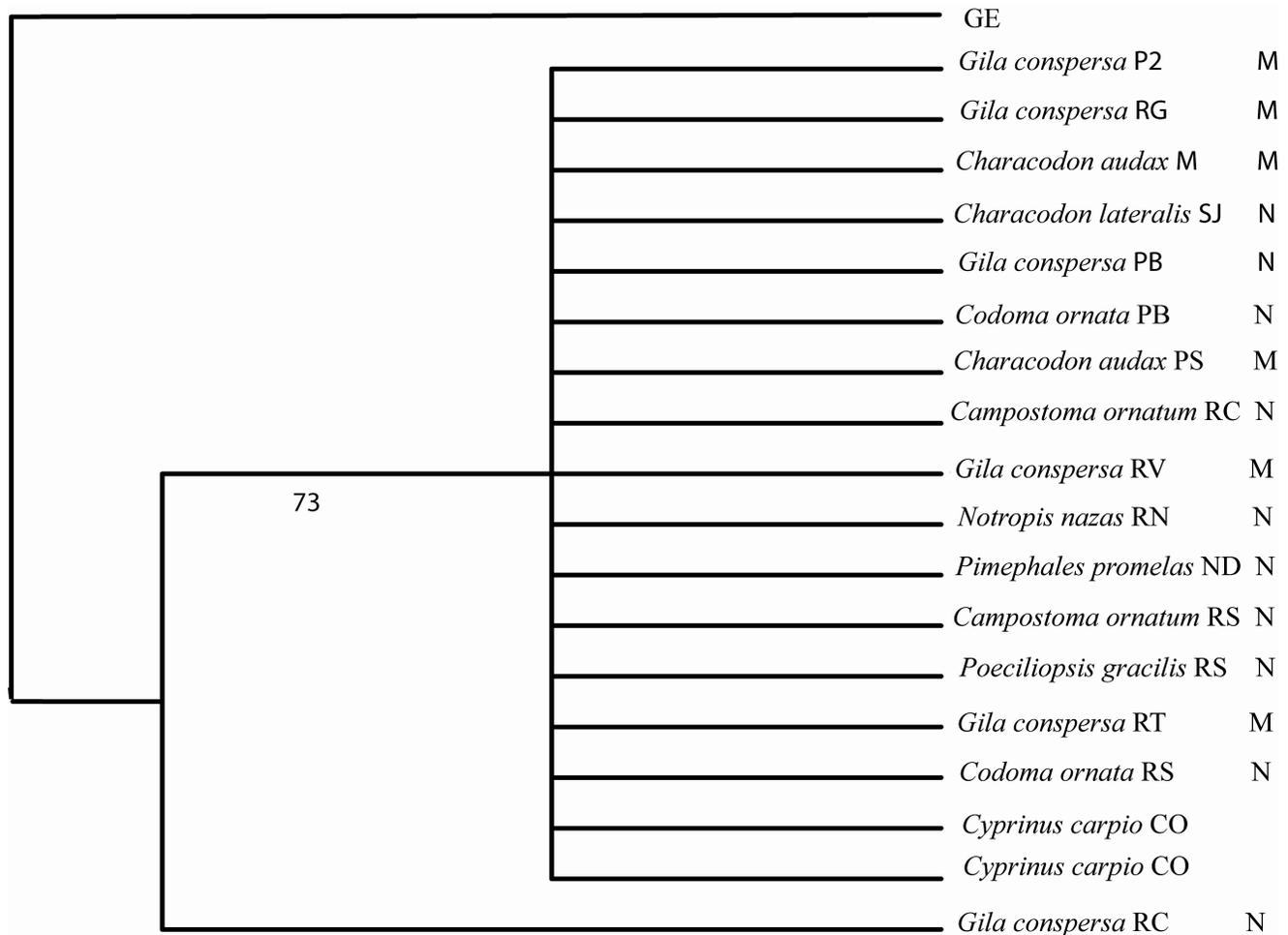


Fig 9. Árbol de consenso estricto utilizando el criterio de Parsimonia basado en 18 secuencias de *B. acheilognathi* utilizando el gen mitocondrial *Cox1*. M=Cuenca del Río Mezquital N=Cuenca del Río Nazas. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver tabla 6 para puntualización de la localidad). El número por debajo de la rama representa el valor de bootstrap.

Finalmente el árbol de la Figura 10 muestra el resultado del análisis de máxima verosimilitud efectuado con las 18 secuencias de *B. acheilognathi* del estado de Durango. El valor de éste árbol fue de $-Ln= 646.29608$. La topología es similar al análisis de MP y se muestra una politomía y la separación de la muestra del Río Covadonga.

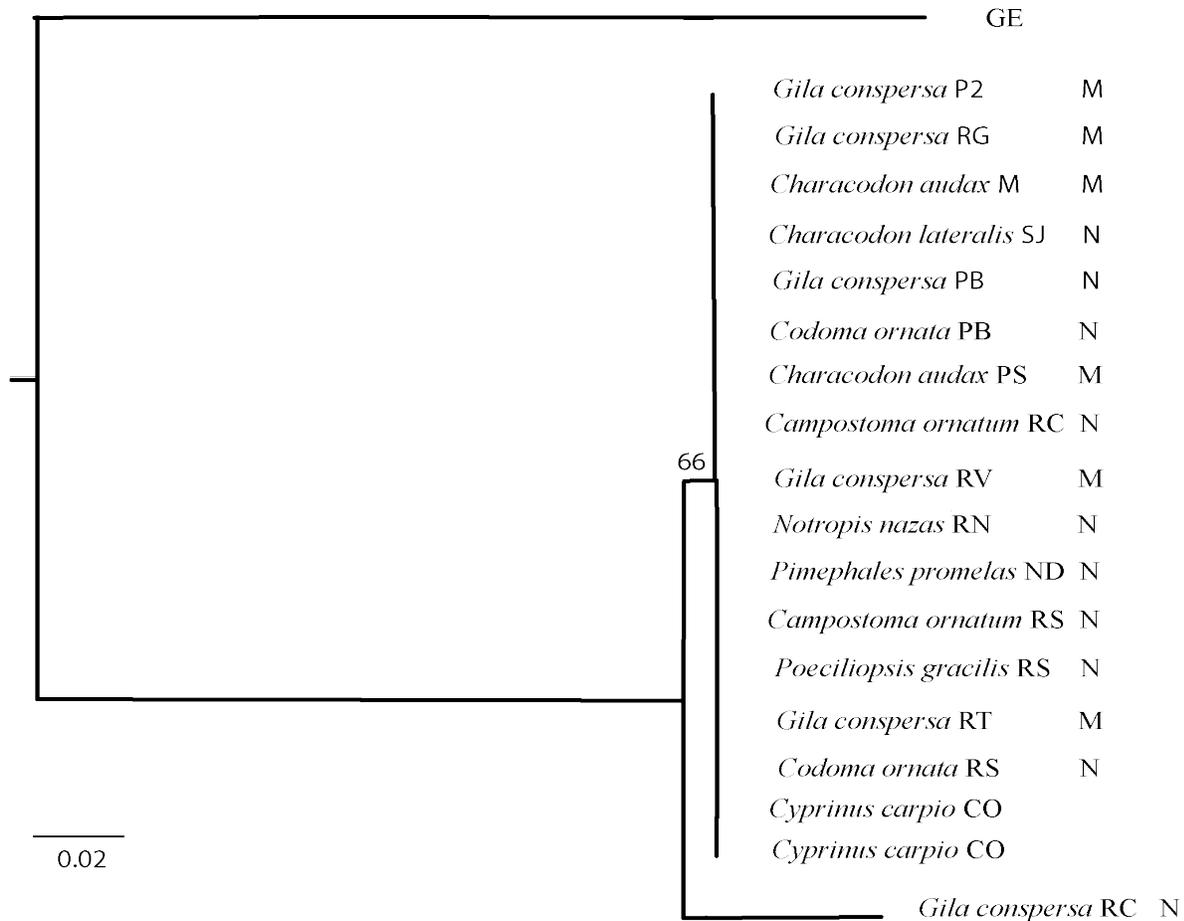


Fig. 10. Árbol de máxima verosimilitud basado en un segmento parcial del gen mitocondrial *Cox1* en 18 ejemplares de *B. acheilognathi*. M=Cuenca del Río Mezquital N=Cuenca del Río Nazas. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver Tabla 6 para puntualización de la localidad). El número por encima de la rama representa el valor de Bootstrap.

Las topologías de los árboles resultantes tanto con el análisis de máxima parsimonia y el análisis de máxima verosimilitud separan a *Gila conspersa* de Río Covadonga del resto de la politomía generada. El

análisis de Bootstrap soporta esta politomía con un 66% para este análisis a diferencia del 73% generado para el árbol de estas mismas secuencias para el análisis de máxima parsimonia.

Los resultados aquí presentados claramente muestran la pequeña o nula variación genética encontrada entre las poblaciones del céstodo *B. acheilognathi* en dos cuencas hidrológicas del estado de Durango. Lo anterior seguramente se debe al reciente tiempo de introducción de esta especie en México, mismo que no sobrepasa 46 años. Se ha descrito que algunas especies invasoras, tanto plantas como animales, desarrollan cambios evolutivos rápidos en las áreas nuevas que colonizan (ver Whitney y Gabler, 2008). Estos autores refieren que incluso en un periodo de 30 a 120 años, algunas especies invasoras experimentan cambios evolutivos y se han reportado ejemplos que sugieren cambios evolutivos menores a 10 años de su introducción al nuevo ambiente (Singer *et al.*, 1993; Cousyn *et al.*, 2001). Sin embargo esto no parece ser el caso para *B. acheilognathi*. El muestreo realizado en Durango incluyó un gradiente geográfico importante, en ocho localidades de dos cuencas hidrológicas, así como un gradiente hospedatorio, habiéndose incluido muestras de 11 especies de hospederos que representan a cinco familias distintas.

Estudios previos han mostrado que algunos marcadores moleculares tales como los espaciadores internos del DNA ribosomal (ITS's) son útiles para analizar la sistemática y filogenia de helmintos y en particular para determinar las relaciones filogenéticas de especies cercanamente relacionadas (Blair *et al.*, 1996). Autores como Verneau *et al.*, (1997a, 1997b) utilizaron secuencias de ITS's así como métodos de hibridación de DNA para demostrar que *B. scorpi*, una especie parásita de peces de agua dulce en regiones templadas, representa un complejo de especies hermanas (o “sibling”) y consideraron que el aislamiento y diferenciación de la especie se dió recientemente y en un corto periodo de tiempo.

Nuestros resultados no reflejan ningún tipo de variación en ese sentido aún cuando se incluyen no sólo los mismos marcadores ribosomales, sino también un gen mitocondrial (*Cox1*) mismo que tiene una tasa de evolución más rápida y de hecho ha sido utilizada para reconocer especies crípticas de helmintos (Pérez Ponce de León y Nadler, 2010). En un estudio previo realizado con la misma especie de céstodo (*B. acheilognathi*), Luo *et al.*, (2002) analizaron la variación genética considerando los marcadores ITS1 e ITS2 en muestras de 11 especies de peces dulceacuícolas colectadas en Australia, China, República Checa, Inglaterra y Hawái. Estos autores encontraron una divergencia de entre 0 y

0.9% para el ITS1 y de 0 a 6.6% en el ITS2 y señalaron que esta variación intraespecífica resultó principalmente de la presencia de polimorfismos como microsatélites en la región de los ITS's. De igual forma los resultados que obtuvimos en nuestro trabajo no reflejan lo observado por Luo *et al.*, (2002) para la misma especie de céstodo aunque cabe resaltar la amplitud geográfica de dicho estudio misma que incluye muestras de seis localidades muy distantes con una gran mayoría de estas obtenidas en la región donde se supone *B. acheilognathi* se originó (ciprínidos de China) y se dispersó recientemente con la introducción de carpas con fines acuaculturales. En el mismo trabajo Luo *et al.*, (2002) encontraron estructuración en sus análisis filogenéticos a partir de un árbol de consenso obtenido con parsimonia y refieren a 3 genotipos. Cabe señalar el error que cometieron al reconocer al genotipo número dos, pues éste es claramente un grupo parafilético en su análisis filogenético. Independientemente de esto, nuestro estudio no refleja ningún tipo de estructura en los análisis filogenéticos realizados, tanto con máxima parsimonia como con máxima verosimilitud, ni considerando el marcador ribosomal y mitocondrial.

Finalmente el hallazgo de secuencias cortas reportadas en los ITS's de *B. acheilognathi* en peces de Durango concuerda con lo encontrado por Luo *et al.*, (2002). Estos autores registraron por primera vez estos microsatélites en *B. acheilognathi*, los fragmentos repetidos variaron entre dos y seis pares de bases en longitud. Todo lo anteriormente descrito ratifica que *B. acheilognathi* es una especie genéticamente polimórfica, aunque el nivel de variación encontrado para dos marcadores, en poblaciones de Durango es muy bajo.

IV.3 Comparación de la variabilidad genética de *Bothriocephalus acheilognathi* de ejemplares de Durango, México con poblaciones de diferentes localidades en el mundo.

Se analizaron 55 secuencias de los ITS's y el gen ribosomal 5.8S del parásito *Bothriocephalus acheilognathi* de las cuales 28 fueron del estado de Durango, 20 fueron de localidades de China, tres de Hawái, una de República Checa, una de Australia y una de Inglaterra. Los datos de colecta y hospedero se observan en la tabla 6 y 9. Así mismo se incluye a *Bothriocephalus claviceps* como grupo externo. La matriz de distancias indicó una baja variación genética entre las muestras de Durango con respecto a las secuencias del trabajo de Luo *et al.*, (2002), la cual va de 0.00 a 1.07%. El ciprínido *Coreius guichenoti* mostró una variación de 1.07% con respecto a *Gila conspersa* del Río la Villa de Durango, siendo este el nivel de variación más alto observado (Tabla 10).

El alineamiento completo de estos 55 taxones, incluyendo a *B. claviceps* como grupo externo, constó de 1420 sitios de los cuales 1152 fueron constantes, 244 fueron variables y sólo 24 fueron parsimoniosamente informativos. De éstos 24 sitios informativos seis se encuentran en el ITS1, uno en el 5.8S ribosomal y 17 en el ITS2, misma que mostró ser la región más variable.

El análisis de máxima parsimonia de 54 ejemplares de *B. acheilognathi* de los ITS1, 5.8S e ITS2 más un secuencia de *B. claviceps* designada como grupo externo, dió como resultado el árbol de la Figura 11, donde observamos un cierto grado de agrupación, aunque existe una politomía en la base.

En el árbol de consenso estricto existen dos secuencias que alcanzan el mayor nivel de variación con respecto a las demás (OTU H23 y OTU A5) correspondientes a un ciprínido de China y Australia, respectivamente. La politomía que incluye a la mayoría de las secuencias, contiene al menos cinco grupos monofiléticos, tres que incluyen a secuencias del trabajo de Luo *et al.*, (2002) (clados 1,4 y 5) de los cuales dos se mantienen con respecto al árbol obtenido por estos autores en su publicación y adicionalmente dos grupos monofiléticos con muestras de peces de Durango (clados, 2 y 3). Ninguno de estos dos grupos muestra correspondencia geográfica ni hospedatoria (ver Fig. 11).

Tabla 9. Lista de ejemplares de *Bothriocephalus acheilognathi* obtenidas de GenBank de acuerdo al trabajo de Luo *et al.*,(2002)

OTU	Hospedero	Localidad	Número de GenBank
A1	<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Lugu, Yunnan, China	AF362408
A2	<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Chenghai, Yunnan, China	AF362410
A3	<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Changshou, Chongqing, China	AF362415
A4	<i>Cyprinus carpio</i>	Vodnanry, República Checa.	AF362418
A5	<i>Cyprinus carpio</i>	Lago Gum Bend, Australia	AF362412
A6	<i>Cyprinus carpio</i>	Localidad confidencial, Inglaterra.	AF362413
B7	<i>Culter alburnus</i>	Lago Baoan, Hubei, China	AF362425
C8	<i>Culter dabryi</i>	Lago Liangzi, Hubei, China	AF362427
C9	<i>Culter dabryi</i>	Lago Tangxun, Hubei, China	AF362426
C10	<i>Culter dabryi</i>	Lago Baoan, Hubei, China	AF362433
C11	<i>Culter dabryi</i>	(Reservoir)Represa Bailianhe, Hubei, China	AF362431
D12	<i>Cultrichthys erythropterus</i>	Lago Liangzi, Hubei, China	AF362428
D13	<i>Cultrichthys erythropterus</i>	Lago Tangxun, Hubei, China	AF362429
D14	<i>Cultrichthys erythropterus</i>	Lago Baoan, Hubei, China	AF362432
D15	<i>Cultrichthys erythropterus</i>	Lago Honghu, Hubei, China	AF362430
E16	<i>Hemiculter leucisculus</i>	Lago Xingyun, Yunnan, China	AF362416
E17	<i>Hemiculter leucisculus</i>	Lago Nanbeizui, Hubei, China	AF362419
E18	<i>Hemiculter leucisculus</i>	Lago Honghu, Hubei, China	AF362421
E19	<i>Hemiculter leucisculus</i>	Jiangkou Reservoir, Jiangxi, China	AF362423
E20	<i>Hemiculter leucisculus</i>	Bailianhe Reservoir, Hubei, China	AF362422
F21	<i>Hemiculter bleekeri</i>	Lago Poyanghu, Jiangxi, China	AF362417
G22	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Granja piscícola, Guangdong, China	AF362411
H23	<i>Coreius guichenoti</i>	Río Yangtze, Wushan, China	AF362414
I24	<i>Gambusia affinis</i>	Bahia de la tortuga en campo de Golf, estanque cercano a Kahuku, Isla de Oahu, Hawái	AF362409
J25	<i>Poecilia mexicana</i>	Arroyo (Stream) Waianu, Oahu, Hawai	AF362424
k26	<i>Xiphophorus helleri</i>	Arroyo (Stream) kahana Oahu, Hawai	AF362420
L1*	<i>Anguilla marmorata</i>	Isla Yako, Japón.	AF362434

* Ejemplar utilizado como grupo externo para el análisis molecular perteneciente a *Bothriocephalus claviceps*.

Tabla 10. Tabla de distancias “p” no corregidas de las 28 ejemplares de Durango basado en ITS's y el gen 5.8S y las 26 del trabajo de Luo *et al.*, (2002) bajo la denominación de OTU's. Para referencia de localidad y hospedero ver Tabla 10.

GE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
GE																	
1 Gc(P2)	17.28																
2 Gc(RG)	17.28	0.00															
3 Ca(M)	17.11	0.00	0.00														
4 Ca(M)	16.76	0.15	0.15	0.15													
5 Cl(SJ)	17.28	0.15	0.15	0.15	0.30												
6 Gc(AT)	17.30	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15											
7 Nn(AT)	17.35	0.08	0.08	0.08	0.08	0.23	0.08										
8 Pp(PN)	17.30	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08									
9 Gc(PB)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00								
10 Co(PB)	17.45	0.30	0.30	0.30	0.08	0.45	0.30	0.23	0.30	0.30							
11 Ca(PB)	17.28	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.38						
12 Gc(PL)	17.07	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08					
13 Gc(RC)	17.11	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00				
14 Cao(RC)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	0.00			
15 Nn(RC)	17.28	0.15	0.15	0.15	0.31	0.15	0.15	0.23	0.15	0.15	0.46	0.08	0.15	0.15	0.15		
16 Cn(RGa)	17.29	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.38	0.00	0.08	0.08	0.08	0.08	
17 Gc(RGa)	17.15	0.15	0.15	0.15	0.00	0.30	0.15	0.08	0.15	0.15	0.08	0.23	0.15	0.15	0.15	0.30	0.23
18 Gc(RV)	17.43	0.46	0.46	0.46	0.61	0.45	0.46	0.53	0.46	0.46	0.76	0.38	0.46	0.46	0.46	0.30	0.38
19Pp(RN)	17.28	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.38	0.00	0.08	0.08	0.08	0.08	0.00
20 Nn(RN)	16.87	0.15	0.15	0.15	0.00	0.30	0.15	0.08	0.15	0.15	0.15	0.23	0.15	0.15	0.15	0.31	0.23
21 Pp(ND)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	0.00	0.00	0.15	0.08
22 Gc(RS)	16.82	0.23	0.23	0.23	0.08	0.38	0.23	0.15	0.23	0.23	0.23	0.31	0.23	0.23	0.23	0.38	0.31
23 Cao (RS)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	0.00	0.00	0.15	0.08
24 Pg(RS)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	0.00	0.00	0.15	0.08
25 Co(RS)	17.28	0.00	0.00	0.00	0.15	0.15	0.00	0.08	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	0.00	0.00	0.15	0.08
26 Gc(RT)	17.22	0.30	0.30	0.30	0.46	0.45	0.30	0.38	0.30	0.30	0.61	0.38	0.30	0.30	0.30	0.45	0.38
27 CC02	16.82	0.23	0.23	0.23	0.08	0.38	0.23	0.15	0.23	0.23	0.23	0.31	0.23	0.23	0.23	0.38	0.31
28 CC01	17.53	0.38	0.38	0.38	0.23	0.53	0.38	0.30	0.38	0.38	0.30	0.46	0.38	0.38	0.38	0.53	0.46
29 OTUD12	16.72	0.15	0.15	0.15	0.31	0.30	0.15	0.23	0.15	0.15	0.46	0.23	0.15	0.15	0.15	0.30	0.23
30 OTUA4	16.77	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.38	0.15	0.08	0.08	0.08	0.23	0.15
31 OTUC8	16.93	0.31	0.31	0.31	0.46	0.46	0.31	0.38	0.31	0.31	0.61	0.38	0.31	0.31	0.31	0.46	0.38
32 OTUE17	16.67	0.39	0.39	0.39	0.38	0.54	0.39	0.31	0.39	0.39	0.54	0.46	0.38	0.39	0.39	0.54	0.46
33 OTUE20	16.85	0.31	0.31	0.31	0.31	0.46	0.31	0.23	0.31	0.31	0.46	0.39	0.31	0.31	0.31	0.46	0.39
34 OTUF21	17.25	0.38	0.38	0.38	0.54	0.54	0.38	0.46	0.38	0.38	0.69	0.46	0.38	0.38	0.38	0.54	0.46
35 OTUA3	17.01	0.15	0.15	0.15	0.31	0.30	0.15	0.23	0.15	0.15	0.46	0.23	0.15	0.15	0.15	0.30	0.23
36 OTUK26	16.48	0.16	0.16	0.15	0.15	0.31	0.15	0.08	0.16	0.16	0.31	0.23	0.15	0.15	0.16	0.31	0.23
37 OTUE19	16.54	0.31	0.31	0.31	0.31	0.46	0.31	0.23	0.31	0.31	0.46	0.39	0.31	0.31	0.31	0.46	0.39
38 OTUE18	16.59	0.15	0.15	0.15	0.15	0.31	0.15	0.08	0.15	0.15	0.31	0.23	0.15	0.15	0.15	0.31	0.23
39 OTUD14	17.14	0.38	0.38	0.38	0.53	0.53	0.38	0.45	0.38	0.38	0.69	0.45	0.38	0.38	0.38	0.53	0.45
40 OTUI24	17.19	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.38	0.15	0.08	0.08	0.08	0.23	0.15
41 OTUJ25	16.40	0.23	0.23	0.23	0.23	0.38	0.23	0.15	0.23	0.23	0.38	0.31	0.23	0.23	0.23	0.38	0.31
42 OTUG22	17.27	0.30	0.30	0.30	0.46	0.45	0.30	0.38	0.30	0.30	0.61	0.38	0.30	0.30	0.30	0.45	0.38
43 OTUA2	17.30	0.23	0.23	0.23	0.38	0.38	0.23	0.30	0.23	0.23	0.53	0.30	0.23	0.23	0.23	0.38	0.30
44 OTUD13	17.35	0.46	0.46	0.46	0.62	0.61	0.46	0.53	0.46	0.46	0.77	0.53	0.46	0.46	0.46	0.61	0.53
45 OTUA6	17.41	0.46	0.46	0.46	0.61	0.61	0.46	0.53	0.46	0.46	0.76	0.53	0.46	0.46	0.46	0.61	0.53
46 OTUH23	17.47	0.60	0.60	0.61	0.76	0.75	0.61	0.68	0.60	0.60	0.91	0.68	0.61	0.61	0.60	0.76	0.68
47 OTUA5	17.69	0.46	0.46	0.46	0.62	0.61	0.46	0.54	0.46	0.46	0.77	0.54	0.46	0.46	0.46	0.61	0.54
48 OTUC9	16.67	0.08	0.08	0.08	0.23	0.23	0.08	0.15	0.08	0.08	0.39	0.16	0.08	0.08	0.08	0.23	0.16
49 OTUE16	17.28	0.30	0.30	0.30	0.46	0.46	0.30	0.38	0.30	0.30	0.61	0.38	0.30	0.30	0.30	0.46	0.38
50 OTUA1	17.02	0.23	0.23	0.23	0.23	0.38	0.23	0.15	0.23	0.23	0.38	0.31	0.23	0.23	0.23	0.39	0.31
51 OTUD15	17.21	0.38	0.38	0.38	0.54	0.53	0.38	0.46	0.38	0.38	0.69	0.46	0.38	0.38	0.38	0.54	0.46

52 OTUB7	17.18	0.15	0.15	0.15	0.15	0.31	0.15	0.08	0.15	0.15	0.30	0.23	0.15	0.15	0.15	0.31	0.23
53 OTUC11	15.94	0.15	0.15	0.15	0.31	0.31	0.15	0.23	0.15	0.15	0.46	0.23	0.15	0.15	0.15	0.31	0.23
54 OTUC10	16.81	0.00	0.00	0.00	0.16	0.16	0.00	0.08	0.00	0.00	0.31	0.08	0.00	0.00	0.00	0.16	0.08

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

17 Gc(RGa)																	
18 Gc(RV)	0.61																
19 Pp(RN)	0.23	0.38															
20 Nn(RN)	0.00	0.61	0.23														
21 Pp(ND)	0.15	0.46	0.08	0.15													
22 Gc(RS)	0.08	0.61	0.31	0.08	0.23												
23 Cao (RS)	0.15	0.46	0.08	0.15	0.00	0.23											
24 Pg(RS)	0.15	0.46	0.08	0.15	0.00	0.23	0.00										
25 Co(RS)	0.15	0.46	0.08	0.15	0.00	0.23	0.00	0.00									
26 Gc(RT)	0.45	0.30	0.38	0.46	0.30	0.38	0.30	0.30	0.30								
27 CC02	0.08	0.53	0.31	0.08	0.23	0.15	0.23	0.23	0.23	0.38	-						
28 CC01	0.15	0.84	0.46	0.23	0.38	0.30	0.38	0.38	0.38	0.68	0.30	-					
29 OTUD12	0.30	0.61	0.23	0.31	0.15	0.38	0.15	0.15	0.15	0.46	0.38	0.53	-				
30 OTUA4	0.23	0.54	0.15	0.23	0.08	0.31	0.08	0.08	0.08	0.39	0.31	0.46	0.23	-			
31 OTUC8	0.46	0.77	0.38	0.46	0.31	0.54	0.31	0.31	0.31	0.61	0.54	0.69	0.31	0.39			
32 OTUE17	0.39	0.77	0.46	0.38	0.39	0.46	0.39	0.39	0.39	0.61	0.46	0.62	0.62	0.46	0.77	-	
33 OTUE20	0.31	0.69	0.39	0.31	0.31	0.38	0.31	0.31	0.31	0.54	0.39	0.54	0.46	0.39	0.62	0.31	
34 OTUF21	0.54	0.85	0.46	0.54	0.38	0.62	0.38	0.38	0.38	0.69	0.62	0.77	0.54	0.46	0.70	0.77	
35 OTUA3	0.31	0.61	0.23	0.31	0.15	0.38	0.15	0.15	0.15	0.46	0.39	0.53	0.31	0.23	0.46	0.54	
36 OTUK26	0.15	0.54	0.23	0.15	0.16	0.23	0.16	0.16	0.16	0.38	0.23	0.38	0.39	0.23	0.54	0.23	
37 OTUE19	0.31	0.70	0.39	0.31	0.31	0.38	0.31	0.31	0.31	0.54	0.38	0.54	0.54	0.39	0.70	0.38	
38 OTUE18	0.15	0.54	0.23	0.15	0.15	0.23	0.15	0.15	0.15	0.38	0.23	0.38	0.38	0.23	0.54	0.23	
39 OTUD14	0.53	0.84	0.45	0.53	0.38	0.61	0.38	0.38	0.38	0.68	0.61	0.77	0.38	0.45	0.38	0.85	
40 OTUI24	0.23	0.54	0.15	0.23	0.08	0.31	0.08	0.08	0.08	0.38	0.31	0.46	0.31	0.15	0.46	0.47	
41 OTUJ25	0.23	0.62	0.31	0.23	0.23	0.31	0.23	0.23	0.23	0.46	0.31	0.46	0.46	0.31	0.62	0.31	
42 OTUG22	0.45	0.76	0.38	0.46	0.30	0.53	0.30	0.30	0.30	0.61	0.53	0.68	0.46	0.38	0.61	0.69	
43 OTUA2	0.38	0.69	0.30	0.38	0.23	0.46	0.23	0.23	0.23	0.53	0.46	0.61	0.31	0.31	0.47	0.62	
44 OTUD13	0.61	0.84	0.53	0.61	0.46	0.69	0.46	0.46	0.46	0.69	0.69	0.84	0.46	0.54	0.46	0.85	
45 OTUA6	0.61	0.92	0.53	0.61	0.46	0.69	0.45	0.46	0.46	0.76	0.69	0.84	0.46	0.54	0.47	0.85	
46 OTUH23	0.76	1.07	0.68	0.76	0.60	0.84	0.60	0.60	0.60	0.91	0.84	0.99	0.76	0.69	0.92	1.00	
47 OTUA5	0.61	0.92	0.54	0.62	0.46	0.69	0.46	0.46	0.46	0.77	0.69	0.84	0.54	0.54	0.70	0.86	
48 OTUC9	0.23	0.47	0.16	0.23	0.08	0.31	0.08	0.08	0.08	0.31	0.31	0.47	0.23	0.16	0.39	0.47	
49 OTUE16	0.46	0.76	0.38	0.46	0.30	0.54	0.30	0.30	0.30	0.61	0.54	0.69	0.46	0.38	0.61	0.70	
50 OTUA1	0.23	0.69	0.31	0.23	0.23	0.31	0.23	0.23	0.23	0.54	0.31	0.46	0.38	0.31	0.54	0.46	
51 OTUD15	0.54	0.77	0.46	0.54	0.38	0.61	0.38	0.38	0.38	0.61	0.62	0.77	0.38	0.46	0.38	0.77	
52 OTUB7	0.15	0.54	0.23	0.15	0.15	0.23	0.15	0.15	0.15	0.38	0.23	0.38	0.30	0.23	0.46	0.39	
53 OTUC11	0.31	0.55	0.23	0.31	0.15	0.39	0.15	0.15	0.15	0.39	0.39	0.54	0.31	0.23	0.47	0.55	
54 OTUC10	0.16	0.40	0.08	0.16	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.24	0.24	0.39	0.15	0.08	0.31	0.32	

33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49

33 OTUE20	-																
34 OTUF21	0.62	-															
35 OTUA3	0.46	0.31	-														
36 OTUK26	0.08	0.54	0.31	-													
37 OTUE19	0.23	0.70	0.46	0.15	-												
38 OTUE18	0.08	0.54	0.31	0.00	0.15	-											
39 OTUD14	0.69	0.45	0.30	0.61	0.77	0.61	-										
40 OTUI24	0.39	0.46	0.23	0.23	0.39	0.23	0.53	-									
41 OTUJ25	0.15	0.62	0.39	0.08	0.23	0.08	0.69	0.31	-								

42 OTUG22	0.62	0.69	0.46	0.46	0.62	0.46	0.68	0.38	0.54	-								
43 OTUA2	0.39	0.31	0.39	0.39	0.54	0.39	0.38	0.31	0.47	0.53	-							
44 OTUD13	0.62	0.85	0.62	0.62	0.77	0.62	0.54	0.54	0.69	0.76	0.62	-						
45 OTUA6	0.70	0.85	0.61	0.62	0.77	0.62	0.54	0.54	0.70	0.76	0.61	0.46	-					
46 OTUH23	0.92	0.99	0.76	0.77	0.93	0.77	1.00	0.68	0.85	0.91	0.83	1.07	0.75	-				
47 OTUA5	0.70	0.70	0.62	0.62	0.78	0.62	0.54	0.54	0.70	0.77	0.46	0.85	0.54	0.76	-			
48 OTUC9	0.31	0.47	0.23	0.23	0.39	0.23	0.46	0.15	0.31	0.39	0.31	0.54	0.54	0.69	0.55	-		
49 OTUE16	0.62	0.46	0.08	0.46	0.62	0.46	0.38	0.38	0.54	0.61	0.46	0.77	0.76	0.91	0.69	0.39	-	
50 OTUA1	0.39	0.62	0.39	0.23	0.39	0.23	0.61	0.31	0.31	0.54	0.46	0.69	0.69	0.84	0.70	0.31	0.54	
51 OTUD15	0.54	0.77	0.54	0.54	0.69	0.54	0.46	0.46	0.62	0.69	0.54	0.38	0.39	0.99	0.77	0.46	0.69	
52 OTUB7	0.23	0.54	0.31	0.15	0.31	0.15	0.53	0.23	0.23	0.46	0.38	0.61	0.61	0.76	0.62	0.23	0.46	
53 OTUC11	0.39	0.55	0.31	0.31	0.47	0.31	0.53	0.23	0.39	0.47	0.39	0.62	0.62	0.77	0.63	0.23	0.47	
54 OTUC10	0.16	0.39	0.15	0.08	0.24	0.08	0.46	0.08	0.16	0.31	0.23	0.46	0.46	0.62	0.47	0.08	0.31	

	50	51	52	53	54
50 OTUA1	-				
51 OTUD15	0.62	-			
52 OTUB7	0.23	0.53	-		
53 OTUC11	0.39	0.54	0.31	-	
54 OTUC10	0.24	0.38	0.16	0.15	-

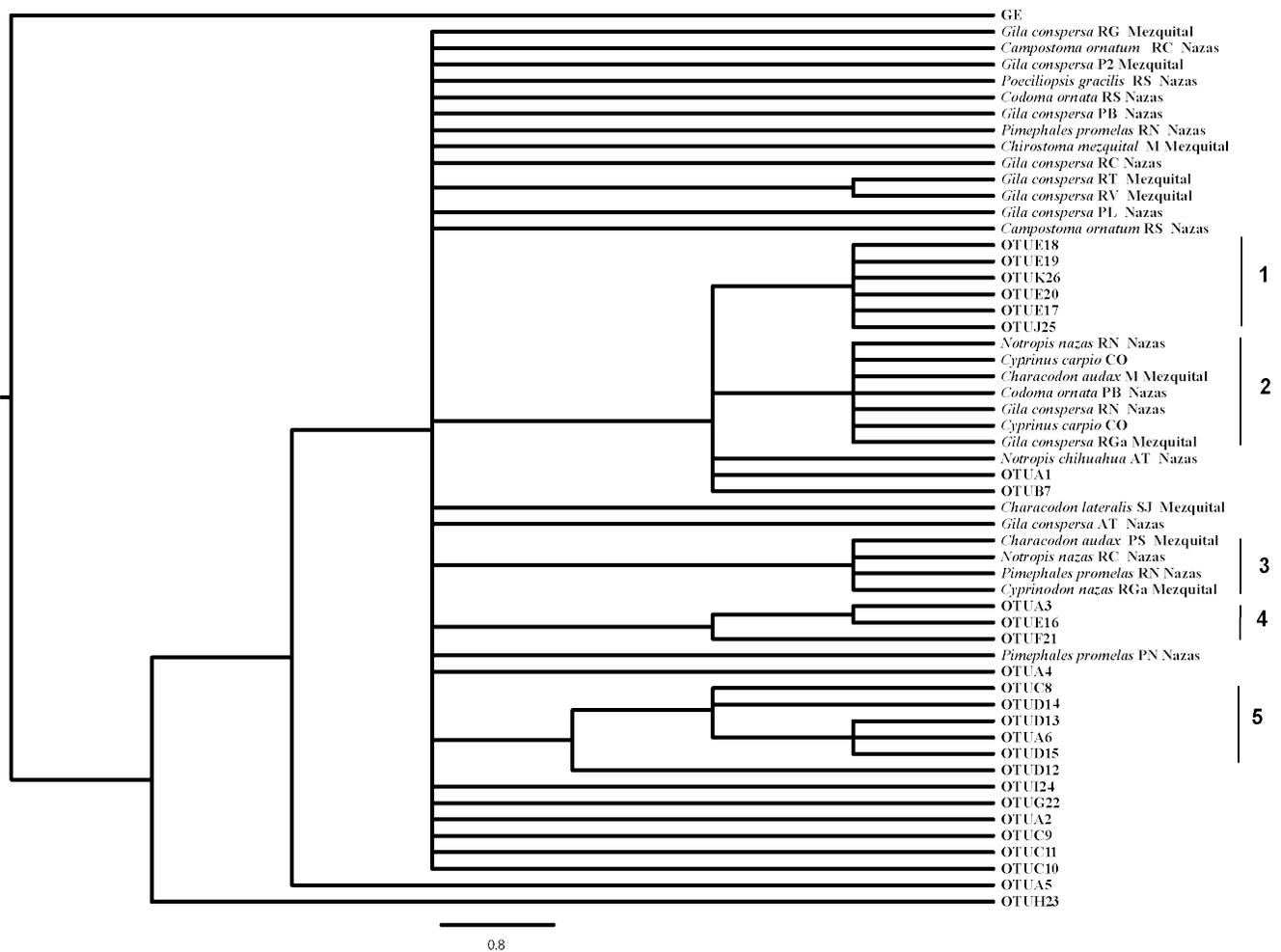


Fig. 11. Árbol de consenso estricto basado en el análisis de Parsimonia de 54 taxones de *B. acheilognathi* y *B. claviceps* como grupo externos utilizando el ITS1, el gen ribosomal 5.8S e ITS2. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver tabla 6 para puntualización de la localidad). Del OTU A1 al L1 ver tabla 9 para puntualización de la localidad.

El clado dos incluye a individuos de *B. acheilognathi* colectados en: *Notropis nazas* del Río Nazas, *Characodon audax* del Manantial de la caza de UMA, *Codoma ornata* de Peñón Blanco del Río Nazas, *Notropis chihuahua* de Arroyo Torreones, dos ejemplares de *Gila conpersa* uno del Río Nazas y otro del Río Guatimape y dos ejemplares de *Cyprinus carpio* colectados en la cantera oriente en Ciudad Universitaria, el tercer clado obtenido esta compuesto por individuos de *Characodon audax* de Pino Suarez, *Notropis nazas* del Río Covadonga, *Pimephales promelas* del Río Nazas y *Cyprinodon nazas* del Río Guatimape, lo cual nos indica la inexistencia de una concordancia entre los individuos de *B. acheilognathi* secuenciados, ni en términos de los hospederos a los que parasitan, ni a las localidades (o incluso cuencas hidrográficas) en las que se recolectaron.

Por último la Figura 12 muestra el resultado del análisis de máxima verosimilitud de individuos de *B. acheilognathi* basado en los ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5,8S tanto de individuos procedentes del estado de Durango como de individuos de otras partes del mundo. El valor del árbol es de $-\ln=3401.16585$ A pesar de que el árbol de ML no muestra una estructura como resultado de la escasa o nula variación genética, se recuperan los mismos cinco grupos monofiléticos que se observan en el análisis de MP. De igual manera los grupos formados no reflejan ninguna estructuración geográfica ni hospedatoria.

En la tabla 11 se presenta la comparación de las variables analizadas en el presente trabajo, con muestras de *B. acheilognathi* en peces de Durango, con los datos obtenidos por Luo *et al.*, (2002) para la misma especie de céstodos pero con un amplio rango geográfico. Así mismo se presenta el resultado considerando una matriz combinada con ambos tipos de datos. Es interesante resaltar que en ninguno de los clados que se formaron tanto en análisis de MP como de ML se anidaron las secuencias de este trabajo con el previamente realizado por Luo y colaboradores. Aún así, el resultado más importante es que las secuencias de ITS's de las poblaciones de *B. acheilognathi* de Durango, México, no difieren de aquellas obtenidas por estos autores con lo cual, a pesar de ser una especie invasora y de haber sido introducida hace relativamente pocos años a México no presenta variación genética para estos marcadores moleculares. El trabajo de Luo *et al.*, (2002) sólo consideró ITS's y no el marcador mitocondrial que aquí utilizamos, sin embargo tampoco este marcador mostró divergencias genéticas para la especie de céstodo.

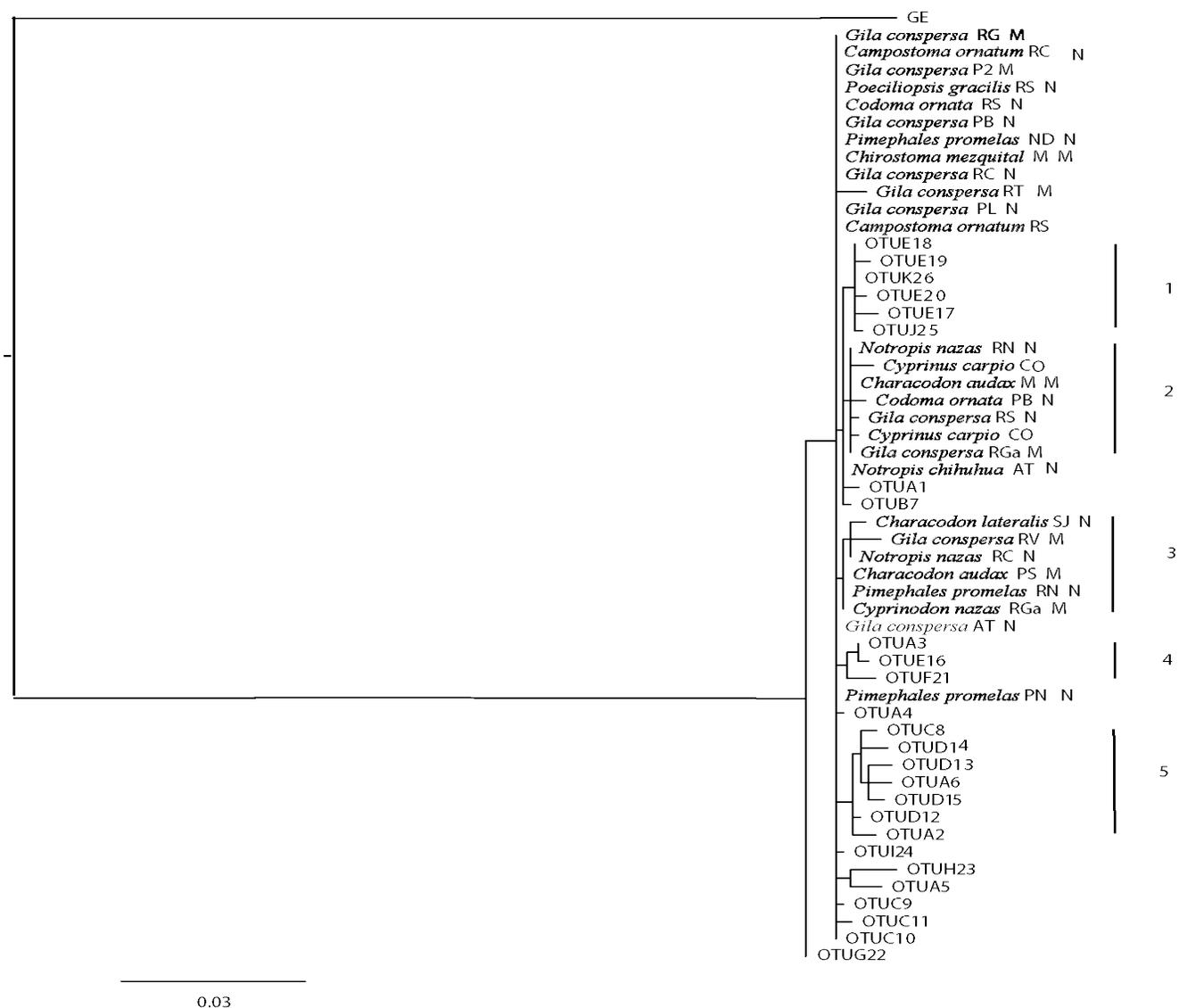


Fig. 12. Árbol de máxima verosimilitud de 28 ejemplares de *B. acheilognathi*. del estado de Durango y 26 taxones del trabajo de Luo *et al.*, (2002), basado en los ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S. M=Cuenca del Río Mezquital. N=Cuenca del Río Nazas. En mayúsculas el nombre de la localidad (ver tabla 6 para puntualización de la localidad). Del OTU A1 al L1 ver tabla 10 para puntualización de la localidad.

Tabla 11. Comparaciones entre secuencias de Luo *et al.*, (2002), Durango y el conjunto de las dos anteriores.

	Luo <i>et al.</i> , (2002)	Durango	Durango+Luo <i>et al.</i> , (2002)
Número total de caracteres	1425	1342	1420
Número de caracteres variables	321	227	244
Número de caracteres informativos	22	13	44
Longitud del ITS1	553 a 557 pb	559 a 565 pb	553 a 565 pb
Longitud del ITS2	553 a 615 pb	578 a 592 pb	553 a 615 pb
Variación total de ambos ITS's	0.07 a 1.54%	0 a 1.29%	0 a 1.07%
Variación total ITS1	0 a 0.9%	0 a 1.07%	0 a 0.72%
Variación total ITS2	0 a 6.6%	0 a 2.07%	0 a 2.23%
Variación de ingroup con respecto al outgroup en el ITS1	1.8 a 2.4%	1.45 a 2.36%	1.44 a 2.01%
Variación del ingroup con respecto al outgroup en el ITS2	62.7 a 72.1%	39.05 a 40.20%	37.39 a 38.84%
Variación del ingroup y del outgroup para los tres marcadores ribosomales	16.27 a 17.45%*	17.43 a 18.43%	15.94 a 17.69%

*Fue realizado por nosotros en el programa PAUP.

Asímismo, Luo *et al.*, (2002) reportan una variación hasta del 6.6% en el ITS2 de sus muestras; la comparación del mismo marcador para las muestras de Durango alcanzó una variación de 0 a 1.29%, mientras que la comparación de nuestros datos con aquellas obtenidas por Luo y colaboradores fue de entre 0 y 2.07% (Tabla 11). El porcentaje de variación del 6.6% es muy inferior al encontrado entre las secuencias de *B. acheilognathi* de diversas localidades y aquellas de *B. claviceps* que fue considerada en nuestro análisis, pues aquí se obtiene una variación de 15.94 a 18.43% en los diferentes alineamientos. Esta especie resulta agruparse dentro del clado monofilético que contiene ejemplares de *B. acheilognathi* y *Bothriocephalus* sp. (Skerikova *et al.*, 2004).

En este trabajo, encontramos que *B. acheilognathi* es una especie con poca variación intraespecífica a pesar del aislamiento que han sufrido sus poblaciones en localidades particulares de México. Es posible que una mayor variación exista si se analiza un mayor número de ejemplares con un amplio rango geográfico y además, si se emplean otros marcadores moleculares que indiquen diferencias

intraespecíficas de manera evidente, como por ejemplo los microsatélites. Es probable que las poblaciones analizadas de México hayan experimentado un cuello de botella, por el efecto fundador que ocurre en algunas especies invasoras (Dlugosch y Parker, 2008; Whitney y Gabler, 2008) y es debido a esta razón que en los individuos de *B. acheiloganthi* analizados no existió una gran divergencia genética. Sin embargo, es factible que las poblaciones se establezcan en los lugares donde ya colonizó y quizá en un lapso corto de tiempo puedan experimentar una divergencia apreciable.

La red de genotipos (Fig. 13) muestra que los ejemplares de Durango se encuentran agrupados principalmente en una área de ésta red, habiendo como máximo cuatro genotipos faltantes entre muestra y muestra, a diferencia de los ejemplares de Luo y colaboradores que se encuentran de manera más dispersa en dicha red y con 7 genotipos ausentes entre ellos.

En general se observa que existe un sesgo apreciable en el muestreo de Luo *et al.*, (2002) y que en los ejemplares de Durango resalta una mayor homogenización de los genotipos, es decir, una menor variación (11 genotipos, ver Fig. 14) en contraste con las muestras de otros países en las que se encuentran 25 genotipos. El genotipo A mostrado en la figura 14 tiene una frecuencia de 14, lo cual indica que 14 individuos comparten el mismo genotipo, sin embargo esta agrupación no tiene correspondencia con una estructuración geográfica ni hospedatoria. En la tabla 12 podemos apreciar que el número de sitios polimorficos, Singletons, sitios parsimoniosamente informativos, así como el número de haplotipos/genotipos, diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (P_i) es siempre menor en los ejemplares de Durango que en los del resto del mundo. Por lo tanto y retomando lo antes mencionado, es evidente una menor variación genética en los individuos introducidos en México en donde se presenta un fenómeno de cuello de botella por el efecto fundador característico de las especies invasoras, pero donde el intervalo geográfico es mucho más reducido que el considerado en el trabajo de Luo *et al.*, (2002).

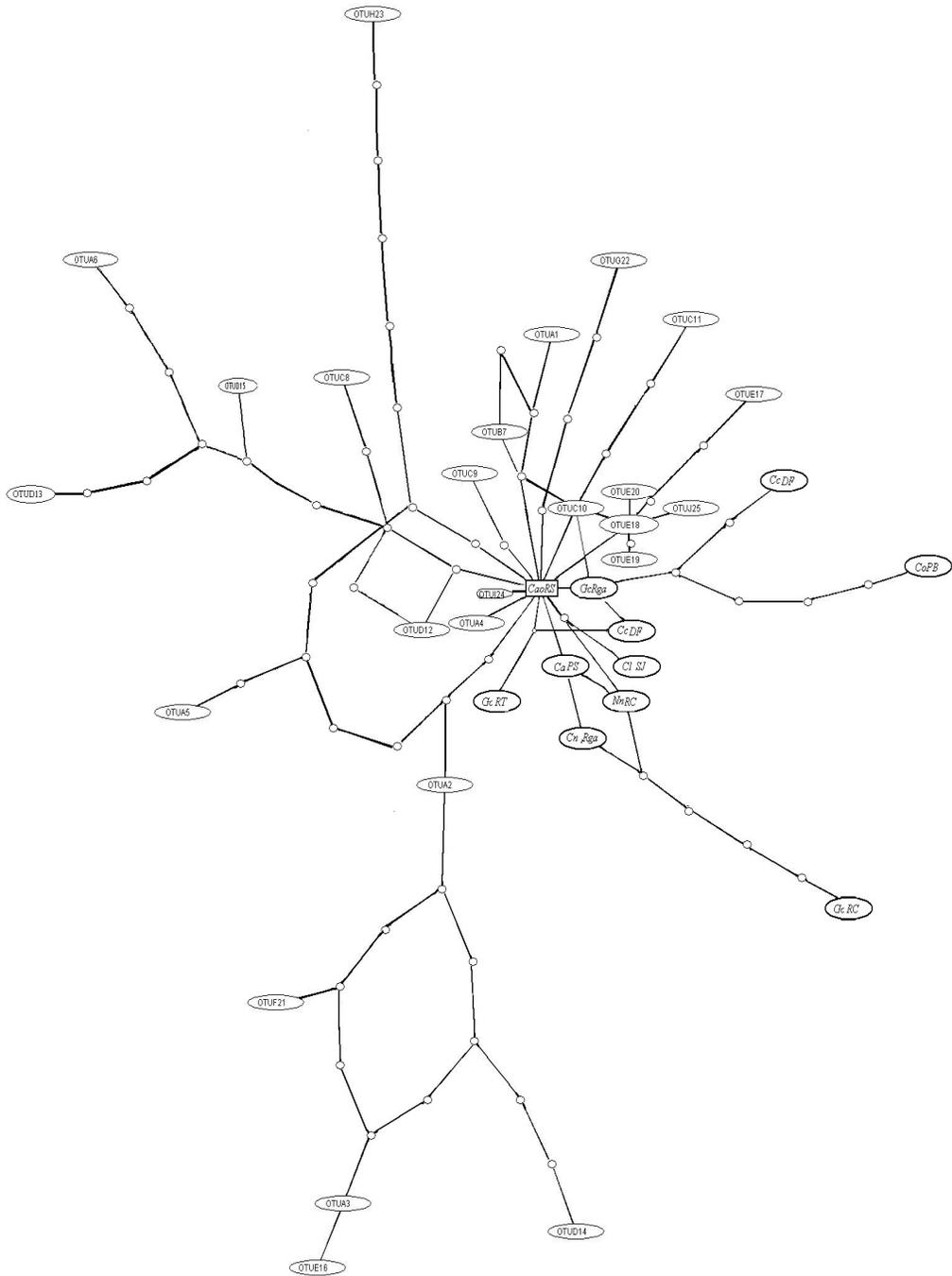


Fig. 13. Red de 36 genotipos de 54 ejemplares de *Bothriocephalus acheilognathi* basados en ITS's

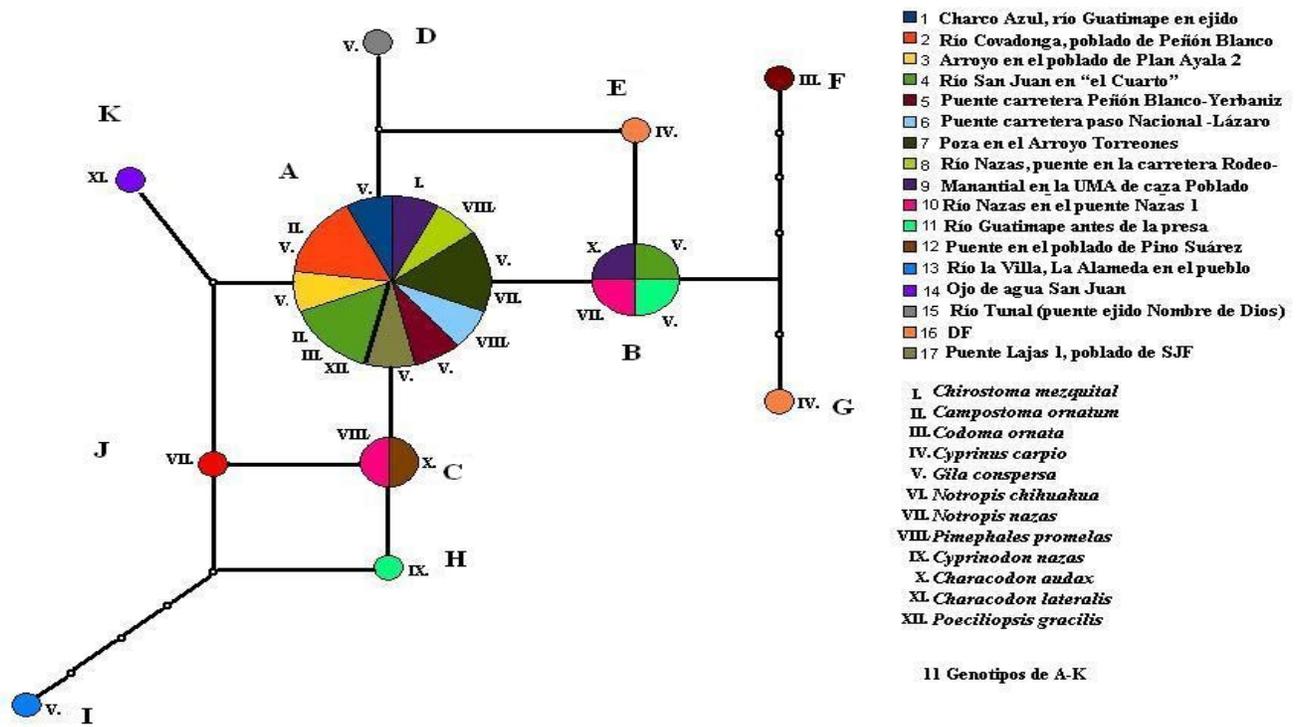


Fig. 14. Red de 28 genotipos de ejemplares de *Bothriocephalus acheilognathi* basados en ITS's pertenecientes a dos cuencas hidrológicas en el estado de Durango. Genotipo A (frecuencia: 14), genotipo B (frecuencia: 4), genotipo C (frecuencia: 2), genotipos D-K (Frecuencia de 1).

Tabla 12. Caracterización genética de *Bothriocephalus acheilognathi* utilizando ITS's y una sección del gen mitocondrial *Cox1*

	Luo <i>et al.</i>,* (2002)ITS's	Luo+Durango ITS's	Durango ITS's	Durango Cox
Número de secuencias	26	54	28	18
Longitud de la secuencia	1414	1414	1340	327
Sitios sin gaps	1234	1233	1305	0
Gaps	180	181	35	0
Sitios monomorficos	1187	1169	1288	
Sitios polimorficos	47	64	17	4
Singletons	39	50	11	4
Sitios informativos	8	14	6	0
Número de haplotipos/genotipos	250	34	11	2
Diversidad Haplotípica Hd:	0.997	0.867	0.741	0.111
Diversidad Nucleotídica Pi:	0.00409	0.00217	0.00165	0.00135

* Los valores de *Luo et al.*, fueron obtenidos por nosotros en el programa DNAsp

V. Conclusiones

Bothriocephalus acheilognathi presenta una amplia distribución en peces de Durango al encontrarse en 21 de las 31 especies analizadas y en 28 de las 46 localidades muestreadas. *B. acheilognathi* presenta baja especificidad hospedatoria, aunque parece tener un cierto grado de preferencia a parasitar ciprínidos; el céstodo se reporta en estado grávido en especies endémicas de México tales como *Notropis nazas* y *Chirostoma mezquital*.

El céstodo presenta una escasa o nula variación genética tanto en los marcadores ribosomales (ITS1, 5,8S e ITS2) como en el mitocondrial (*Cox1*). Los análisis de MP y ML basados en secuencias de ITS's y el gen 5.8s y el gen mitocondrial *Cox1* no mostraron formación de grupos, ya sea por afinidad a un hospedero, por cuenca hidrológica o por una localidad en particular.

No existe variación genética entre las poblaciones de *B. acheilognathi* de México y aquellas reportadas para poblaciones en otras partes del mundo (China, Republica Checa, Inglaterra, Australia y Hawái) con relación a los marcadores ribosomales.

La escasa o nula variación genética de los individuos de *B. acheilognathi* en Durango puede ser resultado de fenómenos de cuello de botella por el efecto fundador que ocurre en especies invasoras, existiendo la posibilidad de que una vez establecidos puedan experimentar una divergencia apreciable en corto tiempo.

VI. Literatura Citada

Blair, D., A. Campos, M. P. Cummings y J. P. Lacleste. 1996. Evolutionary Biology of Parasitic Platyhelminths: The Role of Molecular Phylogenetics. *Parasitology Today* **12:66-71**.

Brooks, D. R., V. León-Regagnon y G. Pérez-Ponce de León. 2001. Los parásitos y la Biodiversidad. En: Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Hernández, H. M., A. N. García-Aldrete, F. Álvarez y M. Ulloa (eds). Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. 413pp.

Brooks, D. R. y E. P. Hoberg. 2006. Systematics and Emerging Infectious Diseases: From Management to Solution. *Journal of Parasitology* **92:426-729**.

Bush, A. O., J. C. Fernández, G. W. Esch y J. R. Seed. 2001. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. University Press, Cambridge. 566pp.

Clement, M., D. Posada, y K. A. Crandall. 2000. TCS: a Computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9:1657-1660**.

Cousyn, C., L. De Meester, J. K. Colbourne, L. Brendonck, D. Verschuren y F. Volckaert. 2001. Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98:6256-6260**.

Dlugosch, K. M. e I. M. Parker. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17:431-449**.

Futuyma, D. J. 2003. Principales líneas de estudio en la Biología evolutiva contemporánea. *Ciencias* **71:16-28**.

García-Prieto, L. y D. Osorio-Sarabia. 1991. Distribución actual de *Bothriocephalus acheilognathi* en México. Anales del instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología **62:523-526.**

Hall, T. A. 1999. Bioedit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41:95-98.**

Hillis, D. M., B. K. Mable y C. Moritz, 1996. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. En: Molecular Systematics. D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.) Sinauer, Sunderland, Massachusetts. p. 321-383.

Hillis, D. M. y M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology **66:411-453p.**

Kim, K. H., H. K. Jeon, S. Khang, T. Sultana, G. J. Kim, K. S. Eom y J. K. Park. 2007. Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Diphyllobothriidae: Cestoda), and Development of Molecular Markers for Differentiating Fish Tapeworms. Molecules and Cells **23:379-390.**

Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. A. G. T. Editor. México. D. F. .43pp.

López-Jiménez, S. 1980. Céstodos de Peces I. *Bothriocephalus (Cleistobothrium) acheilognathi* Cestoda: Bothriocephalidae. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología **51:69-84.**

Le, T. H., D. Blair y D. P. McManus. 2002. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. Trends in Parasitology **18:206-213.**

Leung, T. L. F. y R. Poulin, 2010. Infection success of different trematode genotypes in two alternative intermediate hosts. Evidence for intraspecific specialization?. Parasitology **137:321-328.**

Luo, H. Y., P. Nie, Y. A. Zhang, G. T. Wang y W. J. Yao. 2002. Molecular variation of *Botriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Pseudophyllidea) in different fish host species based on ITS rDNA sequences. *Systematic Parasitology* **52:156-166**.

Miller, R. R., W. L. Minckley y S. M. Norris. 2009 *Freshwater fishes of Mexico*. The University of Chicago Press. 490 pp.

Olson, P. D. y V. V. Tkach. 2005. Advances and Trends in the Molecular Systematics of the Parasitic Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* **60:165-243**.

Pérez-Ponce de León, G., R. Rosas-Valdez, B. Mendoza-Garfias, R. Aguilar-Aguilar, J. Falcón-Ordaz, L. Garrido-Olvera y R. Pérez-Rodríguez. 2009. Survey of the endohelminth parasites of freshwater fishes in the upper Mezquital River Basin, Durango State, México. *Zootaxa* **2164:1-20**.

Pérez-Ponce de León, G., R. Rosas-Valdez, R. Aguilar-Aguilar, B. Mendoza-Garfias, C. Mendoza-Palmero, L. García-Prieto, A. Rojas-Sánchez, R. Briosio-Aguilar, R. Pérez-Rodríguez y O. Domínguez-Domínguez. 2010. Helminth parasites of freshwater fishes in the Nazas River Basin, Northern Mexico. *Check List: Journal of species list and distributions* **6:25-35**.

Pérez-Ponce de León, G. y A. Choudhury. 2010. Parasite inventories and DNA-based Taxonomy. lessons from helminths of freshwater fishes in a megadiverse country. *Journal of parasitology* **96:236-244**.

Pérez-Ponce de León, G. y S. A. Nadler. 2010. What We Don't Recognize Can Hurt Us: A Plea for Awareness About Cryptic Species. *Journal of Parasitology* **96:453-464**.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25:1253-1256**.

Poulin, R. y D. B. Keeney. 2008. Host specificity under molecular and experimental scrutiny. *Trends in Parasitology* **24:24-28.**

Razo-Mendivil, U. J. 1998. Utilización de caracteres morfológicos y moleculares para diferenciación de tres especies de *Glyphelmins* (Digenea), parásitos de anuros de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 50 pp..

Razo-Mendivil, U. J. 2004. Sistemática del género *Glyphelmins* Stafford, 1905 (Platyhelminthes: Digenea). Tesis de Doctorado. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 50 pp.

Rojas-Sánchez, A. y L. García-Prieto. 2008. Distribución actual del céstodo *Bothriocephalus acheilognathi* en México. Memorias del XXV simposio sobre fauna silvestre. Universidad Nacional Autónoma de México. 89-93pp.

Rosas-Valdez, R. 2008. Biogeografía Histórica de Helminthos endoparásitos de Siluriformes (Osteichthyes) dulceacuícolas de México. Tesis Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 249pp.

Salgado-Maldonado, G., S. Guillén-Hernández y D. Osorio-Sarabia. 1986. Presencia de *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Bothriocephalidae) en peces de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoológica* **57:213-218.**

Salgado-Maldonado, G. y R. F. Pineda-López. 2003. The Asian fish tapeworm *Bothriocephalus acheilognathi*: a potential threat to native freshwater fish species in Mexico. *Biological Invasions* **5:261-268.**

Salgado-Maldonado, G. 2006. Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa* **1324:1-357.**

Schäperclaus, W., H. Kulow y K. Schreckenbach. 1991. Fish Diseases. Akademic-Verlag. Berlin. Alemania. Vol. 2. 1398 pp.

Singer, M. C., C. D. Thomas y C. Parmesan. 1993. Rapid human induced evolution of insect host associations. *Nature* **366:681-683**.

Skerikova, A., V. Hypsa y T. Scholz. 2004. A paraphyly of the genus *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 (Cestoda: Pseudophyllidea) inferred from internal transcribed spacer-2 and 18s ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* **90:612-617**.

Swofford, D.L. 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22:4673-4680**.

Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: La ecología molecular de plantas y animales. Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (Comps). INE/CONABIO, México. 608 pp.

Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T. A. Gutiérrez-García. 2008. Filogeografía. En: Conceptos y métodos en biogeografía.. Vargas, J.M., R. Real y J.J. Morrone (eds). Sociedad Entomológica Aragonesa, España.

Velázquez-Velázquez, E., J. Schmitter-Soto y S. Domínguez-Cisneros. 2008. Threatened fishes of the world: *Profundulus hildebrandi*; Miller, 1950 (Profundulidae). *Environmental Biology of Fishes* **84:345-396**.

Verneau, O., F. M. Catzefflis y F. Renaud. 1997a. Molecular relationships between closely related species of *Bothriocephalus* (cestoda: plathyhelminthes). *Molecular phylogenetics and evolution* **7:101-207**.

Verneau, O., F. Renaud y F. M. Catzefflist. 1997b. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. Molecular Biology and Evolution 14:630-636.

Whitney, K. D y C. A. Gabler. 2008. Rapid evolution in introduced species, invasive traits and recipient communities: challenges for predicting invasive potential. Diversity and Distributions 14: 569-580.

Apéndice

Técnica de Tinción

Después de la fijación del parásito se llevó a cabo su tinción.

Paracarmin de Meyer

1. El parásito se lava en alcohol al 70% hasta que quede libre de cualquier residuo del fijador. Procurar hacer varios cambios.
2. Posteriormente lavar el parásito en alcohol al 96% por 10 minutos. Volver a repetir dos veces
3. Teñir con Paracarmin de Meyer de 5 a 8 minutos.
4. Lavar con alcohol al 96% para quitar el exceso de colorante durante 5 o más minutos.
5. aclarar en alcohol acidulado al 2% con ácido clorhídrico, hasta que los bordes del gusano queden blancos y los órganos internos visiblemente teñidos.
6. Posteriormente lavar con alcohol al 96% por uno o dos minutos para evitar que el alcohol ácido siga actuando.
7. Lavar en alcohol absoluto durante 20 o 30 minutos.
8. Aclarar en aceite de clavos, xilol o salicilato de metilo no mas de 15 minutos.
9. Montar con bálsamo de Canadá

Técnica molecular

Digestión de Tejidos

1. Fragmentar el tejido y colocarlo en un tubo eppendorf de 2.0 ml.
2. En 10 µl de agua destilada lavar los fragmentos por 10 minutos
3. Retirar el agua y con una pipeta retirar el agua y dejar secar para posteriormente adicionar los reactivos
4. Adicionar al tubo:
 - 500µl de Buffer STE
 - 25µl de 10 mg/ml de Proteinasa K (se encuentra en el refrigerador 4°C)
 - 75µl de SDS 10%.
5. Agitar bien, e incubar por 24 Hrs. a 50°C. Agitar ocasionalmente durante el periodo de incubación.

Extracción del DNA (Método fenol-cloroformo)

1. Agitar las muestras con el vortex.
2. Agregar a cada una de las muestras 600 µl de fenol.
3. Por 5 minutos incubar a temperatura ambiente pero cuidando de que las fases no se separen, agitar periódicamente
4. Centrifugar a velocidad alta (13 000 revoluciones) en un periodo de 5 minutos
5. Con ayuda de una micropipeta tomar la parte superior acuosa de los tubos eppendorf y colocarlos en otro limpio previamente etiquetado, tener cuidado para no tomar parte de la capa inferior.

6. Se agregan 600µl de Cl (Cloroformo), mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos agitar para no permitir que las fases se separen.
7. Centrifugar a 13 000 revoluciones por 3 minutos,
8. Cuidadosamente remover la capa superior acuosa con una micropipeta y transferir a un tubo limpio cuidando de no alterar la interfase.
9. Se toman 45µl de 2MNaCl (cloruro de Sodio 2 Molar) y agregar 2.5 veces el volumen de la muestra de alcohol al 96%, es decir, 1125 µl de alcohol helado $-(-20^{\circ}\text{C})$
10. Precipitar el DNA dejando reposar por 24 Hrs en el refrigerador de -20°C .
11. Centrifugar el precipitado por 10 minutos a velocidad alta.
12. Lavar el botón obtenido de ADN con 100µl de alcohol 70%.
13. Centrifugar por 10 minutos a 13 000 revoluciones por minuto.
14. Retirar el alcohol con la micropipeta cuidando de no llevarse el botón.
15. Secar en centrifuga con vacío

Preparar la reacción de PCR.

1. Para preparar la reacción de PCR se mezclan en un tubo de 0.2 µL las siguientes sustancias:

Sustancias	Método estándar	Presente estudio ITS's	Cox1
DNTP's	2.5	1	1
ClMg	1.25	1.25	0.625
Primer	1	1	0.5
Buffer	2.5	1	
Taq	0.125	0.125	0.125
ddH2O	*	*	*
DNA	2	2	2-5

*La cantidad de ddH2o va a depender del volumen total de las sustancias utilizadas, de tal forma que como volumen final tendremos 25µl

2. Una vez preparada la mezcla de reacción de PCR se agita con el vortex por unos segundos
3. Las muestras se colocan para correr una PCR. No olvidar que se agrega un control negativo

Valoración de una PCR

Para evaluar que tanta cantidad de DNA fue amplificada en la reacción de PCR se necesita hacer una electroforesis.

1. Par realizar la mezcla utilizamos un tubos de 0.2 ml con las siguientes sustancias.

- Bromofenol 2 µl de Bromofenol
- Reacción de PCR 2 µl de la muestra
- Escalera * 1 µl

*La escalera se coloca sola 1 µL en uno de los pozos del gel

2. Se toman cada una de las muestras, el control y la escalera con una pipeta y se coloca en uno de los pozos del gel para electroforesis.
3. El voltaje en la cámara de electroforesis es a 89-90V se coloca entre 10 y 15 minutos.
4. Se procede a tomar una foto en la cual se observa la brillantes de las bandas para su evaluación con respecto a la escalera.

Preparación de reacción de Secuencia

Purificación de las muestras

1. En columnas de sephadex previamente preparadas se retira la base y se coloca un tubo de 2mL, retirar posteriormente la tapa. Esperar a que se filtre el contenido.
2. Centrifugar las columnas a 2800 rpm durante 2 minutos
3. deposita la reacción de de PCR
4. El DNA obtenido de la reacción de PCR se filtra a través de la columna.
5. Centrifugar a 2800 rpm durante 2 minutos

Reacción de secuencia con las siguientes sustancias:

Big Dye	1 μ l
Buffer	1 μ l
Primer	1 μ l
DNA	1 μ l*
H2O	6 μ l**

*La cantidad de DNA que se utiliza para la reacción de secuencia puede variar dependiendo la cantidad de DNA concentrado en la muestra extraída.

**según la evaluación de la amplificación

6. Colocar los tubos de las muestras en el aparato especificar Programa.
7. Se lleva a cabo una segunda purificación con columnas de sephadex
8. Los purificados de la reacción de secuenciación se mantienen a 4°C cubiertas

Glosario

- botrio:** Surco o estriá dorsal o ventral, algunas veces modificado en el escólex de céstodos
- céstodo:** Organismo parásito aplanado dorsoventralmente, dividido en tres regiones, escólex, cuello y estróbilo.
- cirro:** Órgano copulador quitinoso de tremátodos y céstodos.
- coracidio:** Embrión de céstodos pseudofilidios que está delimitados por un embrióforo ciliado.
- escólex:** Órgano con el que el parásito se adhiere a la mucosa intestinal de su hospedero definitivo.
- proglótido:** Segmento del estróbilo de un céstodo
- proglótido grávido:** Segmento maduro del estróbilo de un céstodo que posee huevos embrionados.