



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

DELIMITACIÓN DE ESPECIES Y DIVERSIDAD GENÉTICA
DEL GÉNERO *NEOECHINORHYNCHUS* STILES Y HASSALL 1905
DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARLOS DANIEL PINACHO PINACHO

TUTOR PRINCIPAL : DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN. INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. JOSÉ JAIME ZÚNIGA VEGA. FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2016.



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

**DELIMITACIÓN DE ESPECIES Y DIVERSIDAD GENÉTICA
DEL GÉNERO *NEOECHINORHYNCHUS* STILES Y HASSALL 1905
DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARLOS DANIEL PINACHO PINACHO

TUTOR PRINCIPAL : DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN. INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. JOSÉ JAIME ZÚNIGA VEGA. FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2016.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **PINACHO PINACHO CARLOS DANIEL** con número de cuenta **510020792** con la tesis titulada: **"Delimitación de especies y diversidad genética del género Neoechinorhynchus Stiles y Hassall 1905 de México y Centroamérica"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA**:

Presidente:	DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Vocal:	DR. DAVID SEBASTIAN GERANDT
Secretario:	DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
Suplente:	DRA. BLANCA ESTELA HERNANDEZ BAÑOS
Suplente	DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx, a 14 de junio de 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo el apoyo logístico brindado durante los 4 años

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado

Al Dr. Martín García Varela por su interés en cada momento de que las cosas marcharan de la mejor manera, por el apoyo económico, académico y moral. (Gracias tutor)...

Al comité Tutorial, Dr. Gerardo Pérez Ponce de León y Dr. Jaime Zúñiga por sus comentarios y sugerencias para mejorar el proyecto en cada tutorial

Dedicatoria

*Este logro académico está dedicado al motor de mi vida: **Karla Pinacho Pérez** y a mis padres: **Sebastián Pinacho Ríos** y **Carmela Pinacho Ramírez***

Índice

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Métodos para la delimitación de especies.....	9
1.1.1. Los primeros métodos para la delimitación de especies.....	10
1.1.2. Nuevos métodos, nuevos datos y enfoques para la delimitación de especies.....	12
1.1.3. Métodos de delimitación de especies utilizados en parásitos.....	15
1.2. Teoría de especiación.....	18
1.2.1. Modos de especiación.....	19
1.2.2. Mecanismos de especiación.....	22
1.3. Marcadores moleculares.....	23
1.4. Especies del género <i>Neoechinorhynchus</i> como sistema de estudio.....	26
1.4.1. Ciclo de vida de <i>Neoechinorhynchus</i>	29
Literatura citada.....	31
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo general.....	49
2.1.1. Objetivos particulares.....	49
3. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	50
3.1. Pinacho-Pinacho C. D. , Pérez-Ponce de León G. y García-Varela M. (2012). Description of a new species of <i>Neoechinorhynchus</i> (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of <i>Dormitator latifrons</i> from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. <i>Parasitology International</i> , 61: 634–644.....	51
3.2. Pinacho-Pinacho C. D. , Sereno-Uribe A. L. y García-Varela M. (2014). Morphological and molecular data reveal a new species of <i>Neoechinorhynchus</i> (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from <i>Dormitator maculatus</i> in the Gulf of Mexico. <i>Parasitology International</i> , 63: 763–771.....	63
3.3. Pinacho-Pinacho C. D. , Sereno-Uribe A. L., Pérez-Ponce de León G. y	

García-Varela M. (2015). Checklist of the species of <i>Neoechinorhynchus</i> (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in fishes and turtles in Middle-America, and their delimitation based on sequences of the 28S rDNA. <i>Zootaxa</i> , 3985: 098–116.....	73
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	93
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	102
6. APÉNDICES.....	105
6.1. Un enfoque coalescente en la delimitación de especies en endoparásitos con complejos ciclos de vida: Un ejemplo en un grupo hiper-diverso (Acanthocephala, Neoechinorhynchidae, <i>Neoechinorhynchus</i>) en Centroamérica. En preparación.....	106
6.2. First Record of the Intermediate Host of <i>Pseudocorynosoma constrictum</i> Van Cleave, 1918 (Acanthocephala: Polymorphidae) in Central Mexico.....	140
6.3. Using mitochondrial and ribosomal DNA sequences to test the taxonomic validity of <i>Clinostomum complanatum</i> Rudolphi, 1814 in fish-eating birds and freshwater fishes in Mexico, with the description of a new species.....	142
6.4. Diversity of sea lice (Copepoda: Caligidae) parasitic on marine fishes with commercial and aquaculture importance in Chamela Bay, Pacific coast of Mexico by using morphology and DNA barcoding, with description of a new species of <i>Caligus</i>	144
6.5. Richness and similarity of helminth communities of the freshwater fish <i>Profundulus punctatus</i> (Pisces: Cyprinodontidae) from Oaxaca, Mexico.....	146
6.6. Morphological and molecular analyses of larval and adult stages of <i>Echinoparyphium recurvatum</i> von Linstow 1873 (Digenea: Echinostomatidae) from central Mexico.....	148
6.7. <i>Phyllodistomum spinopapillatum</i> sp. nov. (Digenea: Gorgoderidae), from the Oaxaca killifish <i>Profundulus balsanus</i> (Osteichthyes: Profundulidae) in Mexico, with new host and locality records of <i>P. inecoli</i> : Morphology, ultrastructure and molecular evidence.....	150
6.8. <i>Haliotrematoides</i> spp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) parasitizing <i>Lutjanus guttatus</i> (Lutjanidae) in two localities of the Pacific coast of Mexico, and	

their phylogenetic position within the Ancyrocephalinae through sequences of the 28S rRNA.....	152
6.9. Molecular and morphological characterization of <i>Austrodiplostomum ostrowskiae</i> Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas.....	154
6.10. Checklist of the helminth parasites of the genus <i>Profundulus</i> Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes, Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America.....	156
6.11. An integrative taxonomic study reveals a new species of <i>Tylodelphys</i> Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico.....	158
6.12. <i>Maritrema corai</i> n. sp. (Digenea: Microphallidae) from the white ibis <i>Eudocimus albus</i> (Linnaeus) (Aves: Threskiornithidae) in Mexico.....	160
6.13. Phylogenetic analysis using the 28S rRNA gene reveals that the genus <i>Paracreptotrema</i> Choudhury, Pérez-Ponce de León, Brooks and Daverdin, 2006 (Digenea: Allocreadiidae) is not monophyletic; description of two new genera and one new species.....	162

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Genoma mitocondrial de animales.....	25
Figura 2. Organización de genes del RNA ribosomal en Eucariontes.....	26
Figura 3. Microfotografía de <i>Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) brentnickoli</i> parásito de <i>Dormitator latifrons</i> de Laguna de Tres Palos, Guerrero, México.....	28
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Neoechinorhynchus rutili</i> (Müller 1780) Stiles y Hassall 1905.....	30

Resumen

El género *Neoechinorhynchus* es el grupo de acantocéfalos más diverso con aproximadamente 116 especies. Estos son endoparásitos principalmente de peces dulceacuícolas, marinos, estuarinos y tortugas dulceacuícolas con una distribución cosmopolita. La mayor diversidad de especies se concentra en Norteamérica, por lo cual se ha sugerido que ésta región podría ser su centro de radiación. Especies de *Neoechinorhynchus* en Centroamérica son comunes en especies de peces de las familias Cichlidae y Eleotridae (principalmente del género *Dormitator*). Los mecanismos de diversificación de *Neoechinorhynchus* son el resultado de los cambios en los sistemas hidrológicos y de los procesos de diversificación de sus huéspedes. *Neoechinorhynchus* representa un modelo excelente para realizar un análisis de delimitación de especies, análisis filogenéticos y biogeográficos para dilucidar la diversidad de especies y la historia evolutiva de este grupo en Centroamérica.

Los objetivos centrales de esta tesis fueron los siguientes: a) Realizar la reconstrucción filogenética de las especies de *Neoechinorhynchus* en Centroamérica. b) Delimitar las especies del género *Neoechinorhynchus* a través de métodos basados en árboles (GMYC, *General Mixed Yule-Coalescent model*, por sus siglas en inglés) y en distancias genéticas (ABGD, *Automatic Barcode Gap Discovery*, por sus siglas en inglés). c) Validar las hipótesis filogenéticas y de delimitación de especies a través de análisis de *Species Tree by Multispecies Coalescent*, por sus siglas en inglés (*BEAST). d) Conocer si los patrones filogenéticos de las especies de *Neoechinorhynchus* corresponden con la distribución de sus huéspedes. e) Evaluar las diferentes hipótesis filogenéticas y de delimitación de especies mediante el análisis morfológico de cada una de las especies de *Neoechinorhynchus*.

Entre agosto de 2012 y enero de 2016 se muestrearon 24 especies de huéspedes, en 57 localidades de cuatro países (México, Guatemala, Honduras y Costa Rica), en los cuales se muestrearon diferentes sistemas hidrológicos como ríos, lagos, lagunas, esteros, arroyos y oasis. En total se obtuvieron secuencias parciales de tres marcadores moleculares, citocromo oxidasa 1 (COI, 351 secuencias), espaciadores internos transcritos (ITS1+5.8S+ITS2, 329 secuencias), y de los dominios D2+D3 de la subunidad mayor del ADN ribosomal (28S, 277 secuencias).

Con base en los resultados de esta información generada durante cuatro años se publicaron tres artículos de investigación y un cuarto manuscrito en elaboración. En el primer artículo de investigación se describió una nueva especie, *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mamesi*, colectada del intestino de *Dormitator latifrons* en tres localidades de lagunas costeras del estado de Chiapas, México. A partir de la información de 46 caracteres morfológicos se realizaron análisis estadísticos como MANOVA y componentes principales (PCA) para diferenciar esta especie de otras distribuidas en México. Adicionalmente se obtuvieron secuencias de dos marcadores genéticos, un fragmento del gen citocromo oxidasa 1 (COI) y los dominios D2+D3 de la subunidad mayor del 28S del ADN ribosomal. Los análisis filogenéticos se realizaron para comparar esta nueva especie con otras registradas previamente en México. La validez de esta especie fue confirmada por caracteres morfológicos y moleculares.

En un segundo artículo se describió otra nueva especie, *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mexicoensis* recolectada del intestino de *Dormitator maculatus* en ríos y lagunas de las vertientes del Golfo de México. Esta especie fue comparada morfológicamente con otras 33 especies distribuidas en el continente americano, y se obtuvieron secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS) y los dominios D2+D3

de la subunidad mayor del 28S. Análisis filogenéticos se realizaron para comparar con otras especies descritas de peces dulceacuícolas, estuarinos y marinos distribuidos en México. Basado en múltiples evidencias tanto genéticas, morfológicas y ecológicas se determinó que los acantocéfalos asociados al pez estuarino *Dormitator maculatus* correspondían a una nueva especie.

En el tercer artículo se realizó un listado de verificación de todas las especies de *Neoechinorhynchus* asociados a peces dulceacuícolas, marinos, estuarinos y tortugas dulceacuícolas distribuidas en Centroamérica. Este listado contiene registros de todos los artículos publicados sobre *Neoechinorhynchus*, adicionalmente se consultaron y revisaron todos los especímenes depositados en la Colección Nacional de Helminos (CNHE). Los registros de este listado incluyen información de nueve especies de *Neoechinorhynchus* encontrados en 55 especies de peces, una especie de tortuga, para 87 localidades a lo largo de cinco países (México, Guatemala, Nicaragua, Honduras y Costa Rica). Para mayor confiabilidad en la delimitación de las especies de este listado, se obtuvieron secuencias de los dominios D2+D3 de la subunidad mayor del 28S para 262 especímenes correspondientes a estas nueve especies en Centroamérica.

Finalmente para integrar toda la información generada durante la investigación se está elaborando un cuarto manuscrito. Para este último proyecto se obtuvieron secuencias parciales de 351 especímenes para el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI), 329 especímenes para los espaciadores internos transcritos (ITS1+5.8S+ITS2) y 277 especímenes para los dominios D2+D3 de la subunidad mayor del 28S en 57 localidades de cuatro países en Centroamérica. Los resultados preliminares de este trabajo basados en diferentes métodos para la delimitación de especies (GMYC, ABGD y *BEAST) en combinación con análisis estadísticos morfológicos (MANOVA, PCA) mostraron que el

género *Neoechinorhynchus* en Centroamérica es un grupo hiper-diverso conformado por múltiples especies crípticas. Adicionalmente a las nueve especies descritas morfológicamente en Centroamérica, en este estudio se encontraron al menos otras nueve especies crípticas (linajes) y una especie morfológicamente distinta (linaje 8), asociados a especies de peces estuarinos del género *Dormitator* y peces dulceacuícolas de la familia Cichlidae.

Abstract

The genus *Neoechinorhynchus* is the most diverse group of acanthocephalans with approximately 116 described species. These are endoparasites mainly of freshwater fishes, and marine and freshwater turtles, with a cosmopolitan distribution. The greatest diversity of species is registered in North America, it has been suggested that this region could be the center of radiation for *Neoechinorhynchus*. Species of *Neoechinorhynchus* in Middle America commonly parasitize the fish families Cichlidae and Eleotridae (mainly from the genus *Dormitator*). The diversification processes in *Neoechinorhynchus* are the result of changes in hydrological systems and the mechanism of diversification of their hosts. *Neoechinorhynchus* represents an excellent model for analysis of species delimitation to elucidate the diversity of species and evolutionary history of this group in Middle America.

The main objectives of the present thesis were to: a) perform the phylogenetic reconstruction of *Neoechinorhynchus* spp. in Middle America, b) delineate species of the genus *Neoechinorhynchus* through tree-based methods (GMYC, *General Mixed Yule-Coalescent* model) and genetic distances (ABGD, *Automatic Barcode Gap Discovery*), c) validate the hypothesis of delimitation of species using of *Species Tree by Multispecies Coalescent* (*BEAST), d) determine whether the phylogenetic patterns of *Neoechinorhynchus* spp. correspond to the distribution of this host, and e) evaluate the different hypothesis by morphological analysis of each species of *Neoechinorhynchus*.

Between August 2012 and January 2016, 24 species of host were revised in 57 localities in four countries (Mexico, Guatemala, Honduras, and Costa Rica), in which different water systems such as rivers, lakes, ponds and streams were sampled. Partial sequences of three molecular markers were obtained; mitochondrial cytochrome oxidase 1 (COI, 351 sequences), internal transcribed spacers (ITS1 + 5.8S + ITS2, 329 sequences) of

nuclear ribosomal DNA and the D2 + D3 domains of the large subunit (28S, 277 sequences).

Based on the information generated over four years, we published three research articles and a fourth manuscript is in the process of submission. In the first research article a new species was described as *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mamesi*. The species was collected from the intestine of *Dormitator latifrons* in three localities of coastal lagoons in the State of Chiapas, Mexico. The statistic analyses such as multivariate analysis of variance (MANOVA) and principal components analysis (PCA) were performed to differentiate this species from others distributed in Mexico. Additionally, we obtained sequences from two genetic markers, partial sequences from cytochrome oxidase 1 (COI) and the D2/D3 domains of the large subunit of 28S. The phylogenetic analyses were performed to compare his new species with others of the genus previously recognized in Mexico. Morphological and molecular characters confirmed the validity of this species.

A second species was described in my second article as *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mexicoensis*, collected in the intestine of *Dormitator maculatus* from rivers and lagoons of the Gulf of Mexico. The morphology of his new species was compared with 33 other species distributed in the American continent. We obtained and compared sequences of ITS region and the D2/D3 domains of the large subunit of 28S. Phylogenetic inference was performed to compare it with other freshwater, estuarine and marine species distributed in Mexico. Based on multiple evidence, such as genetic, morphological and ecological, it was determined that the acanthocephalans associated with the estuarine fish *Dormitator maculatus* corresponded to a new species.

In the third article we present a checklist of all the species of *Neoechinorhynchus* associated with freshwater, marine, and estuarine fish and freshwater turtles distributed in

Middle America. This list comprises records from all articles published on *Neoechinorhynchus*. Additionally, for this work I consulted and analyzed all specimens deposited in the Colección Nacional de Helminthos (CNHE). The records of this checklist include information on nine species of *Neoechinorhynchus* found in 55 species of fishes and one species of turtle in 87 localities from five countries (Mexico, Guatemala, Nicaragua, Honduras, and Costa Rica). For greater reliability in the species delimitation of this checklist, sequences were obtained for the D2/D3 domains of the large subunit of 28S from 262 specimens corresponding to the nine species in Middle America.

Finally, in order to integrate the information generated during his work we are preparing a fourth manuscript. In this work, we obtained 351 partial sequences for the mitochondrial gene, cytochrome oxidase 1 (COI); for 329 specimens we sequenced the internal transcribed spacer (ITS1+5.8S+ITS2) and for 277 for specimens the D2+D3 domains of the large subunit of RNA 28S in 57 localities of four countries in Middle America. The preliminary results of this work based on multiple methods of species delimitation (*General Mixed Yule-Coalescent* model, *Automatic Barcode Gap Discovery*, and *Species Tree*) show that the genus *Neoechinorhynchus* in Middle America is a hyper-diverse group comprising multiple cryptic species. In addition, to the nine species described morphologically in Middle America, in this study we found at least nine other cryptic species and one species diagnosed as morphologically different (lineage 8) associated with species of estuarine fishes of the genus *Dormitator* and freshwater fishes of the family Cichlidae.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Métodos para la delimitación de especies

El interés por los métodos para delimitación de especies y la inferencia de patrones y mecanismos de especiación surgió a mediados del siglo XX durante la era denominada “*Nueva Sistemática*” (Mayr 1982), posteriormente este interés se redujo considerablemente (Wiens 1999); sin embargo, hubo un renacimiento del tema adoptado por Sites y Marshall (2003); para describir la práctica empírica de la delimitación de especies, con la necesidad de distinguir entre una definición ontológica de las especies (no operacional) en comparación con los datos empíricos (operacional) necesarios para probar su realidad (Frost y Kluge 1994, de Queiroz 1998).

A pesar de las diversas definiciones contemporáneas actuales del concepto de especie; de Queiroz (1998) argumenta que las diferencias entre estas definiciones no reflejan las diferencias fundamentales con respecto al concepto general de especie. Por lo que considera que todas las definiciones de las especies “modernas” equiparan, ya sea explícita o implícitamente las especies con segmentos de linajes evolutivos a nivel de población. Por ello, adopta el concepto general de linaje (GLC por sus siglas en inglés) que define a una especie como "un linaje (una secuencia ancestral descendiente de poblaciones) que evoluciona por separado de los demás y con su propia función en la evolución y tendencias" (Simpson 1961).

La definición sobre lo qué es una especie constituye un concepto separado de los aspectos metodológicos de la delimitación de especies; previamente éstos se habían fusionado con el propósito de que las propiedades que se utilizan para inferir los límites de las especies (la prueba empírica) fueran también necesarias para la definición de una especie (un tema de conceptualización). En los conceptos alternativos de especie se adoptan diferentes propiedades adquiridas por los linajes durante el curso de su divergencia (por

ejemplo, aislamiento reproductivo intrínseco, diagnosis, monofilia) y estos se determinan como propiedades secundarias definitorias (criterios secundarios de las especies) (de Queiroz 2007). Sin embargo, la mayoría de estos conceptos se puede ver como criterios secundarios de las especies, relevantes para la delimitación de especies.

1.1.1. Los primeros métodos para la delimitación de especies

En un principio existieron diferentes métodos relacionados con la detección y delimitación de las propiedades de los linajes, los cuales se dividieron en dos métodos: aquellos no basados en árboles y los basados en árboles (Sites y Marshall 2003). Los primeros incluyen: (1) distancias genéticas pareadas que podrían ser probadas, ya sea para las correlaciones con el aislamiento reproductivo (Highton 1990), las distancias morfológicas (Puerto et al. 2001), o las distancias geográficas (Good y Wake 1992); (2) los estadísticos de flujo génico, para estimar la magnitud del flujo genético a través de zonas híbridas (Porter 1990); (3) los estados de caracteres alternativos fijos, como un indicador de la ausencia de flujo de genes en un "*análisis de agregación de la población*" (PAA) (Davis y Nixon 1992); (4) la presencia de genotipos heterocigóticos como un indicador de un "*campo para la recombinación*" (Doyle 1995), y (5) grupos genéticos (Mallet 1995).

Por otra parte los métodos basados en árboles incluyen: (1) tres variables del concepto filogenético de especie basado en apomorfía, la separación de linajes, o criterios basados en un nodo, siguiendo la terminología de Brooks y McLennan (1999); (2) la acumulación de haplotipos cladísticos (Brower 1999); (3) la evaluación molecular y morfológica utilizando diagramas de flujo dicotómicas (Wiens y Penkrot 2002); (4) la exclusividad genealógica (Baum y Shaw 1995), y (5) una extensión del análisis de clados anidados de Templeton et al. (1995), que incluye pruebas de límites de especies (Templeton 2001). Los conjuntos de datos en estos primeros estudios con ambos métodos, con mayor

frecuencia incluyeron genotipos de isoenzimas multilocus (Marshall et al. 2006), caracteres morfológicos (generalmente merísticos), y pocos estudios basados en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt; Dettman 2003).

Otros métodos para la delimitación de especies fueron desarrollados; así por ejemplo, Puerto et al. (2001), mostraron un enfoque diferente para probar hipótesis, utilizando una combinación de métodos filogeográficos, morfometría multivariada y pruebas de asociación de matriz, para investigar los límites entre especies de serpientes brasileñas tradicionalmente asignadas a las especies *Bothrops leucurus* y *B. pradoi*, estos autores utilizaron la prueba de asociación de matriz para relacionar los patrones de variación morfológica con la variación de las secuencia de ADN mitocondrial.

Templeton (2001) propuso una superposición de la geografía en el árbol de genes para probar una hipótesis nula, donde la muestra es de un único linaje evolutivo. Esta segunda prueba se llevó a cabo por los contrastes directos de linajes identificados previamente o mediante la superposición de datos reproductivos y/o ecológicos en el árbol de genes y pruebas para las transiciones significativas que son concordantes con los linajes previamente identificados. Wiens y Penkrot (2002) en su método utilizaron árboles con datos de ADN mitocondrial y árboles con datos morfológicos, para comparar límites de especies inferidos a partir de estos enfoques.

Morando et al. (2003) combinaron varios métodos de reconstrucción filogenética, basados en árboles y con el análisis de clados anidados para extraer la señal de máximo histórico en los distintos niveles de la especie *Liolaemus elongatus*. Implementaron una metodología basado en árboles para las secuencias de ADN, para probar los límites entre especies, y propusieron modificaciones para dar cabida a grandes conjuntos de datos y regiones de genes con tasas de sustitución heterogéneos. Combinando árboles de haplotipos

y con el análisis de clados anidados, permitió probar límites de las especies con base de un criterio definido a priori.

1.1.2. Nuevos métodos, nuevos datos y enfoques para la delimitación de especies

Por otro lado se hicieron propuestas ambiciosas, con el propósito de acelerar el descubrimiento y descripción de nuevas especies; entre ellas se incluyen los códigos de barras de ADN (Hebert et al. 2003, 2004), la taxonomía de ADN (Tautz et al. 2003), y la taxonomía basada en redes (por ejemplo, Godfray 2002; Scoble 2004; Knapp et al. 2007). Controversias sobre estas propuestas están disponibles en la literatura (especialmente en códigos de barras de ADN), algunos ejemplos en Will et al. (2005); Brower (2006); Hickerson et al. (2006) y Meier et al. (2006), otros aspectos de delimitación de especies y sobre las consecuencias de los nuevos enfoques en la delimitación de especies para otros campos, como la ecología y la conservación (ver Agapow et al. 2004; Padial y de la Riva 2006).

Posteriormente, Pons et al. (2006) optaron por los modelos de crecimiento de linaje estocástico (modelos de Yule) que se combinaron con la teoría de coalescencia para desarrollar un nuevo método de probabilidad, que determinó el punto de transición de un nivel de especies (especiación y extinción) a nivel de la población (coalescencia) y los procesos evolutivos. A partir del año 2007 surgieron novedosos métodos para delimitar especies, uno de ellos fue el método sin árbol de genes monofileticos propuesto por Knowles (2007), que estima límites coalescentes de las especies, sobre la base de múltiples árboles de genes no ligados, y que no requiere de especies que se han caracterizado por monofilia recíproca. Sobre este mismo tema, Shaffer y Thomson (2007) en su método introdujeron una población basado en grandes conjuntos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP), lo que sería más adecuado para la delimitación de especies de muy corta

edad. Por último se incluyen dos métodos más (por ejemplo Raxworthy et al. 2007; Leaché et al. 2009), considerando datos ecológicos y modelado de nichos ecológicos para sustentar los datos moleculares o morfológicos en la delimitación de especies.

Otros métodos fueron desarrollados basándose en múltiples líneas de evidencia y métodos estadísticos, entre algunos de estos está el enfoque de Bond y Stockman (2008), que es especialmente relevante para las poblaciones geográficamente estructuradas, en la que de un conjunto de datos de secuencias se pueden recuperar una estructura bien definida, bien apoyada, geográficamente concordante y genéticamente divergente, pero poblaciones morfológicamente crípticas (especies). Con un enfoque diferente (Cummings et al. 2008), se basa en pruebas estadísticas tanto de estructura de la población y la exclusividad genealógica de loci nucleares, para poner a prueba las especies identificadas provisionalmente a partir de haplocodos de ADNmt bien apoyados. Como un tercer ejemplo, Puillandre et al. (2012a) describieron un enfoque de cuatro pasos para "*la generación de hipótesis de especiación robustas*" en la familia de moluscos Turridae (género *Gemmula*) basados en el análisis de: (1) la recolección de código de barras de ADN del gen COI para GMYC, *General Mixed Yule-Coalescent* (Pons et al. 2006) y ABGD, *Automatic Barcode Gap Discovery* (Puillandre et al. 2012b), simultáneamente con (2) genes nucleares (28S del rRNA), datos morfológicos, geográficos y batimétricos, para redefinir los límites entre especies de este grupo. En estos resultados se duplicó la diversidad de las especies previamente conocidas en *Gemmula*, y se concluyó que estos métodos pueden ser útiles para la delimitación de especies a gran escala en grupos megadiversos.

Otros ejemplos adicionales incluyen métodos basados en el genotipo de marcadores multi-locus dominantes y co-dominantes (Hausdorf y Hennig 2010), las estimaciones

combinadas de los tiempos de divergencia y el flujo genético para discriminar intraespecíficamente de los patrones interespecíficos (Hey y Pinho 2012), y una extensión del programa GENELAND implementado en el paquete R, que incluye genética fenotípica (morfométricas) y datos geográficos para la delimitación de poblaciones y especies (Guillot et al. 2012). La reciente fusión de la teoría coalescente con la filogenética ha impulsado una nueva generación de métodos de delimitación de especies y un nuevo paradigma en la sistemática (Edwards 2009). Este nuevo marco teórico, y sus aplicaciones analíticas derivadas, en parte, fue requerido como una solución para el mejoramiento del conflicto observado entre las genealogías de múltiples loci (los árboles de genes) con las genealogías a nivel de población subyacentes (árboles de especies) (Maddison 1997).

Se han desarrollado varios métodos para la estimación de árboles de especies a partir de una colección de múltiples árboles de genes, bajo diferentes algoritmos (Kubatko et al. 2009; Liu 2008). Con estos nuevos métodos, se generaron metodologías para la delimitación de especies totalmente coalescentes, que consiste en seleccionar el mejor modelo de árbol de especies a partir de un conjunto de modelos alternativos que representan hipótesis diferentes en los límites entre especies. Otro método de delimitación de especies, que consiste en el muestreo de la distribución posterior bayesiana de las especies, usando salto-reversible de las cadenas *Markov de Monte Carlo* (rjMCMC) con el programa de BP&P 2.1 (Yang y Rannala 2010), en este método se utiliza un enfoque de modelado bayesiano para generar las probabilidades posteriores de las asignaciones para especies, tomando en cuenta las incertidumbres debido a los árboles de genes desconocidos y el proceso de coalescencia ancestral.

Por otro lado enfoques heurísticos y/o semi-paramétricos se han desarrollado para resolver el límite entre coalescencia y procesos de especiación usando árboles de genes

individuales (mezcla de Yule + coalescencia generalizada) (Pons et al. 2006), la búsqueda de árboles de especies y los límites de las especies a través de la minimización del gen conflicto de árbol y la estructura intraespecífica (O'Meara 2010), así como la selección de modelos de delimitación de especies con el uso de computación bayesiana aproximada (ABC) (Camargo et al. 2012).

El desarrollo de nuevos métodos de delimitación de especies enfocados en multi-especies/multi-locus, también se debió en parte a la demanda de herramientas analíticas eficientes para manejar la creciente cantidad de datos moleculares obtenidos con técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en Inglés). Los nuevos métodos de delimitación de especies deben ser capaces de manejar miles de loci para múltiples individuos derivados de loci nucleares, intrones, y loci codificantes de proteínas obtenidos de técnicas genómicas (Thomson et al. 2010; Portik et al. 2012). Sin embargo, estos nuevos métodos de delimitación de especies al parecer son inadecuados para analizar datos de todo el genoma que se han comenzado a obtener para una amplia diversidad de organismos a través de tecnologías de secuenciación de nueva generación (Holsinge 2010; Tautz et al. 2010).

1.1.3. Métodos de delimitación de especies utilizados en parásitos

La delimitación de especies en parásitos tradicionalmente se ha realizado mediante rasgos morfológicos para excluir o incluir individuos a ciertas entidades taxonómicas. El tipo de reconocimiento a través de cualquier característica morfológica se conoce como concepto linneano o morfológico de especie (Mayden 1995). La variación morfológica de las especies de parásitos se asocia por ejemplo a la distribución de sus huéspedes, al tipo de especie de huésped y las condiciones ecológicas donde éstas se encuentran (Hanzelová et al. 2005). Tradicionalmente la morfología descriptiva, la morfometría geométrica y

caracteres ecológicos se han utilizado para establecer límites entre diferentes grupos de parásitos. Solo por mencionar algunos ejemplos tenemos los trabajos de Gibson et al. (2002), Jones et al. (2005) y Bray et al. (2008) para trematodos; Modry et al. (2000) y Keeler et al. (2012) para protozoarios; Flechmann y McMurtry (2009) y Fernandez et al. (2013) en ácaros y garrapatas.

Por otro lado con el avance del uso de marcadores moleculares, el código de barras de ADN ha sido utilizado ampliamente para la delimitación de especies de parásitos. Estas secuencias mitocondriales (COI) generalmente se han analizado en los contextos filogenético, de distancias genéticas, y en combinación con caracteres morfológicos para establecer límites entre especies. Existe una larga lista de trabajos publicados, por ejemplo Ogedengbe et al. (2011) para protozoarios; Moszczyńska et al. (2009), Ferri et al. (2009), López-Caballero et al. (2013) para helmintos, y Debert et al. (2008), Jin-Bo et al. (2013) para ácaros.

El uso de análisis filogenéticos, las distancias genéticas, caracteres morfológicos y ecológicos, ha contribuido en gran medida a la identificación y delimitación de parásitos pese al microscópico tamaño que algunos llegan a tener, lo cual sería casi imposible mediante el solo estudio de su morfología. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de métodos disponibles para la delimitación de especies, su uso es poco común entre los parasitólogos. Se buscaron trabajos publicados en los últimos 6 años para parásitos donde se haga uso de algunos de los métodos mencionados anteriormente. Para esta búsqueda se utilizó la base de datos del ISI Web of Knowledge, en la búsqueda se utilizaron las palabras clave como “*species delimitation in parasites*”; “*species delimitation of parasites*”; “*GMYC parasites*”; “*ABGD parasites*”; “*BP&P parasites*”. En esta revisión solo se lograron encontrar algunos trabajos que a continuación se mencionan. Entre los trabajos

publicados se encuentran el de Martínez-Aquino et al. (2013), quienes utilizaron el modelo *General Mixed Yule-Coalescent* (GMYC) para la delimitación de especies del género *Margotrema*, parásito de peces dulceacuícolas del centro México. Adicionalmente estos autores realizaron un análisis de *species tree* (*BEAST) para corroborar la congruencia de sus resultados del modelo GMYC. Los resultados obtenidos mostraron que el género *Margotrema* se compone de dos especies válidas y una de ellas con al menos 3 linajes sin describir. Para el mismo grupo de parásitos (trematodos), Georgieva et al. (2014) utilizaron datos moleculares, morfológicos y ecológicos en la delimitación de especies del género *Echinostoma* en Europa. Locke et al. (2015a) utilizaron dos métodos: el algoritmo de Barcode Index Numbers (BINs; Ratnasingham y Hebert 2013) y el método ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*; Puillandre et al. 2012b) para delimitar especies del género *Clinostomum* en una escala global. Sus resultados mostraron que ambos métodos son congruentes, encontrando al menos ocho especies putativas en una escala global de la distribución del género, sin embargo estas especies no fueron descritas por que sólo analizaron los estadios larvales (metacercarias). En otro grupo de parásitos Bochkov et al. (2014) utilizaron el método de *Markov de Monte Carlo* (rjMCMC) con el programa de BP&P 2.1 (Yang y Rannala 2010) para delimitar especies de ácaros del género *Choriotes*.

Herrmann et al. (2014) utilizaron un método bayesiano para la delimitación de especies en *Stegodexamene anguillae*, obteniendo dos especies crípticas. Blasco-Costa et al. (2014) usaron diferente fuentes de información (árboles de especies) para determinar 16 linajes en *Diplostomum*. Locke et al. (2015b) utilizaron dos métodos: el algoritmo de Barcode Index Numbers (BINs) y el ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) para delimitar larvas de Diplostomidos. Con esto es evidente que los parasitólogos utilizan diferentes estrategias en la delimitación de especies como la reconstrucción filogenética

(por ejemplo; métodos de distancia, máxima parsimonia, máxima verosimilitud, inferencia bayesiana), distancias genéticas (por ejemplo; distancias p , distancias Kimura-2-parámetros), caracteres morfológicos (por ejemplo; morfometría geométrica, microscopia electrónica) y ecológicos (tipo de huésped, tipo de ciclo de vida, distribución geográfica) para delimitar especies de parásitos. Por lo tanto, son poco los estudios donde se incluyen los métodos estrictamente desarrollados para la delimitación de especies.

1.2. Teoría de especiación

A pesar de que han transcurrido 157 años desde que el libro famoso de Darwin fue publicado "*El origen de las especies*" (Darwin 1859) y uno de los temas centrales de la biología evolutiva sigue siendo cuestionado, en como las especies evolucionan (Coyne y Orr 2004). En un principio, el origen de nuevas especies había desconcertado a los biólogos evolutivos durante décadas, así por ejemplo, los primeros estudios se centraron en comprender cómo las especies evolucionan por medio de selección natural en un mismo hábitat, ideas propuesta por Darwin (Brooks 1950). Más tarde Futuyama y Mayer (1980), fueron sólo algunos de los que buscaron alternativas a la selección natural como un modo de especiación. Años más tarde con el avance en biología molecular, aspectos genéticos de la especiación fueron ganando interés (algunos ejemplos mostrados en Coyne y Orr 2004). Hoy en día, con los avances en biología molecular, gracias a lo posibilidad de obtener de una manera rápida y confiable grandes cantidades de información genética y complementarla con datos ecológicos y morfológicos, es más factible obtener un mayor avance en la comprensión de los mecanismos que promueven la evolución y especiación (Butlin 2010).

Debido a la complejidad de interacciones que experimentan los individuos y las poblaciones con sus congéneres y estos con el medio ambiente, los diferentes modos de

especiación se han clasificado para poder estudiar los diferentes procesos involucrados. Una de las clasificaciones más ampliamente aceptada es basada en las condiciones geográficas y en los mecanismos subyacentes a la especiación (Coyne y Orr 2004). Particularmente, se ha aceptado que el proceso de especiación puede finalizar cuando una subpoblación ha logrado ya sea su aislamiento precigótico, es decir, no pueden recombinarse más con sus antecesores, ya sea a través de barreras geográficas o de comportamiento o cuando una subpoblación ha alcanzado el aislamiento postcigótico, es decir, cuando los genes han cambiado a un punto de incompatibilidad. Mientras que en el primer caso (precigótico) casos de descendencia híbrida viable puede resultar del cruzamiento, sin embargo, no se producirá ninguna descendencia viable porque el aislamiento postcigótico se ha establecido entre las poblaciones.

1.2.1. Modos de especiación

Especiación alopátrica (Mayr 1942). Describe el origen de una nueva especie como la consecuencia de la fragmentación de una población distribuida inicialmente panmíctica en subpoblaciones, todo a causa de diferentes eventos geológicos como por ejemplo el surgimiento de una montaña que actúa como barrera para el flujo génico. Este tipo de especiación es poco discutida ya que es muy aceptada por la comunidad científica (Mayr 1942; Kawata y Yoshimura 2000; Mallet et al. 2009). Cuando surge una barrera geográfica, el flujo genético se ve reducido dando origen a la divergencia de ambas subpoblaciones en diferentes direcciones. Este proceso geológico va acompañado por acumulación de mutaciones y deriva genética, generalmente puede existir adaptación local y por consiguiente puede dar origen a un grupo de individuos aislados tanto morfológica como reproductivamente. Particularmente las mutaciones y la deriva genética son procesos estocásticos, por lo tanto la morfología no necesariamente tendría que cambiar, lo que daría

origen a especies crípticas, que formarían grupos genéticamente distintos pero morfológicamente similares (algunos ejemplos en Hebert et al. 2004; Elmer et al. 2007). Otro ejemplo, pero en el escenario opuesto, consiste en grupos de individuos morfológicamente distintos que no están reproductivamente aislados unos de otros, lo que puede ser resultado de especiación alopátrica, un ejemplo bastante claro son los peces de la familia Cichlidae (Stelkens et al. 2009).

Especiación parapátrica (Smith 1955). Este modo de especiación describe una situación donde poblaciones con adaptaciones ecológicas divergentes tienen distribuciones adyacentes y la migración entre estas poblaciones da lugar a hibridación accidental. Debido a que ninguna de las especies parentales se adapta mejor a su propio hábitat, la cruce entre esas poblaciones suelen mostrar una adecuación por debajo del promedio en ambos hábitats y por lo tanto estas son seleccionadas en contra. El proceso de diferenciación inicial hasta la especiación completa con un fuerte aislamiento reproductivo es a menudo ayudado por un proceso llamado “refuerzo”; en él se describe el incremento del aislamiento reproductivo por la selección natural cuando los individuos híbridos menos aptos son seleccionados en contra y por lo tanto el emparejamiento selectivo en las dos poblaciones parentales proporciona una ventaja en la adecuación (Coyne y Orr 2004). Sin embargo, los hallazgos más recientes han demostrado que este tipo de especiación es mucho más complicado de lo que se pensaba normalmente (Líber et al. 2004), y se ha planteado que es casi imposible demostrar la especiación parapátrica en la naturaleza ya que las explicaciones alternativas son casi siempre posibles. Entre estas se incluye el contacto secundario en especiación alopátrica (Coyne y Orr 2004).

Especiación simpátrica (Poulton 1903), se define como la condición de estar en el mismo lugar. En este tipo de especiación se da origen a una nueva especie dentro de una

población, sin aislamiento geográfico, sin embargo, esta sutil definición solo podría ser una de las 12 definiciones mencionadas por Fitzpatrick et al. (2008). Existen numerosos ejemplos donde, en teoría, este tipo de especiación podría darse bajo condiciones estrictas (Kawata y Yoshimura 2000; Almeida y de Abreu 2003; Ripa 2009; van Doorn et al. 2009). En la naturaleza es poco común encontrarse con ejemplos claros de este tipo de especiación, son poco los trabajos que son ampliamente aceptados como el trabajo de Bolnick y Fitzpatrick (2007). La especiación simpátrica puede ser un proceso relativamente rápido si la adaptación a nichos ecológicos distintos se refuerza con el apareamiento selectivo. Como se ha indicado anteriormente para la especiación parapátrica, el proceso puede ser acelerado por el refuerzo a través de la selección contra individuos intermedios, favoreciendo de este modo la evolución del aislamiento reproductivo precigótico. Ejemplos famosos son los estudios de especiación simpátrica en especies de peces endémicos de pequeños lagos. Por lo general, ofrecen la posibilidad de examinar los procesos de especiación alopátrica y sin efectos de diferenciación de la población de confusión si un solo evento de colonización como se infiere de la genética molecular implicada en una monofilia. Algunos de los ejemplos ampliamente conocidos es el de los cíclidos en lagos africanos (Schliewen et al., 2001; Schliewen y Klee 2004), otro sistema para especiación simpátrica es en los cíclidos de los lagos de Nicaragua los cuales han tenido el foco de atención reciente por diversos biólogos evolutivos (Barluenga y Meyer 2004; Barluenga et al. 2006).

1.2.2. Mecanismos de especiación

Selección natural, es un proceso clave en la evolución que conduce a la creación o desaparición de la adecuación de rasgos biológicos relevantes dentro de una población. La selección funciona a través de efectos sobre la supervivencia y reproducción de los organismos. Endler (1986) menciona que la selección se basa en cuatro componentes principales: variación, herencia, crecimiento demográfico y supervivencia diferencial. La variación entre individuos de una población puede darse por apariencia, comportamiento o cualquier otro rasgo. La herencia hace referencia a que algunos rasgos se transmiten de padres a hijos, es decir son hereditarios. El crecimiento demográfico, donde por lo general las poblaciones producen más descendientes que la cantidad de recursos disponibles, por lo tanto la competencia por los recursos conduce a la mortalidad en cada generación. En la supervivencia diferencial, individuos con rasgos más adecuados para la explotación de los recursos se reproducen con más éxito, y producen mayor descendencia, dando lugar al cambio en la frecuencia de un rasgo particular, probablemente en un rasgo que es benéfico para la población. La selección natural actúa sobre las frecuencias de un rasgo en particular y puede tomar la forma de estabilizadora, direccional y diversificadora (Coyne y Orr 2004). Bajo selección estabilizadora se eliminan las variaciones extremas y la distribución de las frecuencias de un rasgo se mantiene como en la generación anterior. En la selección direccional los individuos con rasgos de uno de los extremos de la distribución se mantienen, por lo que la frecuencia del rasgo en generaciones posteriores se desplaza de generación en generación en una sola dirección. En la selección diversificadora o disruptiva ambos extremos de un rasgo se ven favorecidos a costa de los intermedios.

Selección sexual, esto ocurre con frecuencia a partir de la competencia entre machos por las hembras (Futuyama 1998). Esta forma de competencia intraespecífica se puede

generalizar como la variabilidad en la adecuación reproductiva como consecuencia del éxito diferencial de apareamiento. Los resultados de este tipo de selección son los individuos que ofrecen ya sea una ventaja en la competencia entre machos (por ejemplo, machos más robustos) o mejorar el atractivo de uno de los sexos (por ejemplo, caracteres sexuales secundarios).

La *Hibridación*, puede incrementar la variación genética hasta formar un nuevo grupo de organismos, rasgos de adaptación beneficiosa surgen para la explotación de recursos no utilizados previamente (Stelkens et al. 2009). Los mismos mecanismos al mismo tiempo evitan la pérdida de variación genética debido a la fuerte selección que prevalece en los escenarios de especiación simpátrica e incluso pueden inducir la especiación (ver Mallet 2007). El producto no es necesariamente la formación de una especie híbrida, sino más bien un aumento en la variación genética con la forma de la introgresión de desaparecer en una nube híbrida. La teoría indica que la adaptación puede ser rápida y que la evolución actúa sobre la variación genética en lugar de confiar en la más rara ocurrencia de mutaciones beneficiosas (Barrett y Schluter 2008; Wolf et al. 2010).

1.3. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que aportan información genética en términos genealógicos (Avice 2004). Los biólogos evolutivos usan tanto datos morfológicos como moleculares para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, para estimar la variación dentro de las poblaciones y para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas (Rentería-Alcántara 2007). Los marcadores moleculares son una herramienta alternativa en diversos campos de la biología, incluyendo evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de biodiversidad.

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en tres grupos: 1. Marcadores con base en la hibridación del DNA, v. gr. polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción del DNA (*RFLP, restriction fragment length polymorphisms*); 2. Análisis de las secuencias del DNA nuclear y mitocondrial; y 3. Marcadores mixtos, v. gr. polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de DNA, pueden considerarse como una combinación de RFLP y RAPD's (Picca et al. 2002; Avise 2004; Rentarúa-Alcántara 2007). Una de las moléculas más ampliamente utilizadas en análisis filogenéticos y filogeográficos es el ADN mitocondrial (Figura 1). Ésta es una molécula circular covalente de aproximadamente 16-20 kilobases. Este genoma generalmente contiene un total de 37 genes dependiendo del organismo (13 RNA mensajeros, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia) (Avise et al. 1987). Las propiedades más interesantes en términos filogenéticos y filogeográficos, son su alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, su nula recombinación, variación intraespecífica, y más importante, su herencia materna (con escasas excepciones). Estas características permiten describir la historia matrilineal de organismos coespecíficos y con ello aplicar estimaciones de reloj molecular y hacer análisis de coalescencia (Vázquez-Domínguez, 2007; Vázquez-Domínguez et al. 2009). En helmintos parásitos se han utilizado algunos genes mitocondriales para inferir la evolución de los grupos y separar especies (Macnish et al. 2002; Bensch et al. 2004; Miura et al. 2005; Grillo et al. 2007).

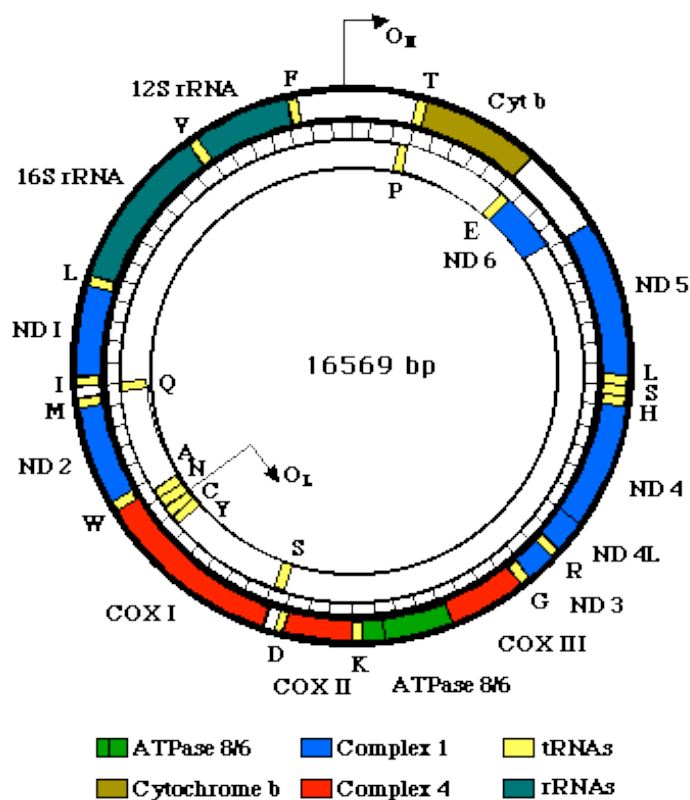


Figura 1. Genoma mitocondrial de animales.

Otros de los marcadores ampliamente utilizado en helmintos parásitos son los genes nucleares del ADN nuclear ribosomal. El rADN se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rADN, 5.8 rADN y 28 rADN), separadas por dos espaciadores internos transcritos con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2) (Eickbush y Eickbush 2007). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos de recombinación como entrecruzamiento desigual y conversión génica (Figura 2) (Rentaría-Alcántara 2007, Eickbush y Eickbush 2007). Genes del RNA ribosomal (rRNA) (ITS1, 5.8S, ITS2 y de los dominios D2-D3 del 28S) se han utilizado para delimitar especies crípticas en helmintos parásitos (Blouin 2002; Luo et al. 2002,

2003; Macnish et al. 2002; Král'ová-Hromadová et al. 2003; Miura et al. 2005; Vilas et al. 2005; Marques et al. 2007; Steinauer et al. 2007; Martínez-Aquino et al. 2009).

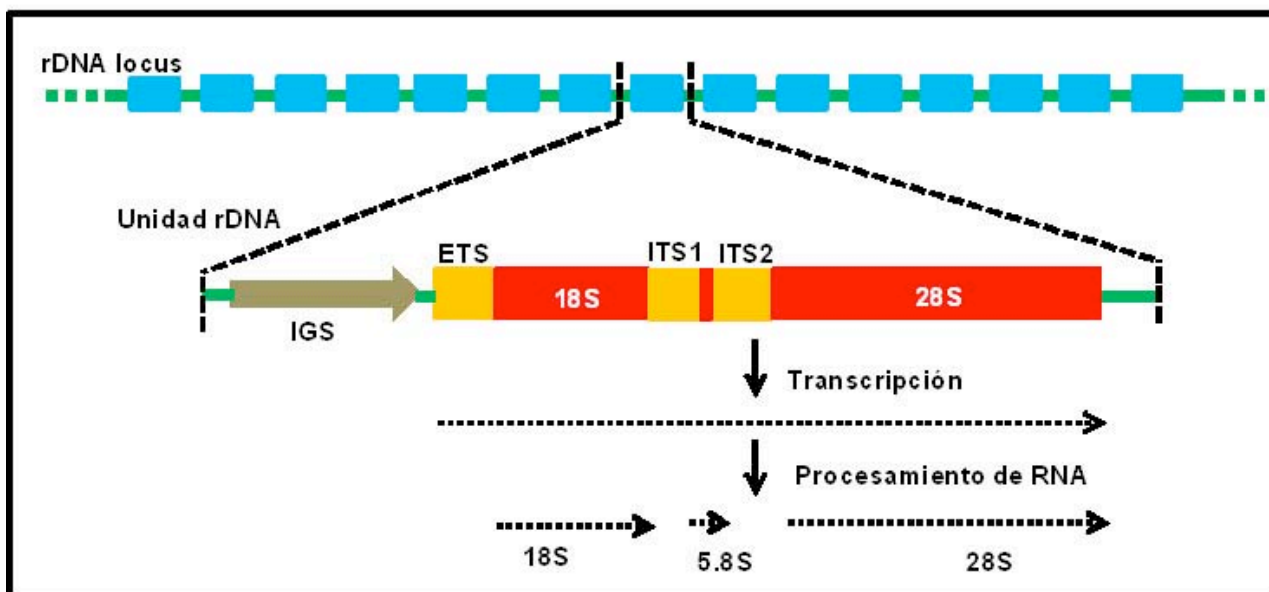


Figura 2. Organización de genes del RNA ribosomal en eucariotas.

1.4. Especies del género *Neoechinorhynchus* como sistema de estudio

Los acantocéfalos del género *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall, 1905 son endoparásitos de peces dulceacuícolas, marinos y estuarinos, así como de anfibios y tortugas dulceacuícolas. Estos parásitos son considerados uno de los géneros más diversos dentro del phylum Acanthocephala, superando las 116 especies descritas con una distribución cosmopolita (Amin 2013; Smales 2013). En total se han descrito 49 especies para el continente americano, 33 especies para Norteamérica y 16 para Centro y Sudamérica (Amin 2002; Barger et al. 2004; Amin y Heckmann 2009; Pinacho-Pinacho et al. 2012; Salgado-Maldonado 2013).

En México se han descrito nueve especies del género *Neoechinorhynchus*, dos de estas especies parasitan tortugas dulceacuícolas; *N. (N.) schmidti* Barger, Thatcher y Nickol, 2004 y *N. (N.) emyditoides* Fisher, 1960; y las otras siete ocurren en peces dulceacuícolas, marinos y estuarinos; *N. (N.) roseus* Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) golvani*, Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano y Martínez-Ramírez, 2010; *N. (N.) brentnickoli* Monks, Pulido-Flores y Violante-González, 2011; *N. (N.) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León y García-Varela, 2012, *N. (N.) panucensis* Salgado-Maldonado 2013, y *N. (N.) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe y García-Varela, 2015 (Pinacho-Pinacho et al. 2012; Salgado-Maldonado 2013; García-Prieto et al. 2010; Monks et al. 2011).

Taxonómicamente, el género *Neoechinorhynchus* es clasificado dentro de la familia Neoechinorhynchidae Ward 1917, en la clase Eoacanthocephala (Amin 1985; Near et al. 1998; Monks 2001; Near 2002). Las especies del género *Neoechinorhynchus* se caracterizan morfológicamente por presentar una proboscis (cabeza), globular o subcilíndrica, recubierta con 18 ganchos dispuestos en tres hileras horizontales de seis ganchos cada una, un receptáculo de la proboscis, ganglio cerebral ubicado en la base del receptáculo de la proboscis, un tronco sin espinas. Los machos presentan una sola glándula de cemento (Amin 2002) (Figura 3). Amin (2002) sugirió que el género *Neoechinorhynchus* está dividido en dos subgéneros: *Hebesoma* Van Cleave, 1928 y *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall 1905, con base en un solo carácter morfológico (forma de los huevos); sin embargo, la carencia de un análisis filogenético del género *Neoechinorhynchus* deja esta sugerencia taxonómica como una hipótesis que debe ponerse a prueba.

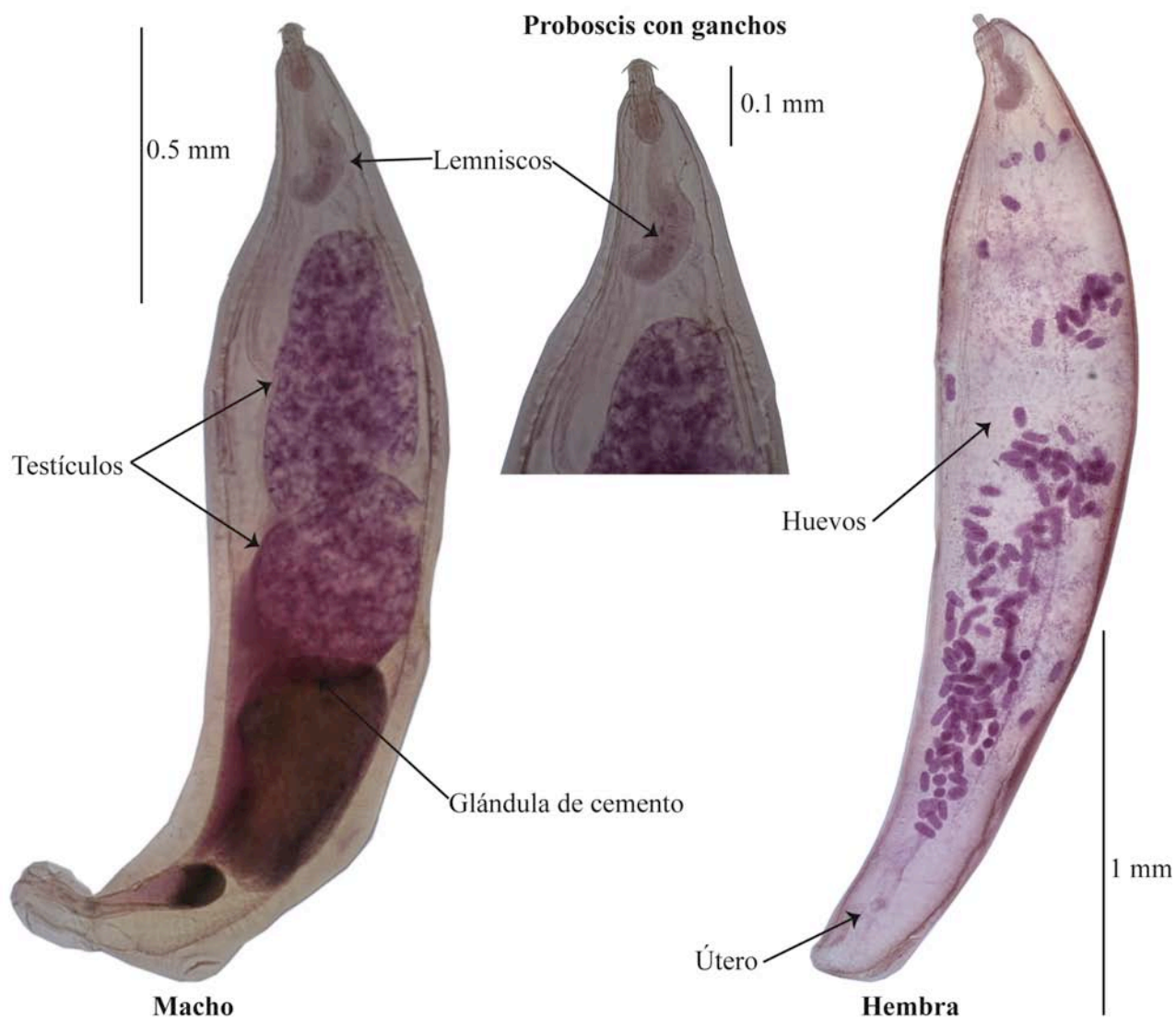


Figura 3. Microfotografía de *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) brentnickoli* parásito de *Dormitator latifrons* en Laguna de Tres Palos, Guerrero, México.

El género *Neoechinorhynchus* es uno de los más diversos dentro del Phylum, con aproximadamente 116 especies descritas. El 35% de la diversidad de especies se distribuyen en Norteamérica y esta región aparentemente es el centro de radiación (Amin 2002). Taxonómicamente las especies del género están delimitadas; sin embargo, desde el

punto de vista genético han sido poco estudiadas. Martínez-Aquino et al. (2009) realizaron un análisis de la variación genética interpoblacional del acantocéfalo *N. (N.) golvani* en México utilizando dos genes nucleares. La divergencia genética y los análisis filogenéticos sugirieron que *N. (N.) golvani* representa un complejo de especies crípticas que se compone de tres linajes. El primer linaje tiene una distribución desde el noreste, sur, centro y sureste de México asociado a peces dulceacuícolas de la familia Cichlidae. Los linajes 2 y 3 están asociados a peces de la familia Eleotridae que se distribuyen en el Golfo de México y en la vertiente del Pacífico y representan dos especies. El linaje 3 que habita las costas del Pacífico mexicano, asociado al pez eleotrido *Dormiator latifrons* se describió como una nueva especie denominada *N. (N.) bretnickoli* (Monks et al. 2011). Un estudio más reciente reveló una nueva especie de *Neoechinorhynchus* de las lagunas costeras del estado de Chiapas basado en caracteres moleculares y morfológicos (Pinacho-Pinacho et al. 2012). Los estudios genéticos de las especies de *Neoechinorhynchus* asociados a peces de México revelaron una alta variación genética debido a factores de aislamiento y fragmentación de las poblaciones. Por lo tanto estos parásitos representan un excelente modelo para realizar un estudio de delimitación y variación genética que nos permita delimitar las poblaciones o detectar nuevas especies.

1.4.1. Ciclo de vida de *Neoechinorhynchus*

El ciclo de vida de *Neoechinorhynchus* es indirecto y alternativamente usan vertebrados como huéspedes definitivos y crustáceos como huéspedes intermediarios. Las formas sexualmente maduras habitan el intestino de varios tipos de vertebrados (por ejemplo peces, tortugas y anfibios); las hembras liberan huevos al medio ambiente acuático a través de las heces de sus huéspedes. Los huevos son ingeridos por un crustáceo en el cuál se desarrollan tres fases larvarias en el siguiente orden: (1) acantor, (2) acantela y (3)

cistacanto o fase infectiva. Al ser ingerido el crustáceo con la fase infectiva por el huésped definitivo, el ciclo de vida es completado (Figura 4) (Schmidt 1985, 1988; Kennedy 2006).

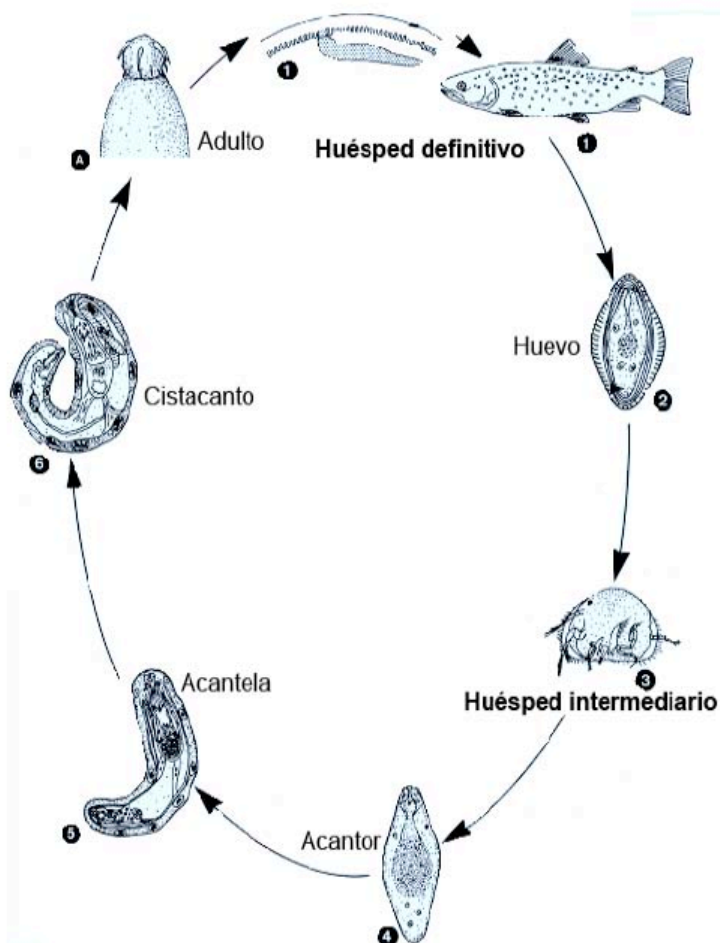


Figura 4. Ciclo de vida de *Neoechinorhynchus rutili* (Müller 1780) Stiles y Hassall 1905.

A) adulto con ganchos, 1) los adultos se pegan a la pared intestinal de su huésped definitivo (carpas y otros peces), 2) los embriones salen al medio por medio de las heces, 3-6) el huésped intermediario *Asellus aquaticus* es infectado por la captación de huevos, donde se desarrollan tres estadios, 4) Acantor, 5) Acantela y 6) Cistacanto, finalmente cuando el huésped intermediario parasitado es ingerido por el huésped definitivo el ciclo de vida es completado. Tomado y modificado de: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/0008.html>.

Literatura citada

- Agapow P. M., O. R. P. Bininda-Emonds, K. A. Crandall, J. L. Gittleman, G. M. Mace, J. C. Marshall y A. Purvis. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology*, **79**: 161–179.
- Almeida C. R. y F. V. de Abreu. 2003. Dynamical instabilities lead to sympatric speciation. *Evolutionary Ecology Research*, **5**: 739–757.
- Amin O. M. y R. Heckmann. 2009. Description of *Neoechinorhynchus* (*N.*) *buckneri* n. sp. from the blacktailed redhorse *Moxostoma poecilurum* (Catostomidae) in the Tchoutacabouffa River, Mississippi, with a key to species of *Neoechinorhynchus* with different dorsoventral body wall thickness. *Comparative Parasitology*, **76**: 154–161.
- Amin O. M. 1985. Classification. En: Crompton D. W. T. y B. B. Nickol (Editores). *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Londres. p. 27–72.
- Amin O. M. 2002. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology*, **53**: 1–18.
- Amin O. M. 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica*, **60**: 273–305.
- Avise J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, EUA. p. 464.
- Avise J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. p. 684.
- Avise J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Niegel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge

- between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**: 489–522.
- Barger M. A., E. V. Thatcher y B. B. Nickol. 2004. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology*, **71**: 1–3.
- Barluenga M. y A. Meyer. 2004. The Midas cichlid complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes?. *Molecular Ecology*, **13**: 2061–2076.
- Barluenga M., K. N. Stölting, W. Salzburger, M. Muschik y A. Meyer. 2006. Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature*, **439**: 719–723.
- Barrett R. D. H. y D. Schluter. 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**: 38–44.
- Baum D. A. y K. L. Shaw. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. En: Hoch P. C. y A. G. Stephenson (editores). *Molecular and experimental approaches to plant biosystematics*. St. Louis: Missouri Botanical Garden. p. 289–303.
- Bensch S., J. Perez-Tris, J. Waldenstrom y O. Hellgren. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?. *Evolution*, **58**: 1617–1621.
- Blasco-Costa I., A. Faltynková, S. Georgieva, K. Skírnisson, T. Scholz y A. Kostadinova. 2014. Fish pathogens near the Arctic Circle: molecular, morphological and ecological evidence for unexpected diversity of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) in Iceland. *International Journal of Parasitology*, **44**: 703–715.
- Blouin M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, **32**: 527–531.

- Bochkov A. V., P. B. Klimov, G. Hestvik y A. P. Saveljev. 2014. Integrated Bayesian species delimitation and morphological diagnostics of chorioptic mange mites (Acariformes: Psoroptidae: Chorioptes). *Parasitology Research*, **113**: 2603–27.
- Bolnick D. I. y B. M. Fitzpatrick. 2007. Sympatric speciation: models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **38**: 459–487.
- Bond J. E. y A. K. Stockman. 2008. An integrative method for delimiting cohesion species: Finding the population-species interface in a group of California trapdoor spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. *Systematic Biology*, **57**: 628–646.
- Bray R. A., D. I. Gibson y A. Jones. 2008. *Keys to the Trematoda Vol. III*, CAB International Publishing.
- Brooks D. R. y D. A. McLennan. 1999. Species: turning a conundrum into a research program. *Journal of Nematology*, **31**: 117–133.
- Brooks J. L. 1950. Speciation in ancient lakes. *Quarterly Review of Biology*, **25**: 131–176.
- Brower A. V. Z. 1999. Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's population aggregation analysis. *Systematic Biology*, **48**: 199–213.
- Brower A. V. Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: "Ten species" of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae). *Systematic Biodiversity*, **4**: 127–132.
- Butlin R. K. 2010. Population genomics and speciation. *Genetica*, **138**: 409–418.
- Camargo A., M. Morando, L. J. Avila y J. W. Sites Jr. 2012. Species delimitation with ABC and other coalescent-based methods: a test of accuracy with simulations and

- an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution*, **66**: 2834–2849.
- Coyne J. y H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer: Sunderland, Massachusetts. p. 545.
- Cummings M. P., M. C. Neel y K. L. Shaw. 2008. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution*, **62**: 2411–2422.
- Dabert J., R. Ehrnsberger y M. Dabert. 2008. *Glaucalges tytonis* sp. n. (Analgoidea, Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxon descriptions in mites (Acari). *Zootaxa*, **1719**: 41–52.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray.
- Davis J. I., y K. C. Nixon. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, **41**: 421–435.
- DeQueiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En: D. J. Howard y S. H. Berlocher (editores). *Endless Forms: species and speciation*. Oxford University Press. p. 57–75.
- DeQueiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, **56**: 879–886.
- Dettman J. R., D. J. Jacobson y J. W. Taylor. 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution*, **57**: 2703–2720.
- Doyle J. 1995. The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Systematic Botany*, **20**: 574–588.

- Edwards S. V. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging?.
Evolution, **63**: 1–19.
- Eickbush T. M. y D. G. Eickbush. 2007. Finely orchestrated movements: evolution of the
ribosomal RNA genes. *Genetics*, **175**: 477–485.
- Elmer K. R., J. Davila y S. Lougheed. 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an
upper Amazonian leafhopper frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary
Biology*, **7**: 1–14.
- Endler J. A. 1986. *Natural Selection in the Wild*. Princeton University Press. p. 354.
- Fernandez N., P. Theron y C. Rollard. 2013. The family Carabodidae (Acari: Oribatida) I.
Description of a new genus, *Bovicarabodes* with three new species, and the
redescription of *Hardybodes mirabilis* Balogh, 1970. *International Journal of
Acarology*, **39**: 26–57.
- Ferri E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, S. Uni, R. Guerrero, H. Ferté, C. Bandi, C.
Martin y M. Casiraghi. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA
barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites
(Nematoda). *Frontiers in Zoology*, **6**: 1–12.
- Fitzpatrick B. M., J. A. Fordyce y S. Gavrilets. 2008. What, if anything, is sympatric
speciation?. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**: 1452–1459.
- Flechmann C. H. y J. A. McMurtry. 2009. Studies of cheliceral and deutosternal
morphology of some phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) by scanning electron
microscopy. *International Journal of Acarology*, **18**: 163–169.
- Frost D. E. y A. G. Kluge. 1994. A consideration of epistemology in systematic biology,
with special reference to species. *Cladistics*, **10**: 259–294.

- Futuyma D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. p. 763.
- Futuyma D. J. y G. C. Mayer. 1980. Non-allopatric speciation in animals. *Systematic Zoology*, **29**: 254–271.
- García-Prieto L., M. García-Varela, B. Mendoza-Garfias y G. Pérez-Ponce De León. 2010. Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa*, **2419**: 1–50.
- Georgieva S, A. Faltýnková, R. Brown, I. Blasco-Costa, M. Soldánová, J. Sitko, T. Scholz y A. Kostadinova. 2014. *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasites and Vectors*, **7**: 520.
- Gibson D. I., A. Jones y R. A. Bray. 2002. *Keys to the Trematoda Vol. I*, CAB International Publishing.
- Godfray H. C. J. 2002. Challenges for taxonomy. *Nature*, **417**: 17–19.
- Good D. A. y D. B. Wake. 1992. Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). *University of California Publications in Zoology*, **126**: 1–91.
- Grillo V., F. Jackson, J. Cabaret y J. S. Gilleard. 2007. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. *International Journal for Parasitology*, **37**: 435–447.
- Guillot G., S. Renaud, R. Ledevin, J. Michaux y J. Claude. 2012. A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. *Systematic Biology*, **61**:897–911.

- Hanzelova V., R. Kuchta y A. P. Shinn. 2005. Morphometric analysis of four species of *Eubothrium* (Cestoda: Pseudophyllidea) parasites of salmonid fish: an interspecific and intraspecific comparison. *Parasitology International*, **54**: 207–214.
- Hausdorf B. y C. Hennig. 2010. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology*, **59**: 491–503.
- Hebert P. D., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen y W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **41**: 14812–14817.
- Hebert P. D., A. Cywinska, S. L. Ball y J. R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **270**: 313–321.
- Herrmann K. K., R. Poulin, D. B. Keeney y I. Blasco-Costa. 2014. Genetic structure in a progenetic trematode: signs of cryptic species with contrasting reproductive strategies. *International Journal of Parasitology*, **44**: 811–818.
- Hey J. y C. Pinho. 2012. Population genetics and objectivity in species diagnosis. *Evolution*, **66**: 1413–1429.
- Hey J. y C. Machado. 2003. The study of structured populations- a new hope for a difficult and divide science. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 535–543.
- Hickerson M. J., C. Meyer, y C. Moritz. 2006. DNA barcoding will fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology*, **55**: 729–739.
- Highton R. R. 1990. Taxonomic treatment of genetically differentiated populations. *Herpetologica*, **46**: 114–121.

- Holsinger K. E. 2010. Next generation population genetics and phylogeography. *Molecular Ecology*, **19**: 2361–2363.
- Jin-Bo L., Y. X. Li, J. T. Sun, X. F. Xue, X. N. Xu y X. Y. Hong. 2013. COI barcoding as a molecular assay for the identification of phytoseiid mites. *Systematic and Applied Acarology*, **17**: 15–25.
- Jones A., R. A. Brian y D. I. Gibson. 2005. *Keys to the Trematoda Vol. II*, CAB International Publishing.
- Kawata M. y J. Yoshimura. 2000. Speciation by sexual selection in hybridizing populations without viability selection. *Evolutionary Ecology Research*, **2**: 897–909.
- Keeler S. P., M. J. Yabsley, S. E. J. Gibbs, S. N. McGraw y S. M. Hernandez. 2012. A new *Isospora* species of passerines in the family Turdidae from Costa Rica. *Journal of Parasitology*, **98**: 167–169.
- Kennedy C. R. 2006. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press. p. 249.
- Knapp S., A. Polaszek y M. Watson. 2007. Spreading the word. *Nature*, **446**: 261–262.
- Knowles L. L. y B. C. Carstens. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, **56**: 887–895.
- Král'ová-Hromadová I., D. F. Tietz, A. P. Shinn y M. Špakulová. 2003. ITS rDNA sequences of *Pomphorhynchus laevis* (Zoega in Müller, 1776) and *P. lucyi* Williams & Rogers, 1984 (Acanthocephala: Palaeacanthocephala). *Systematic Parasitology*, **56**: 141–145.
- Kubatko L. S., B. C. Carstens y L. L. Knowles. 2009. STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics*, **25**: 971–973.

- Leaché A. D., M. S. Koo, C. L. Spencer, T. J. Papenfuss, R. N. Fisher y J. A. McGuire. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **106**: 12418–12423.
- Liebers D., P. de Knijff y A. Helbig. 2004. The herring gull complex is not a ring species. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, **271**: 893–901.
- Liu L. 2008. BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. Bioinformatics, **24**: 2542–2543.
- Locke S. A., M. Caffara, D. J. Marcogliese y M. L. Fioravanti. 2015a. A large-scale molecular survey of *Clinostomum* (Digenea, Clinostomidae). Zoologica Scripta, **44**: 203–217.
- Locke S. A., F. S. Al-Nasiri, M. Caffara, F. Drago, M. Kalbe, A. R. Lapierre, J. D. McLaughlin, P. Nie, R. M. Overstreet, G. T. R. Souza, R. M. Tokemoto y D. J. Marcogliese. 2015b. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. International Journal of Parasitology, **45**: 841–855.
- López-Caballero J., A. Ocegüera-Figueroa y V. León-Regagnon. 2013. Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. Molecular Ecology Resource, **13**: 1125–1136.
- Luo H. Y., P. Nie, Y. A. Zhang, G. T. Wang y W. J. Yao. 2002. Molecular variation of *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Pseudophyllidae) in different fish host species based on ITS rDNA sequences. Systematic Parasitology, **52**: 159–166.

- Luo H. Y., P. Nie, Y. A. Zhang, W. J. Yao y G. T. Wang. 2003. Genetic differentiation in populations of the cestode *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda: Pseudophyllidea) as revealed by eight microsatellite markers. *Parasitology*, **126**: 493–501.
- Macnish M. G., U. M. Morgan-Ryan, P. T. Monis, J. M. Behnke y R. C. A. Thompson. 2002. A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences in *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species. *Parasitology*, **125**: 567–575.
- Maddison W. P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, **46**: 523–536.
- Mallet J. 2007. Hybrid speciation. *Nature*, **446**: 279–283.
- Mallet J. A. 1995. Species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**: 294–299.
- Mallet J., A. Meyer, P. Nosil y J. L. Feder. 2009. Space, sympatry and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**: 2332–2341.
- Marques J. F., M. J. Santos, D. I. Gibson, H. N. Cabral y P. D. Olson. 2007. Cryptic species of *Didymobothrium rudolphii* (Cestoda: Spathebothriidae) from the sand sole, *Solea lascaris*, off the Portuguese coast, with an analysis of their molecules, morphology, ultrastructure and phylogeny. *Parasitology*, **134**: 1057–1072.
- Marshall J. C., E. Arévalo, E. Benavides, J. L. Sites y Jr. JW. Sites. 2006. Delimiting species: comparing methods for Mendelian loci using lizards of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae). *Evolution*, **60**: 1050–1065.
- Martínez-Aquino A., F. S. Ceccarelli y G. Pérez-Ponce de León. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Margotrema* (Digenea: Allocreadiidae), parasitic flatworms of goodeid freshwater fishes across central Mexico: species boundaries,

- host-specificity, and geographical congruence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **168**: 1–16.
- Martínez-Aquino A., M. E. Reyna-Fabián, R. Rosas-Valdez, U. Razo-Mendivil, G. Pérez-Ponce de León y M. García-Varela. 2009. Detecting a complex of cryptic species within *Neoechinorhynchus golvani* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) inferred from ITS's and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, **95**: 1040–1047.
- Mayden R. L. y R. M. Wood. 1995. Systematics, species concepts and the evolutionarily significant unit in biodiversity and conservation biology. *American Fisheries Society Symposium Series*, **17**: 58–113.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. New York: Columbia University Press.
- Mayr E. 1982. *The Growth of Biological Thought*, Harvard University Press.
- Meier R., R. K. Shiyang, G. Vaidya y P. K. L. Ng. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, **55**: 715–728.
- Miura O., A. M. Kuris, M. E. Torchin, R. F. Hechinger, E. J. Dunham y S. Chiba. 2005. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology*, **35**: 793–801.
- Modry D., J. R. Slapeta y B. Koudela. 2000. Six new species of *coccidia* (Apicomplexa: Eimeriidae) from east african chameleons (Sauria: Chamaeleonidae). *Journal of Parasitology*, **86**: 373–379.

- Monks S. 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Systematic Parasitology*, **48**: 81–116.
- Monks S., G. Pulido-Flores y J. Violante-González. 2011. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Dormitator latifrons* (Perciformes: Eleotridae) from the Pacific Coast of Mexico. *Comparative Parasitology*, **78**: 21–8.
- Morando M., L. J. Avila y J. W. Sites Jr. 2003. Sampling strategies for delimiting species: Genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean-Patagonian South America. *Systematic Biology*, **52**: 159–185.
- Moszczyńska A., S. A. Locke, J. D. McLaughlin, D. Marcogliese y T. J. Crease. 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 75–82.
- Near T. J., J. R. Garey y S. A. Nadler. 1998. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **10**: 287–298.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- O'Meara B. C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology*, **59**: 59–73.
- Ogedengbe J. D., R. H. Hanner y J. R. Barta. 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal of Parasitology*, **41**: 843–850.

- Padial J. M. y I. de la Riva. 2006. Taxonomic inflation and the stability of species lists: The perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology*, **55**: 859–867.
- Picca A., M. Helguera, N. Salomón y A. Carrera. 2002. Marcadores Moleculares. En: Echenique V., C. Rubinstein y L. Mroginski (Editores). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. p. 61–68.
- Pinacho-Pinacho C. D., G. Pérez-Ponce De León y M. García-Varela 2012. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International*, **61**: 634–644.
- Pons J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D Sumlin y A. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, **55**: 595–609.
- Porter A. H. 1990. Testing nominal species boundaries using gene flow statistics: taxonomy of two hybridizing admiral butterflies (Limenitis: Nymphalidae). *Systematic Zoology*, **39**: 131–147.
- Portik D. M., Jr. P. L. Wood, J. L. Grismer, E. L. Stanley y T. R. Jackman. 2012. Identification of 104 rapidly evolving nuclear protein-coding markers for amplification across scaled reptiles using genomic resources. *Conservation Genetics Resources*, **4**: 1–10.
- Poulton E. B. 1903. What is a species?. *Transactions of the Entomological Society of London*, **1903**: 77–116.
- Puillandre N., A. Lambert, S. Brouillet y G. Achaz. 2012a. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**: 1864–1877.

- Puillandre N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovich, M. C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford y S. Samadi. 2012b. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*, **21**:2671–2691.
- Puerto G., M. G. Salomao, R. D. G. Theakston, R. S. Thorpe, D. A. Warrell y W. Wuster. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: Phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **14**: 527–538.
- Ratnasingham S. y P. D. Hebert. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, **8**: e66213.
- Raxworthy C., C. M. Ingram, N. Rabibisoa y R. G. Pearson. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*, **56**: 907–923.
- Rentería-Alcántara M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Editores). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México D.F. p. 541–566.
- Ripa J. 2009. When is sympatric speciation truly adaptive? An analysis of the joint evolution of resource utilization and assortative mating. *Evolutionary Ecology*, **23**: 31–52.
- Salgado-Maldonado G. 2013. Redescription of *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) and description of a new species from freshwater cichlids (Teleostei: Cichlidae) in Mexico. *Parasitology Research*, **112**: 1891–1901.

- Schliewen U. K., K. Rassmann, M. Markmann, J. Markert, T. Kocher y D. Tautz. 2001. Genetic and ecological divergence of a monophyletic cichlid species pair under fully sympatric conditions in Lake Ejagham. Cameroon. *Molecular Ecology*, **10**: 1471–1488.
- Schliewen U. K. y B. Klee. 2004. Reticulate sympatric speciation in Cameroonian crater lake cichlids. *Frontiers in Zoology*, **1**: 1–12.
- Schmidt G. D. 1985. Development and life cycles. En: Crompton D. W. T. y B. B. Nickol. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Londres. p. 273–305.
- Schmidt G. D. 1988. *Essentials of parasitology*. Wm. C. Brown Publisher. p. 298.
- Scoble M. J. 2004. Unitary or unified taxonomy?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **359**: 699–710.
- Shaffer H. B. y R. C. Thomson. 2007. Delimiting species in recent radiations. *Systematic Biology*, **56**: 896–906.
- Simpson G. G. 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia Univ. Press. p. 247.
- Sites J.W. Jr. y J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 462–420.
- Smales L. R. 2013. A review of the genus *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Australia with the description of two new species. *Journal of Parasitology*, **99**: 1106–1112
- Smith H. M. 1955. The perspective of species. *Turtox News*, **33**: 74–77.
- Steinauer M. L., B. B. Nickol y G. Ortí. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology*, **16**: 4097–4109.

- Stelkens R. B., C. Schmid, O. Selz y O. Seehausen 2009. Phenotypic novelty in experimental hybrids is predicted by the genetic distance between species of Cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, **9**: 1–13.
- Tautz D., H. Ellegren y D. Weigel. 2010. Next generation molecular ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**: 1–3.
- Tautz D., P. Arctander, A. Minelli, R. H. Thomas y A. P. Vogler. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecology and Evolution*, **18**: 70–74.
- Templeton A. R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotype in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**: 767–782.
- Templeton A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and boundaries. *Molecular Ecology*, **10**: 779–791.
- Thomson R. C., I. J. Wang y J. R. Johnson. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*, **19**: 2184–2195.
- Van Doorn G. S., P. Edelaar y F. J. Weissing. 2009. On the origin of species by natural and sexual selection. *Science*, **326**: 1704–1707.
- Vázquez-Domínguez E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Editores). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México D.F. p. 441–466.
- Vázquez-Domínguez E. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, **82**: 277–297.

- Vilas R., C. D. Criscione y M. S. Blouin. 2005. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology*, **131**: 1–8.
- Wiens J. J. y T. A. Penkrot. 2002. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **267**: 631–636.
- Wiens, J. J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **30**: 327–362.
- Will K. W., B. D. Mishler y Q. D. Wheeler. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, **54**: 844–851.
- Wolf J. B. W., J., Lindell y N. Backstrom. 2010. Speciation genetics: current status and evolving approaches introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, **365**: 1717-1733.
- Yang Z. y B. Rannala. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **107**: 9264–9269.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Delimitar las especies del género *Neoechinorhynchus* distribuidas en México y Centroamérica empleando secuencias de genes mitocondriales, citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y genes del DNA nuclear ribosomal (ITS1, 5.8S, ITS2 y los dominios D2+D3 del 28S), así como caracteres morfológicos y ecológicos.

2.1.1. Objetivos particulares

- Estimar la divergencia genética intra e interpoblacional de las especies del género *Neoechinorhynchus* con genes mitocondriales y nucleares.
- Inferir las relaciones filogenéticas del género *Neoechinorhynchus*.
- Conocer los patrones filogeográficos de *Neoechinorhynchus brentnickoli* y *Neoechinorhynchus golvani* utilizando secuencias de genes mitocondriales y nucleares.
- Evaluar la diferenciación morfológica entre las especies de *Neoechinorhynchus* que se distribuyen en México y Centroamérica mediante análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminantes (DFA).
- Evaluar las hipótesis taxómicas, incluyendo la descripción de nuevos taxones.



3. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN



3. 1. Artículo I

Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Gerardo Pérez-Ponce de León, Martín García-Varela

Parasitology International (2012) 61: 634–644



Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Gerardo Pérez-Ponce de León, Martín García-Varela*

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-153, C.P. 04510, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2011

Received in revised form 13 June 2012

Accepted 18 June 2012

Available online 23 June 2012

Keywords:

Acanthocephala

Neoechinorhynchus mamesi n. sp.

Dormitator latifrons

Cox 1

LSU

Phylogeny

Haplotype network

Mexico

ABSTRACT

Neoechinorhynchus mamesi n. sp. is described from the estuarine fish *Dormitator latifrons* collected in 3 localities along the coast of Chiapas State in Southwestern Mexico. The new species is characterized by possessing a small trunk, a very small proboscis with relatively very long apical proboscis hooks and small middle and posterior hooks, 2 giant nuclei in the ventral body wall, and males with testes smaller than the cement gland. A multivariate analysis of variance (MANOVA) and a Principal Component Analysis (PCA) of 46 morphometric traits for 21 mature females and 18 males of *N. mamesi* n. sp., *N. brentnickoli* and *N. golvani*, revealed morphological variation among species. DNA sequences of 2 genes, cytochrome oxidase subunit 1 (*cox 1*) of the mitochondrial DNA and the domains D2 and D3 of the large subunit of the nuclear ribosomal RNA (LSU) were used to corroborate the morphological distinction. The genetic divergence estimated among populations of *N. brentnickoli* and *N. mamesi* n. sp. ranged from 10.14 to 10.55% for LSU and from 20.53 to 22.06% for *cox 1*, whereas the genetic divergence between *N. golvani* and *N. mamesi* n. sp. ranged from 20.31 to 21.03% for LSU and from 22.24 to 24.95% for *cox 1*. Maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian inference analyses were performed for the combined data sets (LSU+*cox 1*) and each data set alone. All the phylogenetic analyses showed that the specimens from 3 coastal lagoons of Chiapas State in Southwestern Mexico represented a monophyletic clade with strong bootstrap support and Bayesian posterior probabilities. The haplotype network based on the analysis of the *cox 1* sequences indicated that *N. mamesi* n. sp. is separated by 84 substitutions from *N. brentnickoli*, and with 69 substitutions from *N. golvani*. The morphological evidence, the multivariate analyses, in combination with the genetic divergence estimated with two genes, the reciprocal monophyly in all the phylogenetic analyses, and the haplotype network, suggested that the acanthocephalans found in the intestine of *D. latifrons* in Southwestern Mexico represent a new species, named *N. mamesi* n. sp., and it constitutes the second species of the genus *Neoechinorhynchus* associated with the Pacific fat sleeper along the Pacific Coast of Mexico.

© 2012 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Neoechinorhynchus Stiles and Hassall, 1905 is one of the most diverse genera within Acanthocephala with approximately 101 described species [1–8]. All these species are characterized by possessing a small globular or sub-cylindrical proboscis, armed with 3 circles of 6 hooks each, a single-walled proboscis receptacle and a cerebral ganglion located at the base of proboscis receptacle, males possessing 2 spherical to oblique testes, equatorial or post-equatorial, a single syncytial cement gland, genital pore terminal in both sexes or sub-terminal in females, and oval eggs, elliptical

or elongate, with concentric shells or with polar prolongation of fertilization membrane [2].

In Mexico, 6 species of the genus *Neoechinorhynchus* have been described, 2 of these occur in freshwater turtles, *i.e.*, *N. schmidti* Barger, Thatcher and Nickol, 2004 and *N. emyditoides* Fisher, 1960, and the other 4 species occur in marine, brackish and freshwater fishes, *i.e.*, *N. roseus* Salgado-Maldonado, 1978, *N. golvani*, Salgado-Maldonado, 1978, *N. chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano and Martínez-Ramírez, 2010, and *N. brentnickoli* Monks, Pulido-Flores and Violante-González, 2011 [7,9,10]. Recently, molecular and morphological data revealed that the acanthocephalan *N. golvani* actually comprises a complex of cryptic species [9]. One lineage corresponded with *N. golvani sensu stricto* and is associated with cichlid fishes in strictly freshwater environments. Another two lineages are distributed in brackish water systems along the Gulf of Mexico and Pacific Sea slopes, and are associated with eleotrid fishes, *i.e.*, *Dormitator maculatus* and *Dormitator latifrons*, respectively [9]. A

* Corresponding author at: Departamento de Zoología, Instituto de Biología, UNAM, 04510, México D.F., Mexico. Tel.: +52 5 56229130; fax: +52 5 5550 0164.

E-mail addresses: danyboy_jd26@hotmail.com (C.D. Pinacho-Pinacho), ppdleon@ibunam2.ibiologia.unam.mx (G. Pérez-Ponce de León), garcia@servidor.unam.mx (M. García-Varela).

Table 1

Specimen information, collection sites (CS), sample number, species analyzed, specimen analyzed (N), host species, locality name, geographical coordinates, GenBank accession number, and catalog number (CNHE) for specimens studied in this work. Sequences marked with an asterisk were obtained in the current study. Nd = not determined. The sample number for each locality corresponds with the same number in Figs. 1, 4 and 5.

CS	Sample	Species	N	Host	Locality/sampling date	Coordinates		GenBank		Specimens deposited (CNHE)
						North	West	Cox 1	LSU	
1	1–5	<i>N. mamesi</i> n. sp.	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Rion Pijijapan Lagoon, Chiapas/June, 2010	15° 31' 54.3"	93° 09' 39.4"	JN830787* JN830788* JN830789* JN830790* JN830791*	JN830763* JN830764* JN830765*	8180, 8181, 8182
2	6–10	<i>N. mamesi</i> n. sp.	5	<i>Dormitator latifrons</i>	La Conquista Lagoon, Chiapas/June, 2010	15° 40' 00.20"	93° 24' 51.61"	JN830792* JN830793* JN830794* JN830795* JN830796*	JN830766* JN830767* JN830768* JN830769*	8184
3	11–15	<i>N. mamesi</i> n. sp.	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Joaquín Amaro Estuary, Chiapas/June, 2010	15° 46' 16.19"	93° 24' 30.11"	JN830797* JN830798* JN830799* JN830800* JN830801*	JN830770* JN830771* JN830772* JN830773* JN830774*	8183
4	16–20	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Tamarindo River, Guerrero/June, 2010	16° 38' 07.5"	99° 08' 26.4"	JN830802* JN830803* JN830804* JN830805* JN830806*		8179
5	21–28	<i>N. brentnickoli</i>	8	<i>Dormitator latifrons</i>	Tres Palos Lagoon, Guerrero/September, 2008	16° 48' 00"	99° 47' 00"	JN830807* JN830808* JN830809* JN830810* JN830811* JN830812* JN830813* JN830814*	FJ968157 FJ968156 FJ968158 FJ968159 FJ388991	8178
6	29–33	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Coyuca Lagoon, Guerrero/September, 2008	16° 57' 00"	100° 02' 00"	JN830815* JN830816* JN830817* JN830818* JN830819*	JN830775* JN830776*	8175
7	34–38	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Barra de Pichi Estuary, Michoacán/July, 2010	17° 58' 41.5"	102° 19' 30.0"	JN830820* JN830821* JN830822* JN830823* JN830824*		8174
8	39–43	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Mexcalhuacan Estuary, Michoacán/June, 2010	18° 03' 21.5"	102° 39' 29.8"	JN830825* JN830826* JN830827* JN830828* JN830829*	JN830777* JN830778* JN830779* JN830780* JN830781*	8173
9	44–48	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Huahuca Estuary, Michoacán/July, 2010	18° 10' 39.7"	103° 00' 26.3"	JN830830* JN830831* JN830832* JN830833* JN830834*		8177
10	49–58	<i>N. brentnickoli</i>	10	<i>Dormitator latifrons</i>	Boca de Apiza Estuary, Michoacán/July, 2010	18° 41' 14.46"	103° 44' 04.96"	JN830835* JN830836* JN830837* JN830838* JN830839* JN830840* JN830841* JN830842* JN830843* JN830844*	JN830782* JN830783* JN830784* JN830785* JN830786*	8176
11	59–63	<i>N. brentnickoli</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Cuyutlan Lagoon, Colima/October, 2010	19° 02' 58.6"	104° 15' 58.2"	JN830845* JN830846* JN830847* JN830848* JN830849*		
12	64–66	<i>N. golvani</i>	3	<i>Paraneetroplus fenestratus</i>	Catemaco Lake, Veracruz/June, 2006	18° 25'	95° 07'	JN830850* JN830851* JN830852*	FJ388986 FJ968145 FJ968146	601, 603, 604, 606, 631, 632
13	67–69	<i>N. golvani</i>	3	<i>Cichlasoma pearsei</i>	Nezahualcoyolt Dam, Chiapas/June, 2007	17° 10' 49"	93° 36' 49"	JN830853* JN830854* JN830855*	FJ388996 FJ968141 FJ968142	6756
14	70–72	<i>N. golvani</i>	3	<i>Cichlasoma pearsei</i>	Chicoasen Dam, Chiapas/June, 2007	16° 56' 02"	93° 05' 16"	JN830856* JN830857* JN830858*	FJ388995 FJ968136	6755

(continued on next page)

Table 1 (continued)

CS	Sample	Species	N	Host	Locality/sampling date	Coordinates		GenBank		Specimens deposited (CNHE)
						North	West	Cox 1	LSU	
15	73–75	<i>N. golvani</i>	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Ilusiones Lake, Tabasco/June, 2006	17° 58' 46"	92° 56' 17"	JN830859*	FJ968137 FJ968138 FJ388992 FJ968143 FJ968144	
16	76–78	<i>N. golvani</i>	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Carrizal River, Tabasco/June, 2006	18° 1' 45"	92° 55' 00"	JN830861*	FJ388993 JN830862* FJ968134 JN830863* FJ968135	6754
17	79–81	<i>N. golvani</i>	3	<i>Parachromis friedrichsthalii</i>	Canitzan Lake, Tabasco/June, 2007	17° 28' 57"	91° 25' 27"	JN830864*	FJ388994 JN830865* FJ968139 JN830866* FJ968140	6757
18	82	<i>N. roseus</i>	1	<i>Citharichthys gilberti</i>	Tovara Estuary, Nayarit/October, 2007	21° 31' 37"	105° 29' 14"	JN830867*	FJ389000	6763
19	83	<i>N. roseus</i>	1	<i>Achirus mazatlanus</i>	Caimanero Estuary, Sinaloa/June, 2007	25° 36' 30"	108° 26' 25"	JN830868*	FJ388999	6762
20	84	<i>N. saginatus</i>	1	Nd	Nd	Nd	Nd	DQ089704	AY829091	

morphological analysis of the specimens of *Neoechinorhynchus* associated with the fish *D. latifrons* from a few localities along the Pacific Sea slope, allowed authors to describe one of the allegedly cryptic species (so-called lineage 3), as *N. brentnickoli* [7].

A thorough sampling of the elotrid host (*D. latifrons*) in coastal lagoons along Southwestern Mexico (from Chiapas, northwards to Colima State) allowed us to detect the presence of an undescribed species of *Neoechinorhynchus*. In the current study we describe the new species by using both morphological and molecular evidence.

2. Materials and methods

2.1. Specimen collection

Adult acanthocephalans were collected from the intestines of their definitive hosts from 19 localities in Mexico (Table 1; Fig. 1). Fish were examined for parasites immediately after their capture. The acanthocephalans recovered were placed in distilled water to relax the specimens for 10–12 h at 4 °C. Later, all the specimens were preserved in 100% ethanol, and stored at 4 °C. For taxonomic identification, some specimens were stained with Mayer's paracarmine, dehydrated in a graded ethanol series, cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides with Canada balsam, and were

deposited in the Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, (Table 1). The acanthocephalans collected in this study were assigned to genus *Neoechinorhynchus* and were compared with type-specimens of other congeners, deposited at the CNHE as follows: *N. chimalapasensis* (holotype CNHE-5018, allotype CNHE-5019, 12 paratypes CNHE-5020); *N. golvani* (CNHE-0603); *N. roseus* (holotype CNHE-633, CNHE-634 paratypes) and *N. brentnickoli* (holotype CNHE-7537, allotype CNHE-7538, paratypes CNHE-7539–7540).

2.2. Morphological analyses

The specimens collected in this study were initially identified as *N. brentnickoli*, *N. golvani*, *N. roseus*, and *Neoechinorhynchus* sp., and were drawn with the aid of a drawing tube attached to the microscope. Measurements of the trunk, proboscis hooks, proboscis receptacle, lemnisci, uterine bell, vagina, testes, and cement gland were taken from sexually mature specimens with the use of a light microscope. Measurements are given in micrometers (µm); for all morphological traits of the new species, ranges are given, followed in parentheses by mean values ± standard deviation, and sample size (n). Measurements and drawings of eggs were made from fully developed eggs measured *in situ* through the body wall of female worms.

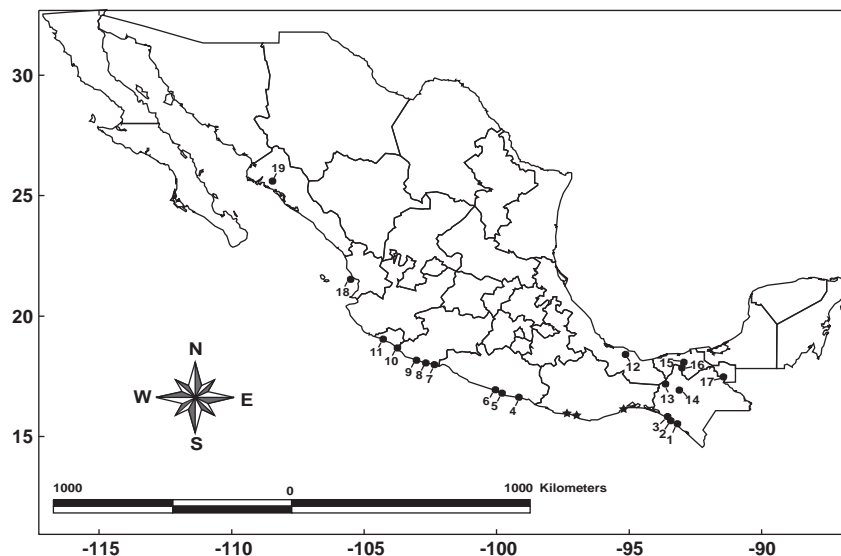


Fig. 1. Sampling sites of specimens of *Neoechinorhynchus mamesi* n. sp. and the other 4 congeneric species reported from Mexico. Collection sites are numbered according to Table 1. The asterisk indicates localities where Pacific fat sleeper fishes were studied but negative of the infection.

Table 2

Factor loadings for the first and second Principal Component Analysis (PCA) for females and males of *N. mamesi* n. sp., *N. brentnickoli* and *N. golvani*. Values greater than 0.50 in absolute value are considered significant and are shown in bold for emphasis.

	PCA 1		PCA 2	
	Females	Males	Females	Males
Body length	-0.957	-0.959	0.164	-0.150
Body width	-0.778	-0.910	-0.049	0.214
Apical hooks				
Dorsal hooks length	0.557	0.378	0.223	-0.301
Dorsal hooks width	0.059	0.140	0.278	-0.226
Roots length	0.503	0.262	0.325	-0.742
Roots width	-0.008	0.320	-0.701	0.377
Lateral hooks length	0.806	0.662	0.268	0.180
Lateral hooks width	0.662	0.427	0.185	0.513
Ventral hooks length	0.622	0.577	0.400	-0.226
Ventral hooks width	0.192	0.422	0.531	0.233
Middle hooks				
Length	0.187	-0.313	0.875	-0.615
Width	-0.416	0.020	0.227	0.119
Posterior hooks				
Length	0.519	0.535	0.522	-0.670
Width	0.018	-0.007	0.645	-0.471
Proboscis length	-0.342	-0.387	0.660	-0.717
Proboscis width	-0.594	-0.108	0.344	0.187
Neck length	-0.263	-0.550	0.232	-0.104
Neck width	-0.764	-0.244	0.144	0.226
Trunk length	-0.952	-0.960	0.181	-0.123
Trunk width	-0.778	-0.910	-0.049	0.214
Proboscis receptacle length	-0.618	-0.371	-0.205	0.396
Proboscis receptacle width	-0.675	-0.718	0.276	0.081
Longer lemniscus length	-0.926	-0.751	0.067	0.032
Longer lemniscus width	-0.855	-0.771	0.213	-0.117
Shorter lemniscus length	-0.935	-0.738	0.060	0.006
Shorter lemniscus width	-0.751	-0.823	0.219	-0.049
Anterior testis length		-0.706		-0.054
Anterior testis width		-0.925		0.115
Posterior testis length		-0.926		-0.319
Posterior testis width		-0.955		0.011
Cement gland length		-0.935		-0.077
Cement gland width		-0.915		0.122
Reproductive system length in males		-0.935		-0.257
Seminal vesicle length		-0.341		0.569
Seminal vesicle width		-0.289		0.631
Reproductive system length in females	-0.787		-0.097	
Uterine bell length	-0.764		-0.256	
Uterine bell width	-0.853		0.075	
Uterus length	-0.552		0.521	
Uterus width	-0.159		-0.374	
Vagina length	-0.277		-0.388	
Vagina width	-0.447		0.111	
Genital pore length	-0.315		-0.557	
Genital pore width	-0.633		0.051	
Eggs length	-0.247		0.607	
Eggs width	-0.260		0.009	

2.3. Multivariate analysis

We used 46 morphometric traits, 35 for males and 37 for females (Table 2). Equality of variances among groups was examined using *F* test. We performed a multivariate analysis of variance (MANOVA) using Scheffé's *F* procedure for *post hoc* comparisons, because it is robust to violations of assumptions inherent in multiple comparison procedures (e.g., the assumption of homogeneity of variances). In addition, Principal Component Analysis (PCA) was implemented to explore and describe patterns of variation of our data. For both analyses 8 females and 6 males of *N. brentnickoli* (holotype CNHE-7537, allotype CNHE-7538, paratypes CNHE-7539–7540), 8 females and 8 males of *Neoechinorhynchus mamesi* n. sp. (holotype CNHE: No. 8180; allotype CNHE: No. 8181; paratypes CNHE: No. 8182–8184) and 5 females and 2 males of *N. golvani* (CNHE-0603)

were selected. The MANOVA and PCA analyses were conducted with the software STATISTICA version 7.1 [11].

2.4. Amplification and sequencing of DNA

Eighty three acanthocephalans from 19 populations were digested overnight at 56 °C in a solution containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na₂ EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl, and 0.1 mg/ml proteinase K. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant using the DNeasy reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions. The two genes; *cox 1* and *LSU* were amplified using the polymerase chain reaction (PCR). A fragment of the mitochondrial DNA *cox 1*, was amplified using the forward 5'-AGTTCTAATCATAA(R)GATAT(Y)GG-3' and the reverse primer 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'. However, specific primers were designed for each species of *Neoechinorhynchus* (Table 3). The domains D2 + D3 from *LSU* rDNA were amplified using the forward primer 5' CAAGTACCCTGAGGGAAAGTTGC 3' and the reverse primer 5' GTCGATAGGACTCCCTTTG 3' [12].

PCR reactions (25 µl) consisted of 10 µM of each primer, 2.5 µl of 10× buffer, 2 mM MgCl₂, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling parameters for rDNA amplifications included denaturation at 94 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, followed by a post-amplification incubation at 72 °C for 10 min. PCR cycling conditions for the *cox 1* amplifications included denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, annealing at 40–50 °C for each species of *Neoechinorhynchus* (Table 3) for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, followed by a post-amplification incubation at 72 °C for 10 min. Sequencing reactions were performed using ABI Big Dye (Applied Biosystems, Boston, MA) terminator sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using an ABI 3730 capillary DNA sequencer. Contigs were assembled and base-calling differences resolved using Codoncode Aligner version 3.5.4 (Codoncode Corporation, Dedham, MA). Sequences were deposited in the GenBank data set (Table 1).

2.5. Alignments and phylogenetic analyses

Sequences obtained in the current research from *LSU* and *cox 1* were aligned separately using the software Clustal W [13] and adjusted manually with MacClade program [14]. Maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference analyses were performed for each data set and the combined data sets (*LSU* + *cox 1*). The MP tree was inferred using the program PAUP*4.0b10 [15]. The ML tree was inferred using RAxML 7.0.4, for each and combined data sets [16]. The Modeltest program version 3.0 [17] was used for inferring the best model of evolution for all

Table 3

Primer sequence information.

Locus	Species	Primer name	Primer sequence (5'–3')	Tm
<i>Cox 1</i>	<i>N. mamesi</i>	509F This study	AGTTCTAATCATAA(R)GATAT(Y)GG	42 °C
	n. sp.	510R This study	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
	<i>N. roseus</i>			
	<i>N. brentnickoli</i>	520F This study	GTGTGAGGAGGGTTAGTTGG	50 °C
	<i>N. golvani</i>	521R This study	AAAGATAAATGTTCTAATTTTAGG	
<i>LSU</i>		512F This study	GGGTTGTATAACATRGTTG	40 °C
		513R This study	TTAAAAATTCGATCTAACAA	
		502F	CAAGTACCCTGAGGGAAAGTTGC	50 °C
		(García-Varela and Nadler, 2005)		
		536R	GTCGATAGGACTCCCTTTG	
	(García-Varela and Nadler, 2005)			

Table 4
Tree statistics for LSU and *cox 1*, and combined (LSU + *cox 1*) data sets. Number of informative characters, C.I., and tree length refer to parsimony inference. Pinv (proportion of invariable sites), Gd (shape of gamma distribution), $-\ln$ likelihood refers to maximum likelihood inference and Akaike Information Criterion (AIC) model inferred with Modeltest program.

Data set	Total characters	Uninformative characters	Constant characters	Informative characters	C.I.	Tree length	$-\ln$ likelihood	Pinv	Gd	Model AIC
<i>Cox 1</i>	538	30	290	218	0.78	463	2582.838973	0.3598	0.7024	TVM+I+G
LSU	754	64	379	311	0.89	567	3207.672566	0.4101	0	TVM+I
<i>cox 1</i> + LSU	1292	94	669	529	0.84	1027	7427.997809	0.1933	0.6046	K81uf+I+G

the data sets (Table 4). Tree searches were performed using 1000 (MP) random taxon addition heuristic searches. Clade support was assessed by bootstrap resampling with 10,000 replicates by MP and ML trees. Additionally, Bayesian analyses were performed with the program MRBAYES version 3.1.2 [18]. The settings were 2 simultaneous runs of the Markov chain Monte Carlo (MCMC) for 10 million generations, sampling every 200 generations, a heating parameter value of 0.2 and a 'burn-in' of 10%. Trees were drawn using FigTree program version 1.3.1 [19].

2.6. Haplotype network construction

Gene genealogies were inferred using two approaches for haplotype network construction. Median-joining networks were calculated with the program NETWORK version 4.2.0.1 (www.fluxusengineering.com) keeping the parameter $\epsilon=0$ [20]. This method starts with minimum spanning trees combined within a single network and then, to reduce tree length, median vectors (consensus sequences) are added. Such vectors can be interpreted as possibly extant unsampled sequences or extinct ancestral sequence [20]. In addition, TCS program version 1.21

[21] was employed to infer the haplotype networks using statistical parsimony [22] with a confidence of 95%.

3. Results

3.1. Morphological description

3.1.1. *N. mamesi* n. sp. (Fig. 2)

Description based on 21 specimens (10 males and 11 females). Trunk cylindrical swollen in anterior region, slender in posterior region (Fig. 2: A, B). Trunk with a thick wall in both dorsal and ventral sides, containing 5 dorsal giant subcuticular nuclei and 2 ventral nuclei ($n=21$). Proboscis wider than long, bearing 3 circular rows each of 6 hooks ($n=21$) (Fig. 2: C). Apical hooks with strong roots. Apical, middle, posterior hooks are similar in size in both sexes (Table 5). Small sensory papillae located near the neck (Fig. 2: C). Neck wider than long. Proboscis receptacle attached to the junction of the neck with the trunk. Cerebral ganglion triangular, slightly conspicuous. Binucleate lemniscus shorter than uninucleate lemniscus. Both lemnisci extend beyond the proboscis receptacle. Lemnisci nuclei are ovoid and fragmented in some specimens (Fig. 2: D). Striated ligament sac connected to the uterine bell in females. Uterine bell narrow at anterior opening, vagina elongate, wide at posterior end. Females with one pair of muscle bands attached ventrally at genital pore, extending to dorsal body wall (Fig. 2: E). Testes oval, tandem, overlapping (Fig. 2: A), posterior testis overlapping cement gland (Fig. 2: A). Anterior testis slightly larger than the posterior. Efferent ducts connecting each testis with each seminal gland. Seminal gland oval, possessing an ejaculatory duct. Single cement gland with 8 unfragmented nuclei. Reservoir of the cement gland located behind the cement gland. Saefftingen's pouch located immediately posterior to cement gland. Genital pore ventral in both sexes. Mature eggs oval, without elongation of fertilization membranes. Eggs measured through body wall 22–25 (23 ± 1 , $n=6$) long, 6–9 (7 ± 1 , $n=6$) wide (Fig. 2: F).

Male (Fig. 2: A, D): body 1230–2360 (1993 ± 470 , $n=9$) long, 430–820 (641 ± 132 , $n=9$) wide. Trunk 1165–2284 (1847 ± 500 , $n=7$) long, 430–820 (637 ± 141 , $n=8$) wide. Proboscis 26–44 (36 ± 6 , $n=8$) long, 50–150 (68 ± 30 , $n=9$) wide. Proboscis hooks in anterior circle, dorsal hooks 38–52 (45 ± 5 , $n=8$) long, 7–9 (8 ± 0.8 , $n=8$) wide at base, root of dorsal hooks 20–23 (21 ± 1 , $n=5$) long, 6–8 (7 ± 0.7 , $n=5$) wide; lateral hooks 38–53 (44 ± 5 , $n=7$) long, 8–9 (8 ± 0.4 , $n=7$) wide at base, root of lateral hooks 22 (22 ± 0 , $n=2$) long, 8 (8 ± 0 , $n=2$) wide; ventral hooks 40–52 (45 ± 4 , $n=7$) long, 8–9 (8 ± 0.8 , $n=7$) wide at base, root of ventral hooks 23–23 (23 ± 0 , $n=2$) long, 7 (7 ± 0 , $n=2$) wide. Hooks of middle circle 12–17 (14 ± 1 , $n=27$) long, 4–9 (4 ± 1 , $n=27$) wide; posterior circle 13–17 (15 ± 1 , $n=24$) long, 3–9 (4 ± 0.6 , $n=24$) wide. Neck 18–40 (30 ± 7 , $n=9$) long, 55–212 (82 ± 49 , $n=9$) wide. Proboscis receptacle 205–275 (241 ± 21 , $n=10$) long, 5–8 (6 ± 10 , $n=10$) wide. Longer lemniscus 235–500 (405 ± 87 , $n=10$) long, 30–87 (59 ± 21 , $n=10$) wide; shorter lemniscus 167–470 (366 ± 95 , $n=10$) long, 20–100 (55 ± 24 , $n=10$) wide. Reproductive system almost fully occupies posterior 2/3 of body length, 750–1830 (1386 ± 414 , $n=9$) long. Anterior testis 177–660 (419 ± 160 , $n=9$) long, 155–400 (310 ± 94 , $n=9$) wide. Posterior testis 152–440 ($317 \pm$

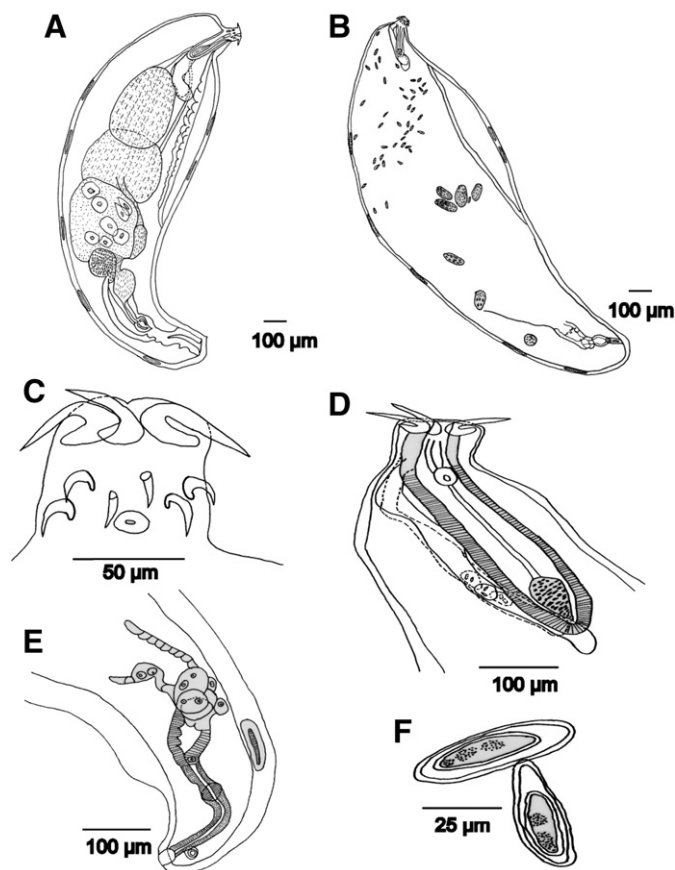


Fig. 2. *Neoechinorhynchus mamesi* n. sp. A. Male (holotype). B. Female (allotype). C. Proboscis of (allotype). D. Anterior region of the male. E. Posterior region of the female. F. Eggs (paratypes).

Table 5Hook sizes for *Neoechinorhynchus mamesi* n. sp. and the other congeneric species from Mexico. Sizes are given as average (minimum–maximum).

	Apical hook				Posterior hook	Length–width of the trunk		Length-to-width ratio
	Dorsal	Lateral	Ventral	Middle hook				
<i>N. brentnickoli</i>								
Male	43 (40–47)	39 (37–43)	43 (39–45)	18 (15–22)	15.5 (15–16)	3140 (2150–3550)	753 (450–910)	4:1
Female	42 (40–47)	38 (35–40)	43 (40–47)	19 (15–20)	16 (14–19)	5553 (4000–8100)	915 (800–1350)	6:1
<i>N. chimalapasensis</i>								
Male	34.2 (33–35)	34.2 (33–35)	34.2 (33–35)	19 (15–20)	16.4 (15–19)	5458 (3831–7672)	587 (485–712)	9:1
Female	38 (36–40)	38 (36–40)	38 (36–40)	20 (19–22)	15 (15)	9832 (7761–13,117)	724 (554–851)	14:1
<i>N. golvani</i>								
Male	48 (48)	45 (45)	48 (48)	18 (18)	18.5 (18–19)	1020 (1019–1021)	350 (350)	3:1
Female	48 (46–51)	48 (45–52)	50 (47–53)	23 (22–25)	19 (19–20)	1962 (740–3200)	512 (220–850)	3:1
<i>N. roseus</i>								
Male	45 (45)	44.5 (42–47)	43.5 (42–45)	15 (15)	15 (15)	6525 (5850–7,2000)	765 (750–780)	8:1
Female	45.5 (45–46)	42 (42)	44 (42–46)	17.5 (17–18)	15.5 (15–16)	7325 (6750–7900)	630 (550–710)	12:1
<i>N. mamesi</i> n. sp.								
Male	45 (38–52)	44 (38–53)	45 (40–52)	14 (12–17)	15 (13–17)	1847 (1165–2284)	637 (430–820)	3:1
Female	46 (35–54)	44 (37–54)	45 (37–55)	15 (13–17)	16 (13–20)	2414 (1383–3542)	746 (350–1110)	3:1

109, n=8) long, 167–430 (325±93, n=8) wide. Seminal vesicle 62–425 (187±115, n=7) long, 10–600 (156±185, n=8) wide. Cement gland 115–580 (343±188, n=10) long, 165–450 (310±114, n=10) wide. Copulatory bursa opens terminally 57–130 (104±40, n=3) long, 57–117 (83±30, n=3) wide, which was measured within the trunk.

Female (Fig. 2: B, C, E, F): body 1450–3620 (2323±859, n=7) long, 350–1110 (746±252, n=10) wide. Trunk 1383–3542 (2414±717, n=11) long, 350–1110 (746±252, n=10) wide. Proboscis 26–58 (47±10, n=8) long, 60–71 (66±4, n=8) wide. Proboscis hooks in anterior circle, dorsal hooks 35–54 (46±6, n=8) long, 8–10 (8±0.6, n=8) wide at base, root of dorsal hooks 22–25 (23±1, n=7) long, 7–9 (8±0.6, n=7) wide; lateral hooks 37–54 (44±5, n=8) long, 7–9 (8±0.5, n=8) wide at base, root of lateral hooks 23 (23±0, n=2) long, 8 (8±0, n=2) wide; ventral hooks 37–55 (45±5, n=8) long, 8–9 (8±0.4, n=8) wide at base, root of ventral hooks 22–23 (22±0.5, n=3) long, 7–8 (7±0.5, n=3) wide. Hooks of middle circle 13–17 (15±1, n=23) long, 4–6 (4±0.5, n=23) wide; posterior circle 13–20 (16±2, n=23) long, 4–5 (4±0.7, n=22) wide. Neck 15–35 (25±6, n=8) long, 60–80 (68±6, n=8) wide. Proboscis receptacle 215–300 (248±30, n=8) long, 52–87 (68±14, n=8) wide. Longer lemniscus 187–465 (342±114, n=6) long, 20–87 (58±23, n=6) wide; shorter lemniscus 162–425 (304±102, n=6) long, 20–92 (52±26, n=5) wide. Total length of reproductive system from anterior margin of the uterine bell to terminal genital pore 350–700 (475±156, n=4) long. Uterine bell 150–340 (207±80, n=5) long, 43–120 (62±32, n=5) wide. Uterus 100–223 (158±47, n=6) long, 20–96 (49±29, n=6) wide. Length vagina 25–137 (70±43, n=7) long, 9–35 (22±7, n=7) wide. Genital pore subterminal 20–55 (34±12, n=8) long, 18–52 (34±13, n=8) wide. Eggs elliptical 22–25 (23±1, n=6) long, 6–9 (7±1, n=6) wide.

3.1.2. Taxonomic summary

Type-host: *D. latifrons* (Richardson, 1844) (Eleotridae: Pacific fat sleeper).

Site of infection: Intestine

Type-locality: Rión Pijijiapan, Chiapas State, Mexico (15° 31' 54.3" N, 93° 09' 39.4" W)

Additional localities: La Conquista, Chiapas State, Mexico (15° 40' 00.20" N, 93° 24' 51.61" W) and Joaquín Amaro, Pijijiapan, Chiapas State, Mexico (15° 46' 16.19" N, 93° 24' 30.11" W).

Type-material: Holotype CNHE: No. 8180; allotype CNHE: No. 8181; paratypes CNHE: No. 8182–8184.

Infection: Rión Pijijiapan 8/8 fish (prevalence 100%); La Conquista 1/1 fish (prevalence 100%) and Joaquín Amaro 1/1 fish (prevalence 100%) were parasitized by acanthocephalans.

Etymology: The new species is named after the Mayan ethnic group (Mames) that inhabits the coastal region of Chiapas, Mexico and Guatemala.

3.1.3. Multivariate analyses

Multivariate descriptive statistics from MANOVA *post hoc* tests revealed that 14 from 37 characters for the females and 11 from 35 characters for males were significantly different between species ($P<0.05$) in at least one pairwise group comparison in both sexes. When considering only diagnostic characters in the MANOVA, significant differences were found, e.g., lengths of dorsal, ventral and lateral apical hooks in females (Wilks' $\lambda=0.42033$, $P<0.02284$; Fig. 3A); lengths of middle and posterior hooks in females (Wilks' $\lambda=0.12491$, $P<0.000001$; Fig. 3A); lengths of length, dorsal, lateral and ventral apical hooks in males (Wilks' $\lambda=0.67415$, $P<0.058095$; Fig. 3B); lengths of middle and posterior hooks in males (Wilks' $\lambda=0.09615$, $P<0.00001$; Fig. 3B); proboscis length in females (Wilks' $\lambda=0.32756$, $P<0.00063$; Fig. 3C); proboscis length in males (Wilks' $\lambda=0.12754$, $P<0.00004$; Fig. 3C) and anterior and posterior testis length (Wilks' $\lambda=0.41047$, $P<0.02541$; Fig. 3D). PCA analysis clearly shows that, for females (Fig. 3E), three clusters are formed, corresponding with each of the three species considered in that analysis, i.e., *N. brentnickoli*, *N. golvani*, and *N. mamesi* n. sp.; however, for males (Fig. 3F), polygons of *N. brentnickoli* and *N. mamesi* overlap slightly, while that of *N. golvani* is clearly separated from the other two. The first two axes of the PCA for females and males (Fig. 3E, F) accounted for 50.81 and 54.25% of the variation, respectively. We considered factor loadings with an absolute value greater than 0.50 highly significant in interpreting principal component structure (Table 2).

3.1.4. Remarks

In Mexico 4 species of the genus *Neoechinorhynchus* associated with brackish and freshwater fishes have been described [10]. The new species can be readily distinguished from *N. chimalapasensis* and *N. roseus* by its smaller size and by having a smaller body length-to-width ratio (LWR) (see Table 5). *N. mamesi* n. sp. closely resembles *N. golvani* and *N. brentnickoli*. On average, the new species is relatively similar in size with respect to *N. golvani* but it is smaller with respect to *N. brentnickoli*. However, it can be distinguished from *N. golvani* by having a less marked dimorphism in trunk length between sexes (males 1165–2284 (1847) females 1383–3542

(2414) vs. males 1020 (1019–1021) females 1962 (740–3200) respectively) (Table 5). In addition, the new species possesses 2 giant ventral nuclei instead of only 1, has shorter hooks in the 3 circles in both sexes (anterior 44 to 45 vs. 45 to 48, middle 12 to 17 vs. 18, and posterior 13 to 17 vs. 18 to 19, respectively in males) and (anterior 44 to 46 vs. 48 to 50, middle 13 to 17 vs. 22 to 25, and posterior 13 to 20 vs. 19 to 20 respectively in females), and has larger testes (anterior testis 177–660 (419) long by 155–400 (310) wide vs. 112–408 long by 123–262 wide and posterior testis 152–440 (317) long by 167–430 (325) wide vs. 112–262 long by 153–300 wide, respectively).

On the other hand, *N. mamesi* n. sp. is morphologically very similar to *N. brentnickoli* and they both are found parasitizing Pacific fat sleepers along the Pacific Coast of Mexico, but also can be distinguished by having less dimorphism in trunk length between sexes (males 1165–2284 (1847) females 1383–3542 (2414) vs. males 3140 (2150–3550) females 5553 (4000–8100), respectively) (Table 5). Additionally, the new species is distinguished from *N. brentnickoli* because even though they

both possess 2 giant ventral nuclei, in the new species these nuclei are separated and not contiguous as in the latter species, and also because proboscis hooks in *N. mamesi* n. sp. differ in size with respect to those in *N. brentnickoli* (i.e., anterior hooks 44 to 45 vs. 39 to 43, middle hooks 12 to 17 vs. 15 to 22 and posterior hooks 13 to 17 vs. 15 to 16 respectively in males) and (anterior hooks 44 to 46 vs. 38 to 43, middle 13 to 17 vs. 15 to 20 and posterior 13 to 20 vs. 14 to 19 respectively in females) (Table 5). Finally, the new species possesses smaller testes (anterior testis 177–660 (419) long by 155–400 (310) wide vs. 425–640 (568) long by 255–450 (361) wide and posterior testis 152–440 (317) long by 167–430 (325) wide vs. 265–545 (428) long by 240–465 (365) wide, respectively).

3.2. Base composition and genetic divergence

DNA fragments of the LSU and *cox 1* were amplified and sequenced for individuals representing 5 species of the genus *Neoechinorhynchus*. *N. mamesi* n. sp., *N. brentnickoli*, *N. golvani*, *N.*

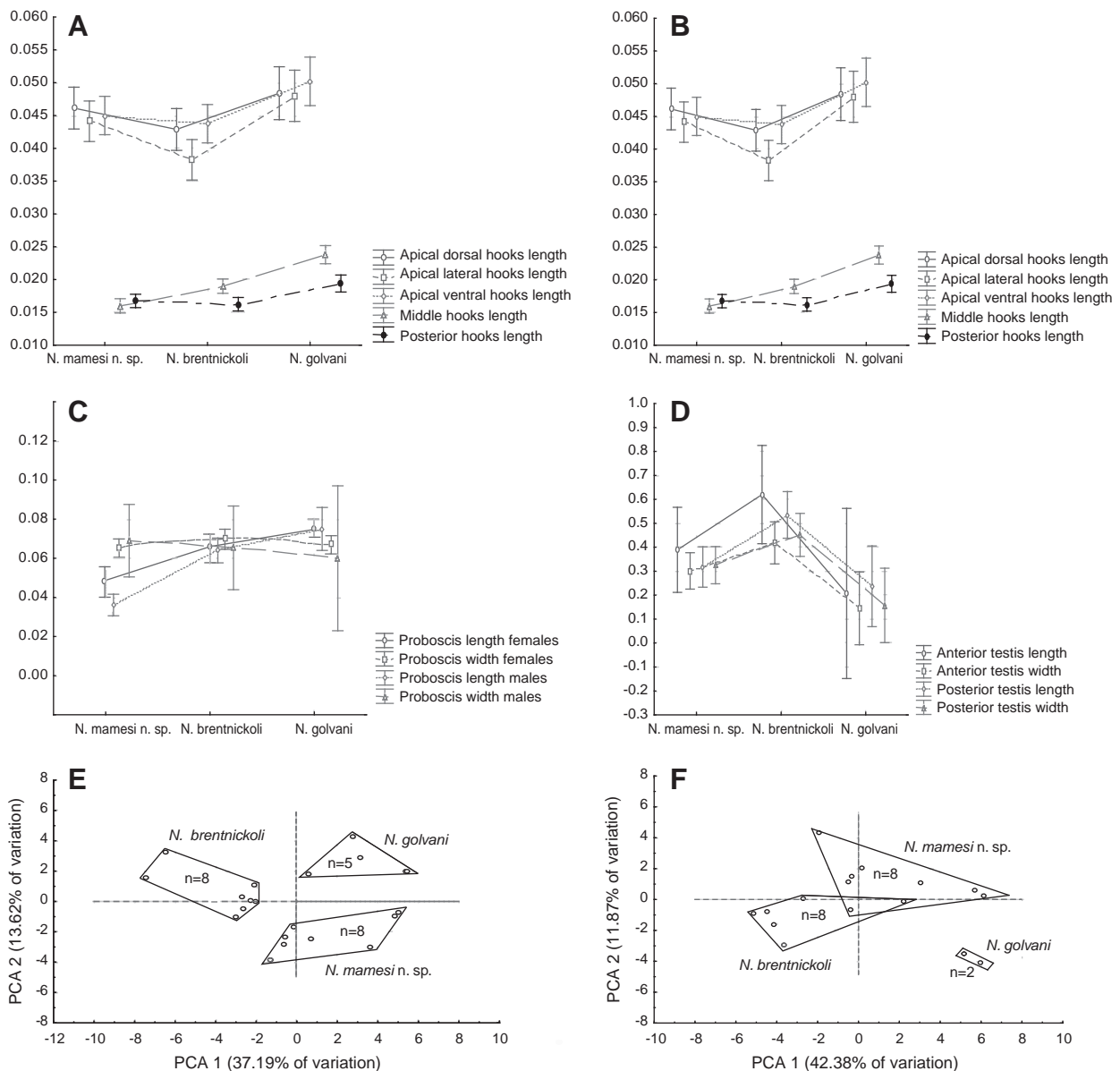


Fig. 3. Multivariate analysis of variance in three species of *Neoechinorhynchus*. Apical, middle and posterior hooks length of females (A). Apical, middle and posterior hooks length of males (B). Proboscis length and wide of females and males (C). Testis length and width (D). Principal Component Analysis scatterplots for females (E) and males (F).

Table 6

Genetic divergence estimated among 5 clades (species) and intraclade, with the LSU gene (LSU; lower matrix) and *cox 1* gene (*cox 1*; upper matrix). Uncorrected *P* distances are expressed as percentages.

Cox 1/LSU	<i>N. brentnickoli</i>	<i>N. golvani</i>	<i>N. roseus</i>	<i>N. saginatus</i>	<i>N. mamesi</i> n. sp.	Intraclade	
						<i>cox 1</i>	LSU
<i>N. brentnickoli</i>		23.79 to 25.91	22.77 to 24.12	27.61 to 28.07	20.53 to 22.06	0.23 to 3.21	0.13 to 0.27
<i>N. golvani</i>	21.43 to 22.28		26.25 to 28.11	28.42 to 30.77	22.24 to 24.95	0.23 to 10.41	0.12 to 1.37
<i>N. roseus</i>	31.42 to 31.57	32.13 to 32.73			27.21 to 27.84	0	0.29
<i>N. saginatus</i>	33.21 to 33.35	31.86 to 32.15	35.76 to 36.20		29.53 to 30.46	0	0
<i>N. mamesi</i> n. sp.	10.14 to 10.55	20.31 to 21.03	32.07 to 32.38	33.34 to 33.50		0.23 to 2.06	0.1 to 0.13

roseus and *N. saginatus*. PCR products varied from 815 to 824bp for LSU and from 490 to 620bp for *cox 1*. The 5 species analyzed in this study amplified with different sets of primers for *cox 1* (see Table 3).

Nucleotide frequencies for the combined (LSU+*cox 1*) data set were 0.26 (A), 0.15 (C), 0.23 (G), and 0.34 (T). The total length of

each data set and the concatenation of these (LSU+*cox 1*) data sets are shown in Table 4. The genetic divergence estimated among the populations of *N. mamesi* n. sp., *N. brentnickoli*, and *N. golvani* ranged from 10.14 to 21.03% for LSU and from 20.53 to 25.91% for *cox 1* (Table 6).

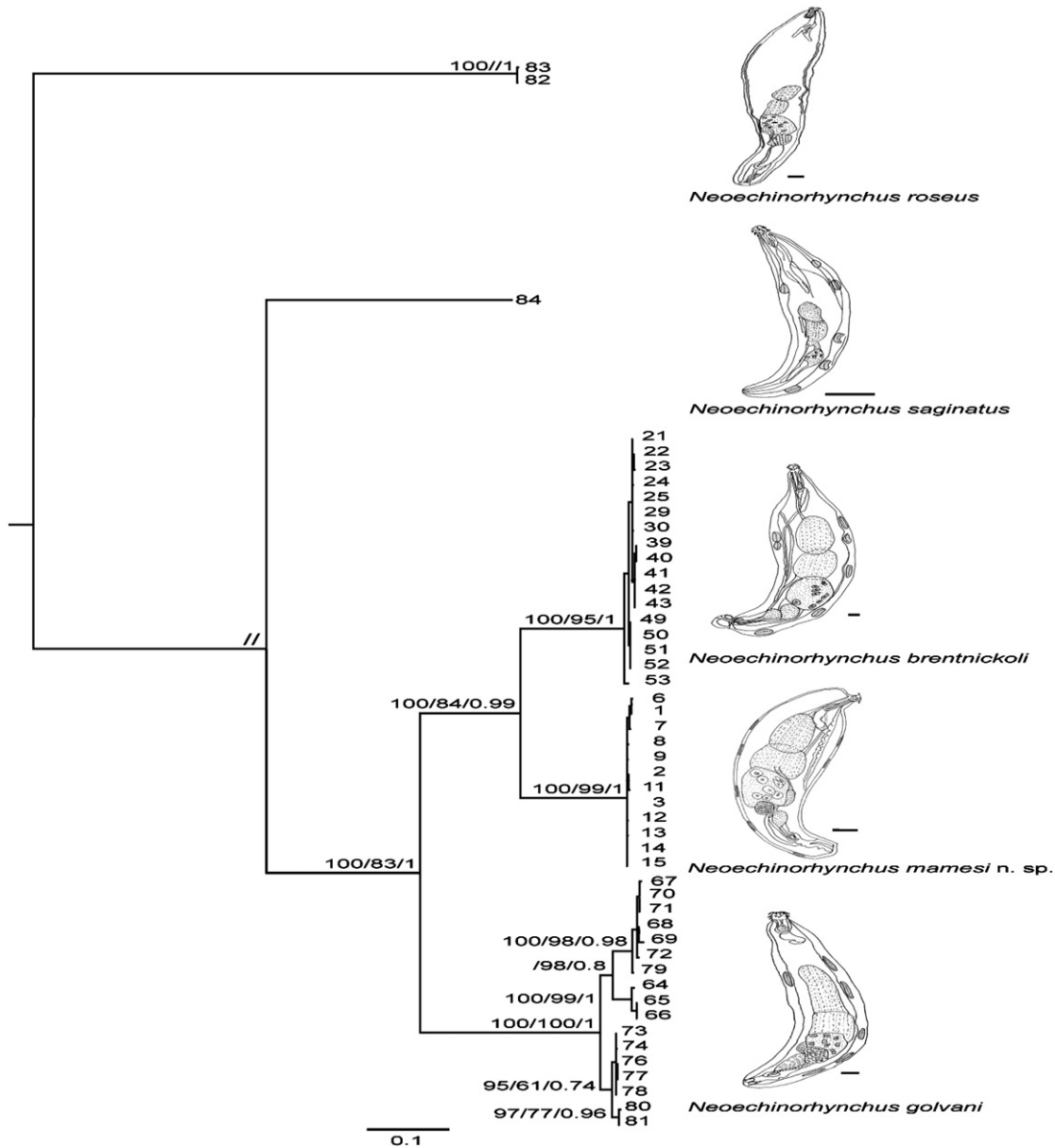


Fig. 4. Trees inferred with the combined (*cox 1*+LSU) data set, using maximum parsimony (1027 steps) and maximum likelihood (−ln likelihood 7427.997809) methods and Bayesian inference. Numbers near internal nodes show MP/ML bootstrap clade frequencies and posterior probability clade frequencies. Bars = 500µm.

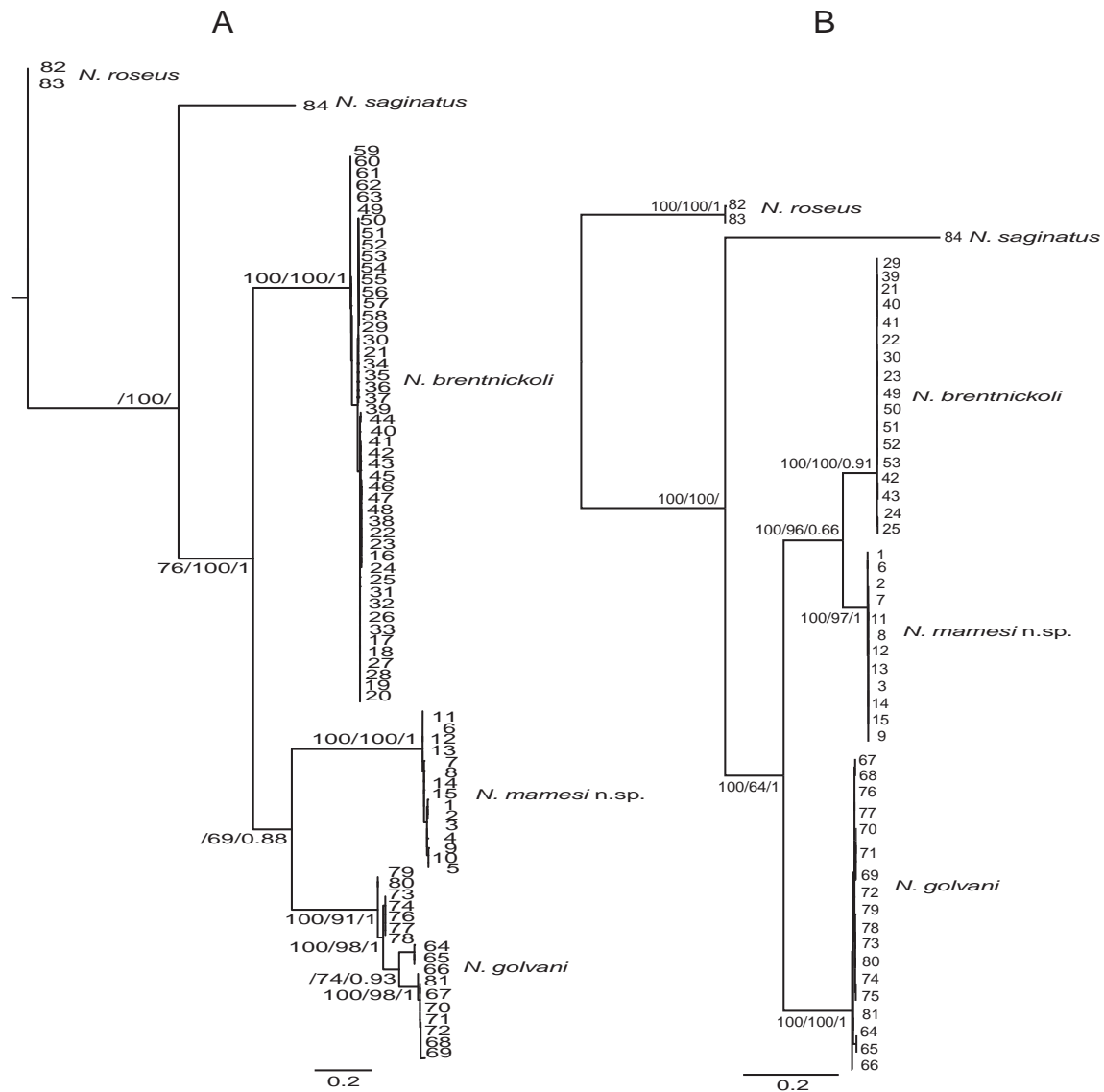


Fig. 5. Trees inferred with the maximum parsimony and maximum likelihood methods and Bayesian inference. A. Cox 1 data set. B. LSU data set. Numbers near internal nodes show MP/ML bootstrap clade frequencies and posterior probability clade frequencies.

3.3. Combined LSU + cox 1 data set

This data set consisted of two genes (LSU + cox 1), included 49 individuals with 1292 characters, of which 529 were parsimony informative. Parsimony analysis of this combined dataset yielded 14,520 trees with a C.I.=0.84 and a length of 1027 steps (Table 4). The MP strict consensus tree shows the 5 main clades, which are recognized as five species. The 12 specimens collected in Pacific fat sleepers from Southwestern Mexico form a monophyletic clade with 100% bootstrap support. In the combined data set this clade is the sister taxa to *N. (N) brentnickoli*, and both clades received strong nodal support (Fig. 4). The ML analysis yielded a single tree with $-\ln=7427.997809$. The ML topology also showed the main 5 clades as in the MP tree, but the support among the clades was lower than MP analysis. The Bayesian tree also yielded the same branch pattern as the MP and ML trees and it was well supported with posterior probability values (Fig. 4). To examine the separate contribution of each data set in the systematic position of the species of *Neoechinorhynchus*, additional phylogenetic analyses were conducted using cox 1 and LSU data sets separately as we show next.

3.4. Cox 1 data set

This data set included 83 taxa, with 538 characters (missing data treated in the analysis), of which 218 were parsimony informative (Table 4). Maximum parsimony analysis (Fig. 5: A) yielded 2039 trees with a C.I.=0.78 and length of 463 steps. The MP strict consensus tree, as well as the ML and Bayesian inference trees showed 5 major clades that received high bootstrap support and Bayesian posterior probabilities (Fig. 5: A). The tree inferred with cox 1 data set, placed *N. mamesi* n. sp., as the sister species of *N. golvani* albeit nodal support was low for this sister taxa relationship (Fig. 5: A).

3.5. LSU data set

This data set included 50 taxa, with 754 characters, of which 311 were parsimony informative. Maximum parsimony analysis (Fig. 5: B) yielded 195 trees with a C.I.=0.89 and length of 567 steps (Table 4). The MP strict consensus tree yielded the same topology as the ML and Bayesian trees, and also the same topology as the cox 1 analyses. Five main clades are recognized, with almost identical

Southwestern Mexico seems to represent a gap in the distribution of *Neoechinorhynchus* spp., even though its definitive host is commonly found in coastal lagoons in Oaxaca. The absence of acanthocephalans in populations of Pacific fat sleepers in Oaxaca allows us to speculate that such gap is the result of the absence of the crustacean intermediate host, which is probably restricted to strictly freshwater environments [27], where *D. latifrons* eventually penetrates, and may become infected. Other possibilities could be related to seasonal variations (i.e. dry or wet season) or the life cycle stage of the definitive host (i.e. during the reproductive period the host reduces feeding activity and therefore the abundance of the acanthocephalans is low) [28].

Since the fish definitive host occurs along the entire Pacific Coast of Mexico, it seems likely that the intermediate host plays a major role in the diversification of *Neoechinorhynchus*, with the Isthmus of Tehuantepec acting in some way as a biogeographical barrier that separated *N. brentnickoli* and the new species from their ancestor. This region of Mexico has a complex geologic history and is the major factor responsible for the divergence of numerous animal terrestrial lineages [29–31]. Future samplings of Pacific fat sleepers along Central America Pacific Coast, and even samplings in northern South America will determine if the new species is also found there, or if other potential biogeographical barriers determine if other species of *Neoechinorhynchus* will be found in the near future. Still, the hypothesis that the intermediate host is the limiting factor in the distribution of these species of acanthocephalans (and not the definitive host) needs to be determined by proper sampling of potential intermediate hosts, and in addition to that, a more extensive sampling of Pacific fat sleepers in Oaxaca will be needed to corroborate it represents a gap in the distribution of these acanthocephalans.

5. Conclusions

N. mamesi n. sp. is the second species of the genus associated to the Pacific fat sleeper (*D. latifrons*) in the Southwestern Pacific Ocean coast of Mexico. Morphologically, the new species is distinguished from the other six congeneric species described from reptiles and fishes in Mexico by possessing a small trunk, a very small proboscis with long apical proboscis hooks and small middle and posterior hooks. Morphological distinction was further demonstrated by MANOVA and PCA analyses and sequencing 2 molecular markers. The high levels of genetic divergence, the topology of phylogenetic trees with evidence of reciprocal monophyly, and the haplotype network support the erection of the new species.

Acknowledgments

We are grateful to Luis García Prieto for providing specimens of *Neoechinorhynchus* from the CNHE, Laura Marquez for her help with the use of the DNA sequencer, and Rogelio Rosas Valdez and David Ivan Guadalupe Hernández Mena for their support during field work. This research was partially supported by grants from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT 215709 and PAPIIT 202111) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 83043) to GPPL. CDPP thanks CONACYT for the scholarship and the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] Aho JM, Mulvey M, Jacobsen KC, Esch GW. Genetic differentiation among congeneric acanthocephalans in the yellow-bellied slider turtle. *Journal of Parasitology* 1992;78:974–81.
- [2] Amin OM. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles & Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology* 2002;53:1–18.
- [3] Amin OM, Abdullah MAS, Mhaisen FT. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *zabensis* sp. n. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from freshwater fish in northern Iraq. *Folia Parasitologica* 2003;50:293–7.
- [4] Barger MA, Thatcher VE, Nickol BB. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology* 2004;71:1–3.
- [5] Barger MA, Nickol BB. A key to the species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from turtles. *Comparative Parasitology* 2004;71:4–8.
- [6] Amin OM, Christison WK. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *dorsovaginatus* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the dusky kob *Argyrosomus japonicus* (Sciaenidae) on the southern coast of South Africa. *Systematic Parasitology* 2005;61:173–9.
- [7] Monks S, Pulido-Flores G, Violante-González J. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Dormitator latifrons* (Perciformes: Eleotridae) from the Pacific Coast of Mexico. *Comparative Parasitology* 2011;78: 21–8.
- [8] Amin OM, Ha NV, Ha DN. The description of six new species of *Neoechinorhynchus* from marine fish in Vietnam. *Parasite* 2011;18:21–34.
- [9] Martínez-Aquino A, Reyna-Fabián ME, Rosas-Valdez R, Razo-Mendivil U, Pérez-Ponce de León G, García-Varela M. Detecting a complex of cryptic species within *Neoechinorhynchus golvani* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) inferred from ITSs and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 2009;95: 1040–7.
- [10] García-Prieto L, García-Varela M, Mendoza-Garfias B, Pérez-Ponce de León G. Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa* 2010;2419:1–50.
- [11] StatSoft Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com2005.
- [12] García-Varela M, Nadler SA. Phylogenetic relationships of palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 2005;91:1401–9.
- [13] Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994;22:4673–80.
- [14] Maddison DR, Maddison WP. MacClade Version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.
- [15] Swofford DL. PAUP 4.0b10. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.
- [16] Stamatakis A. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 2006;22:2688–90.
- [17] Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;9:817–8.
- [18] Huelsenbeck JP, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 2001;17:754–5.
- [19] Rambaut A. FigTree v1.3.1. Institute of evolutionary biology. University of Edinburgh; 2006.
- [20] Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 1999;16:37–48.
- [21] Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 2000;9:1657–9.
- [22] Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. A cladistic-analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA-sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 1992;132: 619–33.
- [23] García-Varela M, García-Prieto L, Pérez Rodríguez R. Molecular identification and first description of the male of *Neoechinorhynchus schmidtii* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae), a parasite of *Trachemys scripta* (Testudines) in México. *Parasitology International* 2011;60:433–9.
- [24] O'Mahony EM, Bradley DG, Kennedy CR, Holland CV. Evidence for the hypothesis of strain formation in *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala): an investigation using mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* 2004;129:341–7.
- [25] García-Varela M, Pérez-Ponce de León G. Validating the systematic position of *Profilicollis* Meyer, 1931 and *Hexaglandula* Petrochenko, 1950 (Acanthocephala: Polymorphidae) using cytochrome C oxidase (*cox 1*). *Journal of Parasitology* 2008;94:212–7.
- [26] Miller RR. Freshwater fishes of México. Chicago: The University of Chicago Press; 2005.
- [27] Kennedy CR. Ecology of the Acanthocephala. School of Biological Sciences, University of Exeter; 2006.
- [28] Violante-González J, Aguirre-Macedo ML, Vidal-Martínez VM. Temporal variation in the helminth parasite communities of the Pacific fat sleeper, *Dormitator latifrons*, from Tres Palos lagoon, Guerrero, Mexico. *Journal of Parasitology* 2008;94:326–34.
- [29] Cortés-Rodríguez N, Hernández-Baños BE, Navarro-Sigüenza AG, Peterson AT, García-Moreno J. Phylogeography and population genetics of the Amethyst-throated Hummingbird (*Lampornis amethystinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2008;48:1–11.
- [30] Daza JM, Castoe TA, Parkinson CL. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* 2010;33:343–54.
- [31] Guevara-Chumacero LM, López-Wilchis R, Pedroche FF, Juste J, Ibáñez C, Barriga-Sosa I. Molecular phylogeography of *Pteronotus dayi* (Chiroptera: Mormoopidae) in Mexico. *Journal of Mammalogy* 2010;91:220–32.



3. 2. Artículo II

Morphological and molecular data reveal a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from *Dormitator maculatus* in the Gulf of Mexico

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Ana L. Sereno-Uribe, Martín García-Varela

Parasitology International (2014) 63: 763–771



Morphological and molecular data reveal a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from *Dormitator maculatus* in the Gulf of Mexico



Carlos Daniel Pinacho-Pinacho^a, Ana L. Sereno-Uribe^b, Martín García-Varela^{b,*}

^a Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-153, C.P. 04510 México D.F., México

^b Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-153, C.P. 04510 México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 December 2013

Received in revised form 5 July 2014

Accepted 12 July 2014

Available online 23 July 2014

Keywords:

Acanthocephala

Neoechinorhynchus (*Neoechinorhynchus*)

mexicoensis

Morphology

Molecular data

ITS

LSU

Gulf of Mexico

Dormitator maculatus

ABSTRACT

Neoechinorhynchus (*Neoechinorhynchus*) *mexicoensis* sp. n. is described from the intestine of *Dormitator maculatus* (Bloch 1792) collected in 5 coastal localities from the Gulf of Mexico. The new species is mainly distinguished from the other 33 described species of *Neoechinorhynchus* from the Americas associated with freshwater, marine and brackish fishes by having smaller middle and posterior hooks and possessing a small proboscis with three rows of six hooks each, apical hooks longer than other hooks and extending to the same level as the posterior hooks, 1 giant nucleus in the ventral body wall and females with eggs longer than other congeneric species. Sequences of the internal transcribed spacer (ITS) and the large subunit (LSU) of ribosomal DNA including the domain D2 + D3 were used independently to corroborate the morphological distinction among the new species and other congeneric species associated with freshwater and brackish water fish from Mexico. The genetic divergence estimated among congeneric species ranged from 7.34 to 44% for ITS and from 1.65 to 32.9% for LSU. Maximum likelihood and Bayesian inference analyses with each dataset showed that the 25 specimens analyzed from 5 localities of the coast of the Gulf of Mexico parasitizing *D. maculatus* represent an independent clade with strong bootstrap support and posterior probabilities. The morphological evidence, plus the monophyly in the phylogenetic analyses, indicates that the acanthocephalans collected from intestine of *D. maculatus* from the Gulf of Mexico represent a new species, herein named *N. (N.) mexicoensis* sp. n.

© 2014 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

The fat sleeper fish, *Dormitator maculatus* (Eleotridae) (Bloch 1792), is distributed in the Atlantic Ocean from North Carolina of the south-eastern United States to southeastern Brazil including the West Indies [1]. It represents an important local source of food for humans along the coast of the Gulf of Mexico [2]. The biology of the fat sleeper is well known; it lives in freshwater and brackish water, streams, rivers, springs, lagoons, swamps, and muddy ponds [1]. Its diet is mostly composed of zooplanktonic microcrustaceans and phytoplankton [2]. Species of *Neoechinorhynchus* Stiles and Hassall, 1905 are endoparasites of freshwater brackish water fish and freshwater turtles with approximately 116 described species classified into two subgenera: *Neoechinorhynchus* Hamann 1892 and *Hebesoma* Van Cleave 1928 distributed worldwide [3,4]. A total of 49 species have been described from the Americas, 33 from North America and 16 from Central and South America [5–9].

In Mexico, 8 species belonging to the subgenus *Neoechinorhynchus* have been described, 2 of these occur in freshwater turtles, i.e., *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *schmidti* Barger, Thatcher and Nickol, 2004 and *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *emyditoides* Fisher, 1960, and the other 6 species occur in marine, brackish and freshwater fishes: *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *roseum* Salgado-Maldonado, 1978; *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *golvani*, Salgado-Maldonado, 1978; *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano and Martínez-Ramírez, 2010; *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *brentnickoli* Monks, Pulido-Flores and Violante-González, 2011; *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León and García-Varela, 2012; and *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *panucensis* Salgado-Maldonado, 2013 [8–11].

During a helminthological survey, adult acanthocephalans were collected in the intestine of the fat sleeper fish *D. maculatus* in five localities from the Gulf of Mexico. These acanthocephalans represent an undescribed species of *Neoechinorhynchus*, which is herein described and compared with the other 33 species from the Americas associated with freshwater, marine and brackish fishes. Molecular data were generated from *Neoechinorhynchus* and compared with the other species previously recorded in Mexico.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 56229130; fax: +52 5 55500164.
E-mail address: garcia@servidor.unam.mx (M. García-Varela).

2. Materials and methods

2.1. Specimen collection

Adult acanthocephalans were collected from the intestines of their definitive hosts in 5 localities from the Gulf of Mexico (Table 1; Fig. 1). Fish were examined for parasites immediately after their capture. The acanthocephalans recovered were placed in distilled water to relax the specimens for 10–12 h at 4 °C. Specimens were subsequently preserved in 100% ethanol, and stored at 4 °C. For taxonomic identification, some specimens were stained with Mayer's paracarmine, dehydrated in a graded ethanol series, cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides in Canada balsam. These specimens were deposited in the Colección Nacional de Helminthos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City. The acanthocephalans collected in this study were assigned to the genus and subgenus *Neoechinorhynchus* and were compared with type-specimens of other congeners, deposited at the CNHE as follows: *N. (N.) chimalapasensis* holotype CNHE-5018, allotype CNHE-5019, 12 paratypes CNHE-5020; *N. (N.) golvani* CNHE-0603, holotype CNHE-601, paratypes CNHE-603, and CNHE-604, 606, 631, 632, 650, 652, 663, and 655; *N. (N.) roseum* holotype CNHE-633, paratype CNHE-634; *N. (N.) brentnickoli* holotype CNHE-7537, allotype CNHE-7538, paratypes CNHE-7539–7540; *N. (N.) mamesi* holotype CNHE: No. 8180, allotype CNHE: No. 8181, paratypes CNHE: Nos. 8182–8184 and *N. (N.) panucensis* holotype CNHE-8378, allotype CNHE-8379, and paratypes CNHE-8380–8381. Measurements of the trunk, proboscis hooks, proboscis receptacle, lemnisci, uterine bell, vagina, testes, and cement gland were taken from sexually mature specimens with the use of a light microscope. Measurements are given in micrometers (μm); for all morphological traits of the new species, ranges are given, followed in parentheses by mean values \pm standard deviation, and sample size (n). Measurements and drawings of eggs were made from mature eggs measured in situ through the body wall of female worms. Specimens were illustrated with the aid of a microscope drawing tube.

2.2. Amplification and sequencing of DNA

The acanthocephalans were digested overnight at 56 °C in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na₂ EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl, and 0.1 mg/ml proteinase K. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant using DNAzol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) according to the manufacturer's instructions. The ITS region was amplified using the forward primer BD1 5'-GTCGTAACAAGTTTCGTA-3' and the reverse primer BD2 5'-ATCTAGACCGGACTAGGCTGTG-3' [12]. The D2 + D3 domains of the large subunit (LSU) from ribosomal DNA (rDNA) were amplified using the forward primer 5' CAAGTACCGTGAGGAAAGTTGC-3' and the reverse primer 5' GTCGATAGGACTCCCTTG-3' [13]. PCR reactions (25 μl) consisted of 10 μM of each primer, 2.5 μl of 10X PCR Rxn buffer, 2 mM MgCl₂, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling parameters for rDNA amplifications included denaturation at 94 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, followed by a post-amplification incubation at 72 °C for 10 min. Sequencing reactions were performed using ABI Big Dye (Applied Biosystems, Boston, Massachusetts) terminator sequencing chemistry. The reactions were reading using an ABI 3730 capillary DNA sequencer. Forward and reverse sequences were assembled using Codoncode Aligner version 3.5.4 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts). Sequences were deposited in GenBank (Table 1).

2.3. Alignments and phylogenetic analyses

Sequences obtained in the current research from ITS and LSU rDNA were aligned separately with other congeneric species i.e., *N. (N.)*

mamesi, *N. (N.) brentnickoli*, *N. (N.) golvani*, *N. (N.) roseum*, *Neoechinorhynchus saginatus* Van Cleave and Bangham, 1949, *N. (N.) schmidtii*, and *N. (N.) emyditoides*, using the software Clustal W [14], with default parameter settings and adjusted manually with MacClade [15]. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses were performed. The best model of substitution for both datasets was selected with jModeltest version 0.1.1 [16]. The model GTR + G was selected for LSU and the TPM2uf + I + G was selected for ITS, with the Akaike information criterion. The ML tree was inferred using RAxML 7.0.4 [17]. Maximum likelihood clade support was assessed by bootstrap resampling with 10,000 replicates. Additionally, Bayesian analysis was performed with the program MRBAYES version 3.1.2 [18]. The settings were 2 simultaneous runs with 4 Markov chains and 10 million MCMC generations, sampling every 200 generations, a heating parameter value of 0.2 and a 'burn-in' of 10%. Trees were drawn using the FigTree program version 1.3.1 [19]. The species *Floridosentis mugilis* Machado Filho, 1951 and *Floridosentis pacifica* Bravo Hollis, 1969 were chosen as outgroups for the analyses.

3. Results

3.1. Morphological description

Class Eoacanthocephala Van Cleave, 1936.

Order Neoechinorhynchida Southwell and Macfie, 1925.

Family Neoechinorhynchidae (Ward, 1917) Van Cleave, 1928.

Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mexicoensis sp. n. (Fig. 2).

General: Neoechinorhynchidae, with characters of *Neoechinorhynchus*, subgenus *Neoechinorhynchus*. Trunk is cylindrical and swollen in the anterior region, and slender in the posterior region. Trunk wall is thin dorsally and ventrally with 5 dorsal giant subcuticular nuclei and 1 ventral nucleus (Fig. 2A–B). Proboscis is short and globular with three circles with six hooks each. Proboscis hooks in all circles are with roots. Apical, middle, and posterior hooks are of similar size. Apical hooks are longer than other hooks and extend to the same level than the posterior hooks (Fig. 2D). Sensory papillae are small and present slightly posterior to the proboscis-neck junction. Neck is wider than longer. Proboscis receptacle is attached to the base of the proboscis. Cerebral ganglion is large, oval, and placed at base of the receptacle. Both lemnisci are uninucleate and one is slightly longer than the other. Both lemnisci with nuclei ovoid extend beyond the proboscis receptacle (Fig. 2C).

Male: (based on 11 mature specimens with sperm). Body 750–1850 (1156 \pm 301, n = 11) long by 200–510 (320 \pm 87, n = 11) wide. Trunk 710–1800 (1105 \pm 298, n = 11) long by 200–510 (320 \pm 87, n = 11) wide. Proboscis 25–45 (35 \pm 5, n = 11) long by 42–100 (57 \pm 15, n = 11) wide. Proboscis hooks in the anterior circle, dorsal hooks 50–55 (53 \pm 1, n = 11) long by 7–9 (7 \pm 0.6, n = 11) wide at the base, root of dorsal hooks 16–20 (19 \pm 1, n = 11) long by 5–7 (6 \pm 0.9, n = 11) wide; lateral hooks 49–55 (52 \pm 2, n = 11) long by 7–8 (7 \pm 0.5, n = 11) wide at the base, root of lateral hooks 16–20 (19 \pm 1, n = 11) long by 5–7 (6 \pm 0.9, n = 11) wide; ventral hooks 50–55 (52 \pm 2, n = 11) long by 7 (7 \pm 0, n = 11) wide at the base, root of ventral hooks 16–20 (19 \pm 1, n = 11) long by 5–7 (6 \pm 0.9, n = 11) wide. Hooks of the middle circle 10–15 (12 \pm 1, n = 11) long by 3–4 (3 \pm 0.5, n = 11) wide; posterior circle 14–16 (12 \pm 3, n = 11) long by 4 (4 \pm 0, n = 11) wide. Neck 12–20 (15 \pm 2, n = 11) long by 40–55 (47 \pm 4, n = 11) wide. Proboscis receptacle 150–225 (188 \pm 21, n = 11) long by 37–62 (51 \pm 7, n = 11) wide. Longer lemniscus 212–387 (278 \pm 50, n = 11) long by 25–65 (39 \pm 11, n = 11) wide; shorter lemniscus 107–287 (222 \pm 51, n = 11) long by 25–60 (38 \pm 10, n = 11) wide. Reproductive system almost fully occupies the posterior 2/3 of body length, 420–1350 (823 \pm 257, n = 11) long. Testes are oval or circular, tandem, and overlapping the cement gland (Fig. 2A). Efferent ducts connect each testis with the seminal vesicle. Anterior testis 125–480 (223 \pm 101, n = 11) long by

Table 1

Specimen information, collection sites (CS), sample number, species analyzed, number of specimens analyzed (N), host species, locality name, geographical coordinates, GenBank accession number, and catalog number (CNHE) for specimens studied in this work. Sequences marked with an asterisk were obtained in the current study. Nd = not determined. The sample number for each locality corresponds with the same number in Fig. 1.

CS	Sample	Species	n	Host	Locality	Coordinates		GenBank		Specimens deposited (CNHE)
						North	West	LSU	ITSs	
1	4	<i>N. (N.) mamesi</i>	4	<i>Dormitator latifrons</i>	Rion Pijijiapan Lagoon, Chiapas/June, 2010	15° 31' 54.3"	93° 09' 39.4"	JN830763–JN830765	KC004185–KC004188*	8180, 8181, 8182
2	5–9	<i>N. (N.) mamesi</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	La Conquista Lagoon, Chiapas/June, 2010	15° 40' 00.20"	93° 24' 51.61"	JN830766–JN830769	KC004194–KC004198*	8184
3	10–14	<i>N. (N.) mamesi</i>	5	<i>Dormitator latifrons</i>	Joaquin Amaro Estuary, Chiapas/June, 2010	15° 46' 16.19"	93° 24' 30.11"	JN830770–JN830774	KC004189–KC004193*	8183
4	15–24	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>Dormitator latifrons</i>	Tres Palos Lagoon, Guerrero/September, 2008	16° 48' 00"	99° 47' 00"	FJ968156–FJ968159 FJ388991 KC004146–KC004150*	FJ968116 FJ968115 FJ388972 FJ968114 FJ968117 KC004180–KC004184*	8178
5	25	<i>N. (N.) roseum</i>	1	<i>Citharichthys gilberti</i>	Tovara Estuary, Nayarit/October, 2007	21° 31' 37"	105° 29' 14"	FJ389000	FJ388981	6763
6	26	<i>N. (N.) roseum</i>	1	<i>Achirus mazatlanus</i>	Caimanero Estuary, Sinaloa/June, 2007	25° 36' 30"	108° 26' 25"	FJ388999	FJ388980	6762
7	27–28	<i>N. (N.) emyditoides</i>	2	<i>Trachemys scripta</i>	Papaloapan River, Tlacotalpan, Veracruz/	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	HQ634783 HQ634784	KC004174* KC004175*	6695
8	29–39	<i>N. (N.) golvani</i>	11	<i>Paraneetroplus fenestratus</i>	Catemaco Lake, Veracruz/June, 2006	18° 25'	95° 07'	FJ388986 FJ968145 FJ968146 KC004138–KC004145*	FJ968112 FJ388967 FJ968113 KC004219–KC004224*	601, 603, 604, 606, 631, 632
9	40–41	<i>N. (N.) schmidti</i>	2	<i>Trachemys scripta</i>	Centla Swamp, Tabasco	18° 28' 18.9"	92° 39' 14.9"	HQ634786 HQ634785	KC004172* KC004173*	6764
10	42–47	<i>N. (N.) mexicanensis</i> sp. n.	6	<i>Dormitator maculatus</i>	Papaloapan River, Tlacotalpan, Veracruz/December, 2011	18° 36'	95° 39'	FJ388985 FJ968152–FJ968155 KC004171*	FJ388966 FJ968108 FJ968110 FJ968109 KC004199*	8331, 8332, 8333
11	48–52	<i>N. (N.) mexicanensis</i> sp. n.	5	<i>Dormitator maculatus</i>	Tamiahua Lagoon, Veracruz/December, 2011	18° 06.6' 24"	94° 27' 24.9"	KC004161–KC004165*	KC004209–KC004213*	8334
12	53–57	<i>N. (N.) mexicanensis</i> sp. n.	5	<i>Dormitator maculatus</i>	Sontecomapan Lagoon, Veracruz/December 2011	18° 30' 28"	95° 01' 58"	KC004151–KC004155*	KC004200–KC004204*	8335
13	58–62	<i>N. (N.) mexicanensis</i> sp. n.	5	<i>Dormitator maculatus</i>	Coatzacoalcos River, Veracruz/December, 2011	18° 06' 35"	94° 30' 03.9"	KC004166–KC004170*	KC004205–KC004208*	8336
14	63–67	<i>N. (N.) mexicanensis</i> sp. n.	5	<i>Dormitator maculatus</i>	Espino River, Tabasco/December, 2011	18° 14' 47"	92° 49' 57"	KC004156–KC004160*	KC004214–KC004218*	
15	68	<i>N. saginatus</i>	1	Nd	Nd	Nd	Nd	AY829091	FJ388984	

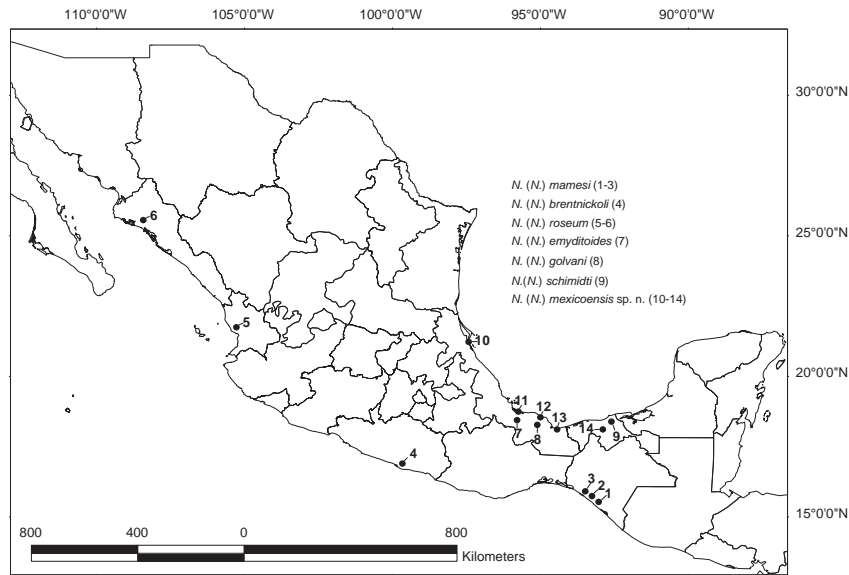


Fig. 1. Sampling sites of specimens of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mexicoensis* sp. n., and the other 6 congeneric species reported from Mexico. Collection sites are numbered according to Table 1.

65–300 (160 ± 69 , $n = 11$) wide. Posterior testis 125–300 (194 ± 55 , $n = 11$) long by 70–380 (189 ± 88 , $n = 11$) wide. Cement gland large 75–650 (279 ± 156 , $n = 11$) long by 82–750 (226 ± 190 , $n = 11$) wide. Single cement gland with 8 unfragmented nuclei. The reservoir of the cement gland is located behind the cement gland. Saefftingen's pouch 440–540 (510 ± 38 , $n = 11$) long by 58–120 (88 ± 18 , $n = 11$) wide, located immediately posterior to the cement gland. Seminal vesicle oval, possessing an ejaculatory duct, 37–187 (107 ± 38 , $n = 11$) long by 30–650 (107 ± 18 , $n = 11$) wide. Copulatory bursa opens terminally 60–120 (98 ± 30 , $n = 11$) long by 55–115 (80 ± 25 , $n = 11$) wide (Fig. 2A).

Female: (based on 11 gravid specimens). Body 1440–2550 (1652 ± 321 , $n = 11$) long by 380–740 (482 ± 99 , $n = 11$) wide. Trunk 1260–2482 (1541 ± 326 , $n = 11$) long by 380–740 (482 ± 99 , $n = 11$) wide. Proboscis 40–50 (43 ± 3 , $n = 11$) long by 45–65 (57 ± 5 , $n = 11$) wide. Proboscis hooks in the anterior circle, dorsal hooks 50–58 (54 ± 2 , $n = 11$) long by 7–10 (7 ± 0.9 , $n = 11$) wide at the base, root of dorsal hooks 20–22 (20 ± 0.6 , $n = 11$) long by 6–8 (7 ± 0.6 , $n = 11$) wide; lateral hooks 49–58 (53 ± 3 , $n = 11$) long by 8 (8 ± 0 , $n = 11$) wide at the base, root of lateral hooks 20–22 (20 ± 0.6 , $n = 11$) long by 6–8 (7 ± 0.6 , $n = 11$) wide; ventral hooks 49–58 (53 ± 3 , $n = 11$) long by 7–9 (8 ± 0.4 , $n = 11$) wide at the base, root of ventral hooks 20–22 (20 ± 0.6 , $n = 11$) long by 6–8 (7 ± 0.6 , $n = 11$) wide. Hooks of the middle circle 12–15 (13 ± 0.9 , $n = 11$) long by 4 (4 ± 0 , $n = 11$) wide; posterior circle 13–14 (13 ± 0.4 , $n = 11$) long by 4–5 (4 ± 0.3 , $n = 11$) wide. Neck 15–27 (20 ± 3 , $n = 11$) long by 40–70 (52 ± 6 , $n = 11$) wide. Proboscis receptacle 150–242 (214 ± 28 , $n = 11$) long by 50–62 (56 ± 4 , $n = 11$) wide. Longer lemniscus 300–425 (358 ± 39 , $n = 11$) long by 30–62 (47 ± 8 , $n = 11$) wide; shorter lemniscus 275–375 (326 ± 31 , $n = 11$) long by 30–60 (47 ± 8 , $n = 11$) wide. Total length of the reproductive system from the anterior margin of the uterine bell to the subterminal genital pore 225–450 (297 ± 65 , $n = 11$) long. Uterine bell 112–175 (158 ± 18 , $n = 11$) long by 42–90 (62 ± 12 , $n = 11$) wide. Uterine bell is narrow at anterior opening; vagina elongates, wide at the posterior end (Fig. 2E). Uterus 80–137 (101 ± 17 , $n = 11$) long by 20–37 (24 ± 5 , $n = 11$) wide. Vagina 15–25 (21 ± 3 , $n = 11$) long by 25–35 (27 ± 3 , $n = 11$) wide. Eggs are mature, and elliptical with no polar prolongation observed, 41–47 (44 ± 5.8 , $n = 11$) long by 10–15 (11 ± 1.64 , $n = 11$) wide (Fig. 2F).

3.1.1. Taxonomic summary

Type host: *D. maculatus* (Bloch, 1792) (Perciformes: Eleotridae).

Type locality: Papaloapan River, Tlacotalpan, Veracruz, Mexico ($18^{\circ}36'N$, $95^{\circ}39'W$).

Other localities: Tamiahua Lagoon, Veracruz ($18^{\circ}06.6'24''N$, $94^{\circ}27'24.9''W$), Sontecomapan Lagoon, Veracruz ($18^{\circ}30'28''N$, $95^{\circ}01'58''W$), Coatzacoalcos River, Veracruz ($18^{\circ}06'35''N$, $94^{\circ}30'03.9''W$), and Espino River, Tabasco, Mexico ($18^{\circ}14'47''N$, $92^{\circ}49'57''W$).

Site of infection: Intestine.

Infection parameters from type locality: Four out of 4 fishes (prevalence 100%). A total of 59 acanthocephalans were collected in the Papaloapan River, Tlacotalpan, Veracruz, Mexico.

Type-material: holotype CNHE: No. 8673; allotype CNHE: No. 8332; paratype CNHE: Nos. 8333–8336.

Etymology: The new species is named for Mexico, the country where the specimens were collected.

3.1.2. Remarks

To date, 33 species of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus)* have been described from the Americas associated with freshwater, marine and brackish fishes [5–9]. In North America 19 species have a long trunk up to 3000 μm , which is longer than *N. (N.) mexicoensis* sp. n., (male: 710–1800; female: 1260–2482). *N. (N.) mexicoensis* is distinguished from all other 19 North America species by having smaller middle and posterior hooks (middle hook: male: 10–15, female: 12–15; posterior hooks: male: 14–16, female: 13–14) (see Table 2). Another 14 species of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus)* have been described from freshwater, marine and brackish fishes in Central and South America: *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) buttnerae* Golvan, 1956; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) paraguayensis* Machado Filho, 1959; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) pterodoridis* Thatcher, 1981; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) pimelodi* Brasil-Sato and Pavanelli, 1998; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) curemai* Noronha, 1973; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) prochilodorum* Nickol and Thatcher, 1971; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) villoldoi* Vizcaino, 1992; *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) macronucleatus* Machado Filho, 1954; *N. (N.) roseum*; *N. (N.) chimalapasensis*; *N. (N.) brentnickoli*;

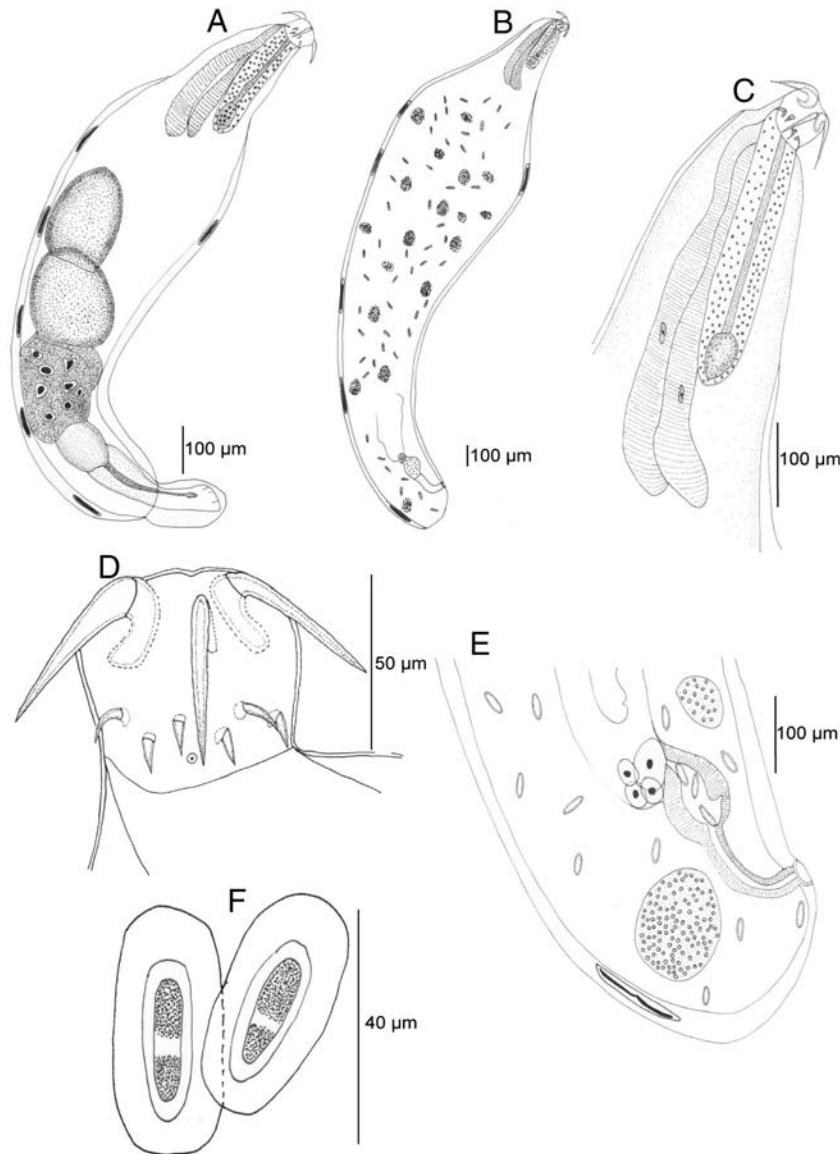


Fig. 2. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mexicoensis* sp. n., from *Dormitator maculatus*. (A) Male (holotype); (B) female (allotype); (C) anterior region of the male (holotype); (D) proboscis of the female (allotype); (E) posterior region of the female (allotype); (F) eggs (allotype).

N. (N.) mamesi; *N. (N.) golvani* and *N. (N.) panucensis*. *N. (N.) mexicoensis* sp. n. is distinguished from all other Central and South America species by having apical hooks that extend to the same level as the posterior hooks. Salgado-Maldonado [9] and Amin [5] provided keys to *Neoechinorhynchus* from Central and South America. Following these two keys, *N. (N.) mexicoensis* can be distinguished from *N. (N.) buttnerae*; *N. (N.) paraguayensis*; *N. (N.) pterodoridis* and *N. (N.) pimelodi* by having smaller anterior hooks; 49–55 (52) in males and 49–59 (53) in females in *N. (N.) mexicoensis* versus 100–135 in *N. (N.) buttnerae*; 82–94 (87) in males and 120–130 (125) in females in *N. (N.) paraguayensis*; 142–145 (143) in males and 130–148 (139) in females in *N. (N.) pterodoridis*; 100–112 (105) in males and 102–142 (129) in females in *N. (N.) pimelodi*. Also *N. (N.) mexicoensis* is distinguished from *N. (N.) curemai*; *N. (N.) prochilodorum* and *N. (N.) villoldoi* by having middle and posterior hooks considerably shorter; middle 10–15 (12) and posterior 14–16 (12) in males, and middle 12–15 (13) and posterior 13–14 (13) in females in *N. (N.) mexicoensis* versus 38–45 (41) and 30–38 (33) in *N. (N.) curemai*; middle 38–46 (41) and posterior 26–36 (30) in *N. (N.) prochilodorum*; middle 24–28 (26) and posterior 19–23 (21) in males, and middle 23–28 (25) and posterior 19–30 (21) in females in *N. (N.) villoldoi*. Of the other species mentioned

above, *N. (N.) mexicoensis* can be distinguished from *N. (N.) macronucleatus* by the number of giant nuclei in the body wall (5 dorsal and 1 ventral versus 5 and 0, respectively).

Of the fourteen *Neoechinorhynchus* species from Central and South America, six that are associated with freshwater, marine and brackish fishes have been described from Mexico. The new species *N. (N.) mexicoensis* can be readily distinguished from *N. (N.) roseum* and *N. (N.) chimalapasensis* by having longer anterior hooks, 49–55 (52) in males and 49–59 (53) in females in *N. (N.) mexicoensis* versus 36–41 in males and 41 in females in *N. (N.) roseum*; 33–35 (34.2) in males and 36–40 (38) in females in *N. (N.) chimalapasensis*. The new species can be easily distinguished from *N. (N.) brentnickoli*; *N. (N.) mamesi*; *N. (N.) golvani* and *N. (N.) panucensis* by having a small cylindrical proboscis, with apical hooks that are much larger than the other hooks and extend to the same level as the posterior hooks, 1 giant nucleus in the ventral body wall, and females with longer eggs than other species [5,9].

3.2. Base composition, genetic divergence and phylogenetic analyses

DNA fragments of the LSU and ITS were amplified and sequenced for individuals representing 8 species of the genus *Neoechinorhynchus*:

Table 2
Comparative measurements for 19 species of *Neoechinorhynchus* from North America. Sizes are given as average (minimum–maximum).

Apical hook	Middle hook	Posterior hook	Length–width of the trunk
<i>N. (N.) australis</i>			
Male (88–90)	(47–59)	(23–35)	(3400–6500) (380–420)
Female (88–90)	(47–59)	(23–35)	(3600–10,700) (340–670)
<i>N. (N.) carpodi</i>			
Male 68 (65–75)	48 (44–51)	28 (26–35)	26,440 (21,200–33,520) 777 (600–868)
Female 70 (67–71)	48 (44–53)	29 (25–36)	34,850 (25,500–48,100) 806 (660–906)
<i>N. (N.) crassus</i>			
Male (71–100)	(60–83)	(40–71)	(4000–7000)
Female (88–105)	(73–90)	(40–71)	(6000–9000)
<i>N. (N.) cristatus</i>			
Male 48 (45–51)	28 (26–33)	25 (23–26)	3000 (2550–3555) 350 (300–400)
Female 50 (45–59)	33 (29–38)	26 (24–32)	4750 (3850–8750) 430 (320–700)
<i>N. (N.) cylindratus</i>			
Male (79–97)	37	(21–25)	(4500–8500)
Female (79–97)	37	(21–25)	(10,000–15,000)
<i>N. (N.) distractus</i>			
Male 59	41	23–29	(5900–7300) (350–380)
Female 59	41	23–29	(8400–19,600) (380–670)
<i>N. (N.) limi</i>			
Male 33 (29–37)	20 (17–24)	16 (13–19)	(1060–2630)
Female 35 (30–39)	22 (19–27)	18 (16–20)	(1670–3800)
<i>N. (N.) notemigoni</i>			
Male 26 (24–28)	23 (18–31)	19 (15–23)	3429 (2830–3700) 494 (396–576)
Female 30 (26–39)	24 (20–29)	19 (17–24)	4917 (3300–6200) 555 (443–679)
<i>N. (N.) prolixoides</i>			
Male 55–58	31–36	34–45	(4000–9000)
Female 55–65	31–38	34–46	(6000–15,000)
<i>N. (N.) prolixus</i>			
Male (42–56)	28	28	(5000–11,000)
Female (42–56)	28	28	(7000–16,000)
<i>N. (N.) robertbaueri</i>			
Male 55 (51–61)	44 (42–48)	33 (29–23)	2950 (2400–4000) 445 (280–560)
Female 65 (61–67)	49 (45–54)	37 (35–42)	6600 (4480–8880) 690 (520–960)
<i>N. (N.) rutili</i>			
Male (45–82)	(26–44)	(19–34)	(2000–6000)
Female (52–84)	(29–46)	(22–34)	(5000–10,000)
<i>N. (N.) salmonis</i>			
Male (49–64)	(29–36)	(20–26)	5600 (4500–7800) 800 (600–1100)
Female (56–71)	(28–40)	(22–34)	8700 (5800–14,500)
<i>N. (N.) strigosus</i>			
Male Hooks slightly smaller than in females.	Hooks slightly smaller than in females	Hooks slightly smaller than in females	(3700–5500)
Female 58 (53–64)	41 (32–53)	(29–38)	(9000–14,100)
<i>N. (N.) tenellus</i>			
Male (90–110)	38	27	(2000–8000)
Female (90–110)	38	27	(3500–13,000) (0.6)
<i>N. (N.) tumidus</i>			
Male (69–84)	(67–79)	(40–53)	(3000–5000)
Female (75–84)	(67–79)	(45–53)	(4000–12,000)
<i>N. (N.) venustus</i>			
Male 48 (40–57)	50 (45–55)	34 (29–38)	5200 (2500–6400)
Female 51 (45–57)	51 (49–57)	38 (35–41)	9150 (7750–12,750) 690 (550–1000)
<i>N. saginatus</i>			
Male (58–67)	(31–38)	(27–32)	(8000) (700–1400)
Female (58–67)	(31–38)	(27–32)	(20,000) (1250–2100)
<i>N. (N.) buckneri</i>			
Male 38 (31–42)	33 (27–37)	25 (20–30)	7680 (5920–9730) 400 (320–500)
Female 42 (37–48)	34 (27–42)	25 (22–30)	16,350 (12,500–23,750) 590 (500–800)

N. (N.) mexicoensis sp. n., *N. (N.) mamesi*, *N. (N.) brentnickoli*, *N. (N.) golvani*, *N. (N.) roseum*, *N. saginatus*, *N. (N.) schmidti* and *N. (N.) emyditoides*. PCR products varied from 815 to 824 bp for LSU and from

700 to 749 bp for ITS. The interspecific genetic divergence of LSU estimated for *N. (N.) mexicoensis*, and the other congeneric species ranged from 1.65 to 32.9%; intraspecific divergence for *Neoechinorhynchus*

Table 3

Genetic divergence estimated among 8 clades (species) and intraclade, with the LSU gene (LSU; upper matrix) and ITS region (ITS; lower matrix). Uncorrected *P* distances are expressed as percentages.

ITS\LSU	<i>N. (N.) roseum</i>	<i>N. saginatus</i>	<i>N. (N.) schmidtii</i>	<i>N. (N.) emyditoides</i>	<i>N. (N.) golvani</i>	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	<i>N. (N.) mamesi</i>	<i>N. (N.) mexicoensis</i> sp. n.	Intraclade	
									LSU	ITS
<i>N. (N.) roseus</i>	–	28.49–28.67	29.04–29.41	29.77–29.96	29.41–29.77	31.06–31.46	28.67–28.86	28.67–30.51	0.1	1.65
<i>N. saginatus</i>	43.06–43.46	–	9.55	9.07–9.37	29.59–29.77	32.72–32.90	29.96	30.33–30.16	0	0
<i>N. (N.) schmidtii</i>	43.26	23.46	–	3.67	28.67–29.04	30.69–31.06	29.04–29.22	29.04–31.06	0.3	0
<i>N. (N.) emyditoides</i>	43.87–44.04	23.47–23.67	9.59–10.00	–	27.77–28.12	30.33–30.69	28.86	28.86–30.69	0.3	0.4
<i>N. (N.) golvani</i>	41.02–42.44	41.02–41.42	35.71–36.12	37.34–38.36	–	16.91–17.46	17.09–17.46	17.83–19.85	0–0.7	0.4–1.80
<i>N. (N.) brentnickoli</i>	40.40–41.02	38.77	38.57–38.77	37.55–37.95	29.59–30.81	–	7.72–7.90	8.08–9.74	0–0.1	0–0.20
<i>N. (N.) mamesi</i>	38.16–39.79	39.59–41.02	37.34–38.97	38.77–40.61	27.75–29.79	–	–	1.65–3.49	0	0–0.40
<i>N. (N.) mexicoensis</i> n. sp.	38.77–40.40	40.61–42.24	39.79–40.61	40.20–41.12	26.93–28.77	14.48–16.12	7.34–10.40	–	0–3.6	0–4.89

ranged from 0 to 3.6% (Table 3). The interspecific genetic divergence of ITS for *N. (N.) mexicoensis* and the other congeneric species ranged from 7.34 to 44% and intraspecific divergence for *Neoechinorhynchus* ranged from 0 to 4.89%.

The LSU dataset included 70 taxa, with 755 aligned characters. Maximum likelihood (ML) analysis yielded a tree with a $-\ln$ likelihood = 4668.033. This tree is identical to the Bayesian inference (BI) consensus tree. Both trees show 8 major clades corresponding to 8 species *N. (N.)*

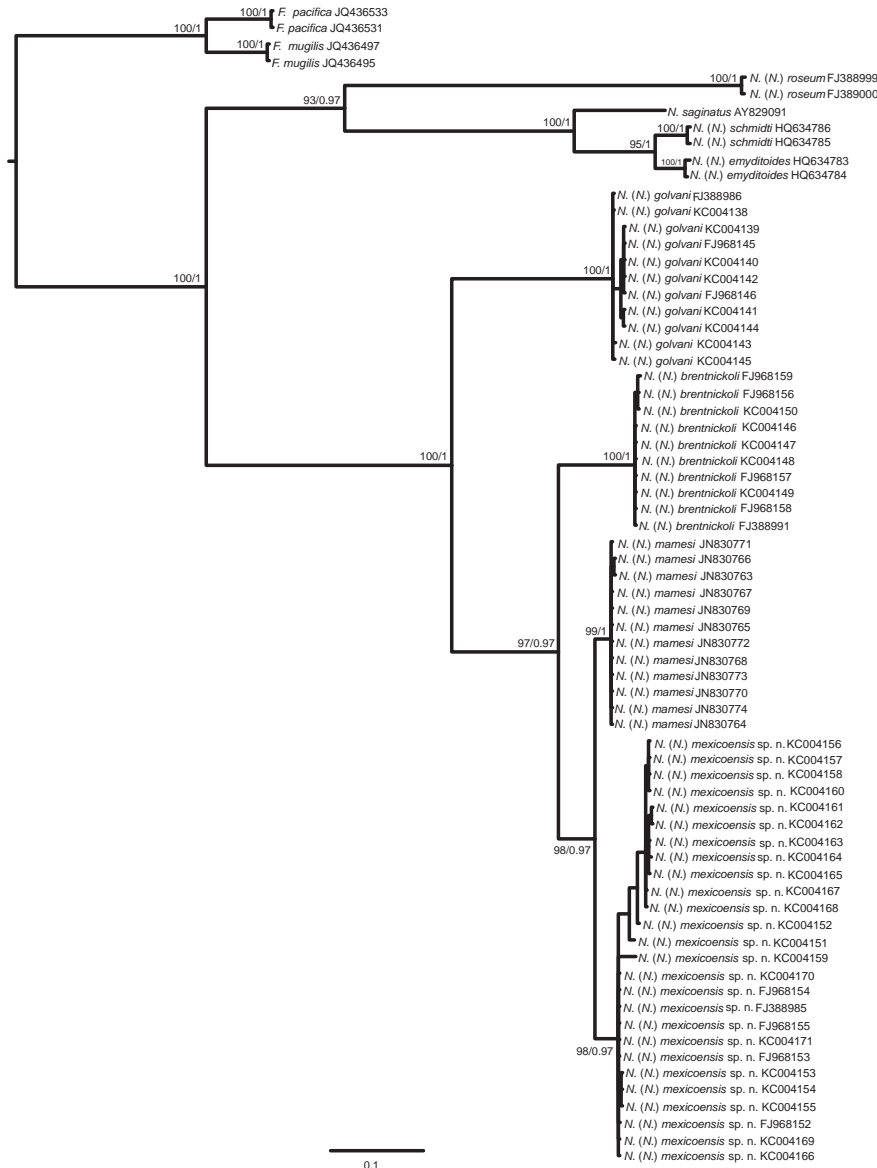


Fig. 3. Maximum likelihood tree and consensus Bayesian inference trees inferred with LSU dataset. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies and posterior probabilities (BI).

Atlantic Ocean, whereas 2 other species of *Neoechinorhynchus* are associated with *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844) from the Pacific Ocean; *N. (N.) brentnickoli* is distributed from the North Pacific Ocean slopes to the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico, whereas *N. (N.) mamesi* is distributed from south of the Isthmus of Tehuantepec to the Chiapas coast of Mexico [8]. The divergence time of *D. maculatus* and *D. latifrons* was estimated between 5.6 and 7.9 mya [20]. The tectonic evolution of the Gulf of Mexico, Caribbean and northern South America in the last 200 my is very complex [21], and the complete closure of the Isthmus of Panama, which occurred at approximately 3.5–3.1 mya [22], could have played a major role in the diversification of the definitive hosts (*D. maculatus* and *D. latifrons*) and their parasites. Based on this evidence the probability of finding new species of *Neoechinorhynchus* associated with fish in the genus *Dormitator* in Central and South America is probable. To test this hypothesis, future studies should be performed using mitochondrial and nuclear genes of specimens from these biogeographical regions.

5. Conclusions

The morphological data, in combination with the high genetic divergence estimated for each molecular marker (LSU and ITS) and the reciprocal monophyly of the 25 specimens collected in 5 localities from the Gulf of Mexico, in the phylogenetic trees clearly demonstrate that the specimens associated with fat sleeper fish represent a new taxon, which is named *N. (N.) mexicoensis*.

Acknowledgments

We are grateful to Luis García Prieto for providing specimens of *Neoechinorhynchus* from the CNHE, Laura Marquez for her help with the use of the DNA sequencer, and David Ivan Guadalupe Hernández Mena for his support during field work. This research was supported by grants from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. IN207213) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 179048). CDPP thanks CONACyT for the scholarship and the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] Miller RR, Minckley WL, Norris SM. Freshwater fishes of Mexico. Chicago, Illinois: The University of Chicago Press; 2005 [559 pp].
- [2] Franco LJ, Chávez R, Peláez E, Bedía C. Riqueza ictiofaunística del sistema lagunar de Alvarado, Veracruz. Rev Zool 1996;2:17–32.

- [3] Amin OM. Classification of the Acanthocephala. Folia Parasitol 2013;60:273–305.
- [4] Smales LR. A review of the genus *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Australia with the description of two new species. J Parasitol 2013;99:1106–12.
- [5] Amin OM. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles and Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. Syst Parasitol 2002;53:1–18.
- [6] Barger MA, Thatcher EV, Nickol BB. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. Comp Parasitol 2004;71:1–3.
- [7] Amin OM, Heckmann R. Description of *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buckneri* n. sp. from the blacktailed redhorse *Moxostoma poecilurum* (Catostomidae) in the Tchoutacabouffa River, Mississippi, with a key to species of *Neoechinorhynchus* with different dorsoventral body wall thickness. Comp Parasitol 2009;76:154–61.
- [8] Pinacho-Pinacho CD, Pérez-Ponce De León G, García-Varela M. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. Parasitol Int 2012;61:634–44.
- [9] Salgado-Maldonado G. Redescription of *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) and description of a new species from freshwater cichlids (Teleostei: Cichlidae) in Mexico. Parasitol Res 2013;112:1891–901.
- [10] García-Prieto L, García-Varela M, Mendoza-Garfias B, Pérez-Ponce De León G. Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. Zootaxa 2010; 2419:1–50.
- [11] Monks S, Pulido-Flores G, Violante-González J. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Dormitator latifrons* (Perciformes: Eleotridae) from the Pacific Coast of Mexico. Comp Parasitol 2011;78:21–8.
- [12] Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the human schistosomes. Mol Phylogenet Evol 1995;4:103–9.
- [13] García-Varela M, Nadler SA. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. J Parasitol 2005;91:1401–9.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997;25:4876–82.
- [15] Maddison DR, Maddison WP. MacClade version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.
- [16] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 2008; 25:1253–6.
- [17] Stamatakis A. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 2006;22:2688–90.
- [18] Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 2001;17:754–5.
- [19] Rambaut A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh; 2006.
- [20] Thacker CE, Hardman MA. Molecular phylogeny of basal gobioid fishes: Rhyacichthyidae, Odontobutidae, Xenisthmidae, Eleotridae (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). Mol Phylogenet Evol 2005;37:858–71.
- [21] James KH, Lorente MA, Pindell JL. The origin and evolution of the Caribbean Plate. The Geological Society London, special publication; 2009 [328 pp.].
- [22] Coates AG, Obando JA. The geologic evolution of the Central American Isthmus. In: Jackson JBC, Budd AF, Coates AG, editors. Evolution and environment in tropical America. Chicago, Illinois: The University of Chicago Press; 1996. p. 21–56.



Magnolia
Press

3. 3. Artículo III

Checklist of the species of *Neoechinorhynchus*
(Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in fishes and turtles in
Middle-America, and their delimitation based on sequences of
the 28S rDNA

**Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Ana L. Sereno-Uribe, Gerardo Pérez-
Ponce de León, Martín García-Varela** Zootaxa (2015) 3985: 098–116



<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3985.1.5>

<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:E6FF2FAB-4C99-4E4A-8E56-8D9B5A161474>

Checklist of the species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in fishes and turtles in Middle-America, and their delimitation based on sequences of the 28S rDNA

CARLOS DANIEL PINACHO-PINACHO¹, ANA L. SERENO-URIBE²,
GERARDO PÉREZ-PONCE DE LEÓN² & MARTÍN GARCÍA-VARELA^{2,3}

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-153, C. P. 04510, México D. F., México

²Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-153, C.P. 04510. México. D.F. México

³Corresponding author. E-mail: garciav@ib.unam.mx

Abstract

Among the acanthocephalans, *Neoechinorhynchus* is one of the most speciose genera, with 116 described species distributed worldwide. The adults of *Neoechinorhynchus* are found in the intestine of freshwater and brackish water fish, as well as in freshwater turtles. In this study, a checklist of the congeneric species of *Neoechinorhynchus* occurring in Middle-American fish and turtles is presented. The checklist contains the records established in all published accounts, as well as novel data from survey work conducted in the region comprising Neotropical areas of Mexico, as well as some localities in Central America. The species delimitation criteria used to discriminate among species is based on molecular data. In the last years, a large database derived from sequences of the D2 + D3 domains of the large subunit of rDNA (28S) was generated for 262 specimens corresponding to nine species of *Neoechinorhynchus*. This molecular marker has shown to be useful in establishing species limits within *Neoechinorhynchus* and in resolving phylogenetic relationships at species level. Based on our results, the domains D2 + D3 of the 28S rDNA could be considered as potential DNA barcodes to complement mitochondrial DNA to discriminate among acanthocephalan species.

Key words: Acanthocephala, *Neoechinorhynchus*, 28S rDNA, species delimitation, Middle-America

Introduction

Middle-America is one of the most complex biogeographical areas in the world (Contreras-Balderas & Lozano-Vilano 1996; Morrone 2002; Zaldivar-Riveron *et al.* 2004; Huidobro *et al.* 2006). This complexity reflects the confluence of Neotropical and Nearctic biotas with a long history of geological activity (Iturralde-Vinent & MacPhee 1999; Guzman-Speziale *et al.* 2005); such activity created barriers and land-bridges that have affected the distribution of freshwater fishes (Bermingham & Martin 1998; Martin & Bermingham 1998; Mateos 2005). Also, it has been postulated that during the Pliocene (~3.3 Mya) took place the closure of the Panama Isthmus, resulting in faunal exchange between the Nearctic and Neotropical biogeographical regions and in a barrier that separated the Pacific Ocean and Atlantic Ocean (Bussing 1985).

Species of *Neoechinorhynchus* Hamann 1892 are endoparasites of freshwater and brackish water fish, and freshwater turtles, with approximately 116 described species divided into two subgenera: *Neoechinorhynchus* and *Hebesoma* Van Cleave 1928, both distributed worldwide (Amin 2013; Smales 2013). A total of 49 species have been described from the Americas, 33 from North America and 16 from Central and South America (Amin 2002; Barger *et al.* 2004; Amin & Heckmann 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012, 2014). Some morphological traits such as the proboscis shape, number and size of hooks, proboscis receptacle shape and in the shape of anterior region of the trunk, have been traditionally used to diagnose and delimit congeneric species. However, the identification of various species of the genus *Neoechinorhynchus* is rather difficult due to the morphological variability exhibited by some of these traits, resulting in a problematic species differentiation.

Recently, the advantage of using molecular tools to establish a more robust species delimitation has been demonstrated, as well as to recognize the existence of cryptic species (Nolan & Cribb 2005; Pérez-Ponce de León & Nadler 2010; Nadler & Pérez-Ponce de León 2011). Ribosomal genes and their related spacer are among the most useful molecular markers for phylogenetic analyses in acanthocephalans (Steinauer *et al.* 2007; Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011; Rosas-Valdez *et al.* 2012; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012; Malyarchuk *et al.* 2014; García-Varela & Pérez-Ponce de León 2015). The large subunit from ribosomal DNA (LSU), which is a mosaic of several variable and conservative fragments, is often regarded as a phylogenetic marker. Particularly the domains (D2 + D3) from LSU have been widely used for delimitation of species within acanthocephalans with well results (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Garcia-Varela *et al.* 2011; Rosas-Valdez *et al.* 2012; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012).

If recent studies are any indication, it is likely that only a part of the actual Middle-American diversity of species of *Neoechinorhynchus* has been described. In the current study, nine species of *Neoechinorhynchus* are included: two of these occur in freshwater turtles, *N. (N.) schmidti* Barger, Thatcher & Nickol, 2004 and *N. (N.) emyditoides* Fisher, 1960), and the other seven species occur in marine, brackish and freshwater fishes, *N. (N.) roseum* Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) golvani*, Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano & Martínez-Ramírez, 2010; *N. (N.) bretnickoli* Monks, Pulido-Flores & Violante-González, 2011; *N. (N.) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León & García-Varela, 2012; *N. (N.) panucensis* Salgado-Maldonado 2013, and *N. (N.) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe & García-Varela 2014 (Aguirre-Macedo *et al.* 2001; García-Prieto *et al.* 2010; Monks *et al.* 2011; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012; Salgado-Maldonado 2013; Pinacho-Pinacho *et al.* 2014).

In this study, a checklist of species of the genus *Neoechinorhynchus* occurring in brackish and freshwater fishes, and freshwater turtles in Middle-America is presented. The delimitation among species included in this checklist was validated through an analysis of the DNA sequences of the 28S rDNA gene, and the potential use of this molecular marker as a DNA barcode is briefly discussed.

Material and methods

Parasite-host list. The species list we present herein consist of all the published records of *Neoechinorhynchus* made up to November 2014. Information was obtained from two main sources: 1) a retrospective bibliographic search in databases such as CAB abstracts, Biological Abstract, Zoological Record, Helminthological Abstract, and ISI Web of Knowledge. This search guarantee we retrieved all possible published accounts; and 2) a search of the database of the Colección Nacional de Helminthos CNHE, Instituto de Biología, UNAM, Mexico City, Mexico) which also contain the records of congeneric species deposited in foreign parasite collections such as the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology HWML, University of Nebraska-Lincoln, and the National Museum of Natural History (NMNH) at the Department of Invertebrate Zoology Collections, Smithsonian Institution, Washington, D.C. (formerly, United States National Parasite Collection, USNPC), both in the U.S.A., and those deposited in the British Museum on Natural History (BMNH), London, U.K. In addition, we provide information of the specimens of *Neoechinorhynchus* of fishes and freshwater turtles from several localities of Mexico, Guatemala, Honduras and Costa Rica that were collected in the last two years as a result of our ongoing research programs describing parasite biodiversity. The checklist is presented in alphabetical order, by species of *Neoechinorhynchus*. Each species is followed by the authority name and publication year in bold. Since most records correspond to localities within Mexican territory, information of each record is organized alphabetically by state of the Mexican Republic (in capital letters), and each record includes the locality name, geographical coordinates for each locality, the host (s) species, followed by the bibliographic reference. For localities of Central American countries, each locality is presented within a section containing the name of the country, followed by the particular locality name, their geographical coordinates, host (s) species, and bibliographic reference. When we present original records derived from our survey work, instead of reference we include the term "this study", in bold. At the end of each acanthocephalan species record, the accession numbers of the specimens to parasite collections is presented following the acronym.

Sample collection. Fishes were captured with seine nets and electrofishing whereas freshwater turtles were captures with seine nets. Hosts were maintained alive and transported to laboratory, and studied for helminths a few

hours after their capture; individual hosts were killed by pithing and the intestine was examined for parasites under a dissecting microscope. The worms relax in distilled water for 10–12 h at 4°C. Later, all the specimens were preserved in 100% ethanol, and stored at 4°C. For taxonomic identification, some specimens were stained with Mayers paracarmine, dehydrated in a graded ethanol series, cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides with Canada balsam, and were deposited in the Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Each species was identified following the keys of Amin (2002) and Salgado-Maldonado (2013) and using the original descriptions to each species (see Pinacho-Pinacho *et al.* 2012, 2014).

Specimens of nine species of *Neoechinorhynchus* were collected from the intestines of their definitive hosts in 46 localities across of Mexico, one locality in Guatemala, and four localities in Costa Rica (Fig. 1; Table 1). In some cases, we collected new samples from the type localities, since original descriptions of some acanthocephalans (e.g., Salgado-Maldonado *et al.* 2010; Salgado-Maldonado 2013), did not include other sources of information other than morphology based on light microscopy. However, in the current study a combination of morphological data plus DNA sequences, were generated and it is a common practice in the modern taxonomic studies of this group of parasites.

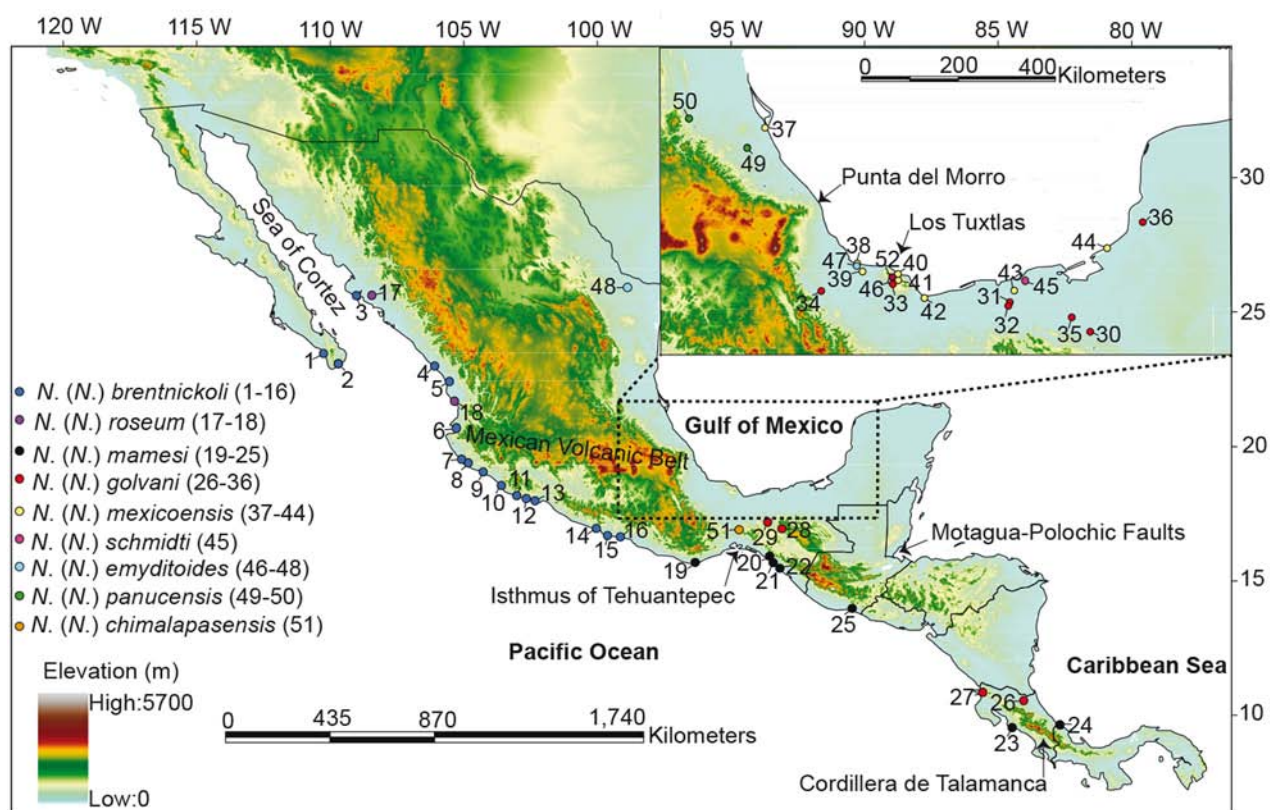


FIGURE 1. Map showing the localities of *Neoechinorhynchus* spp. Numbers of localities correspond with the numbers presented in Table 1. DNA from specimens from localities 1-51 (CS in Table 1) was analyzed for this study.

DNA extraction, amplification and sequencing. Adult acanthocephalans were digested overnight at 56°C in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH=7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na₂EDTA (pH=8.0), 1% Sarkosyl and 0.1 mg/ml proteinase K. Following digestion, we extracted DNA from the supernatant using the DNAzol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. The 5' end the 28S rDNA gene containing the domains D2 + D3 were amplified using forward primer 502 (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3') with the reverse primer 536 (5'-GTCGATAGGACTCCCTTTG-3') (García-Varela & Nadler 2005). PCR reactions (25 µl) consisted of 10 µM of each primers, 2.5 µl of 10x buffer, 2 mM MgCl₂ and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR amplification consisted of an initial denaturation step at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a post-amplification

incubation at 72°C for 10 min. Sequencing reactions were performed using ABI Big Dye (Applied Biosystems, Boston, MA) terminator sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using ABI 3730 capillary DNA sequencer. Sequences were edited using CodonCode Aligner Version 3.5.4 (CodonCode corporation, Dedham, MA). GenBank accession numbers for all sequences are given in Table 1.

Alignment, phylogenetic analysis and genetic divergence. Sequences obtained in the current research from 28S rDNA were aligned with ClustalW (Thompson *et al.* 1994) using default parameters. Alignment length was 806 base pairs (bp). The best model was identified with the Akaike Information Criterion (AIC) implemented with the jModelTest v0.1.1 program (Posada 2008). We constructed phylogenetic trees using both maximum likelihood (ML) and Bayesian analyses. For ML analyses, the program MEGA version 5 (Tamura *et al.* 2011) was used. A GTR+G+I substitution model was used for ML analyses, and 1000 bootstrap replicates were run to assess nodal support. We estimated gene trees using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), with two runs and four chains (one cold, three heated) per run. The Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MC³) were run for 5 million generations, sampled every 1000 generations, and the first 1, 250 samples were discarded as burn-in (25%). The outputs of MrBayes were examined with Tracer v1.4 (Rambaut & Drummond 2007) to check for convergence of different parameters, determine the approximate number of generation at which log likelihood values stabilized, identify the effective sample size (EES) for each parameter, and the estimated magnitude of model parameters in individual and combined runs. Topological convergence in the two independent MCMC runs was checked with the compare plot in AWTY (Wilgenbusch *et al.* 2004). The initial 25% of MCMC was verified to include all the generations before stationary was archived. Posterior probabilities (PP) of clade were obtained from the 50% majority rule consensus of sample trees after excluding the initial 25% as burn-in. Sequences of *Floridosentis pacifica* (JQ36533, JQ436531) and *F. mugilis* (JQ436497, JQ436495) were used as the outgroup for all phylogenetic analyses. The intra and interspecific genetic variation of *Neoechinorhynchus* was determined using the Kimura 2-parameter distance (K2P) with the program MEGA version 5 (Tamura *et al.* 2011), with analytical method and with a nucleotide substitution (transitions+transversions) and uniform rate.

Results

Parasite-host list. The Checklist contains information for nine species of *Neoechinorhynchus*, which were found in 55 species of fish, and one species of freshwater turtles. The records were made in 87 localities comprising five countries, including Mexico, Guatemala, Nicaragua, Honduras, and Costa Rica. Particularly in Mexico, the list contains records pertaining to 17 of the 32 states of the Mexican Republic.

Acronyms

CNHE	Colección Nacional de Helminfos, Instituto de Biología, UNAM, Mexico City, Mexico.
HWML	Harold W. Manter Laboratory of Parasitology, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska United States.
USNPC	United States National Parasite Collection, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, United States.

Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) brentnickoli Monks, Pulido-Flores & Violante-González, 2011 (Fig. 2a)

Mexico: BAJA CALIFORNIA SUR: Oasis San José del Cabo (23°3'32"N 109°41'28.8"W; 23°3'30.8"N 109°41'28.1"W); *Dormitator latifrons*, *Eleotris picta* (Méndez *et al.* 2010). Todos los Santos (23°26'14.3"N 110°14'22.7"W); *Dormitator latifrons* (**this study**). COLIMA: Laguna de Cuyutlán (19°2'58.6"N 104°15'58.2"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). GUERRERO: Laguna de Tres Palos (16°41'0"N 99°37'00"W; 16°48'0"N 99°47'0"W; 16°47'47"N 99°44'30"W; 16°47'00"N 99°39'00"W); *Dormitator latifrons* (Garrido-Olvera *et al.* 2004; Violante-González *et al.* 2007; Martínez-Aquino *et al.* 2009; Monks *et al.* 2011; García-Varela *et al.* 2011; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012); *Centropomus nigrescens*, *Centropomus*

robalito, *Diapterus peruvianus*, *Cichlasoma trimaculatum*, *Gobiomorus maculatus*, *Eleotris picta*, *Ctenogobius sagittula* and *Lutjanus argentiventris* (Violante-González *et al.* 2007). Laguna de Coyuca (16°57'0"N 100°2'0"W); *Dormitator latifrons* (Violante-González & Aguirre-Macedo 2007; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012); *Centropomus nigrescens*, *Cichlasoma trimaculatum*, *Eleotris picta*, *Gobiomorus maculatus* and *Lutjanus argentiventris* (Violante-González & Aguirre-Macedo 2007). Río Tamarindo, Chautengo (16°38'7.5"N 99°8'26.4"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). **JALISCO**: Río Cuitzmala (19°23'27"N 104°58'28"W); *Dormitator latifrons* (Martínez-Aquino *et al.* 2009); *Agonostomus monticola* (Mayén-Peña 2003). Estero Chamela (19°31'20"N 104°4'53"W; 19°31'0"N 105°6'0"W); *Dormitator latifrons* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Monks *et al.* 2011). Marismas de Chalacatepec; *Dormitator latifrons* (Mayén-Peña 2003). Río San Nicolás; *Dormitator latifrons* (Mayén-Peña 2003). **MICHOACAN**: Estero Barra de Pichi (17°58'41.5"N 102°19'30"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Estero Mexcalhuacan (18°3'21.5"N 102°39'29.8"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Estero Huahua (18°10'39.7"N 103°0'26.3"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Estero Boca de Apiza (18°41'14.46"N 103°44'4.96"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). **NAYARIT**: Nuevo Vallarta (20°40'54.8"N 105°16'46.1"W); *Dormitator latifrons* (**this study**). **SINALOA**: El Huizache (23°6'47.2"N 106°13'45"W); *Dormitator latifrons* (**this study**). Vía Ferrea, Escuinapa (22°49'50.1"N 104°48'19.4"W); *Dormitator latifrons* (**this study**). Mazatlán (23°13'0"N 106°25'0"W); *Dormitator latifrons* (Monks *et al.* 2011). Topolobampo (25°36'10"N 109°1'13"W); *Dormitator latifrons* (**this study**).

Specimens deposited. CNHE (8586, 8178, 8175, 8179, 8589, 8174, 8173, 8177, 8176, 8587, 8588, 7540, 7537, 7188, 7142, 7141, 6819, 6817, 6816, 6766, 6121, 6120, 6119, 6118, 6077, 6073, 5989, 4920, 4347).

Notes. This species was originally recognized as a cryptic species of *N. (N.) golvani* by Martínez-Aquino *et al.* (2009) as a parasite of eleotrid fishes in coastal waters of the Mexican Pacific Ocean, and later described on morphological grounds by Monks *et al.* (2011).

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano & Martínez-Ramírez, 2010**

(Fig. 2b)

Mexico: **OAXACA**: Río Negro, Santa María Chimalapas (16°53'54.7"N 94°41'37.3"W); *Awaous banana* (Salgado-Maldonado *et al.* 2010) and (**this study**). Río Grande, Vistahermosa (16°47'29.76"N 95°01'01.17"W); *Awaous banana* (**this study**).

Specimens deposited. CNHE (5018, 5019, 5020)

Notes. This species was originally described solely based on morphology by Salgado-Maldonado *et al.* (2010), and not DNA sequences were generated.

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) emyditoides* Fisher, 1960**

(Fig. 2c)

Mexico: **NUEVO LEÓN**: Presa la Herradura (25°54'15"N 98°52'6"W); *Trachemys scripta* (García-Varela *et al.* 2011). **VERACRUZ**: Lago de Catemaco (18°25'0"N 95°7'0"W); *Trachemys scripta* (García-Varela *et al.* 2011). Laguna de Alvarado; (18°45'0"N 95°45'0"W) *Trachemys scripta* (Barger 2004). Río Papaloapan, Tlacotalpan (18°42'13.4"N 95°45'27.9"W); *Trachemys scripta* (García-Varela *et al.* 2011).

Specimens deposited. CNHE (6695-6696, 6737), HWML (45557), HWML (45560), HWML (45557), HWML (45558), USNPC (832354).

Notes. This species was described from *Trachemys scripta* in Arkansas and Mississippi USA by Fisher (1960). Later this species was recorded in several localities of North America (Barger 2004). In Mexico the first record of *N. (N.) emyditoides* was made by Bravo-Hollis in 1946, however it was described as *N. (N.) emydis*. Later Barger (2004), Barger *et al.* (2004), mentioned that *N. (N.) emydis* is restricted the eastern half of the upper Mississippi river.



FIGURE 2. Males of species of *Neoechinorhynchus* known from Middle-America. **a)** *N. (N.) brentnickoli* Monks, Pulido-Flores & Violante-González, 2011. **b)** *N. (N.) chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano & Martínez-Ramírez, 2010. **c)** *N. (N.) emyditoides* Fisher, 1960. **d)** *N. (N.) golvani* Salgado-Maldonado, 1978. **e)** *N. (N.) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León & García-Varela 2012. **f)** *N. (N.) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe & García-Varela, 2014. **g)** *N. (N.) panucensis* Salgado-Maldonado, 2013. **h)** *N. (N.) roseum* Salgado-Maldonado, 1978. **i)** *N. (N.) schmidti* Barger, Thatcher & Nickol, 2004. Scale bars = 1.0 mm

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) golvani* Salgado-Maldonado, 1978**

(Fig. 2d)

Mexico: CAMPECHE: Hool (19°30'51.82"N 90°26'55.13"W); *Thorichthys meeki* (**this study**). Lago el Centenario (18°37'50"N 91°56'21"W); *Amphilophus robertsoni*, *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Parachromis managuensis* and *Petenia splendida* (Salgado-Maldonado *et al.* 1997); *Herichthys pearsei* and *Vieja synspila* (Vidal-Martínez 1995). Laguna El Vapor (18°18'38"N 91°50'9"W); *Cichlasoma geddesi*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Herichthys pearsei*, *Parachromis managuensis* and *Petenia splendida* (Pineda-López 1994; Salgado-Maldonado *et al.* 1997); *Cichlasoma urophthalmum* (Vidal-Martínez 1995; Salgado-Maldonado & Kennedy 1997); *Petenia splendida* (Vidal-Martínez 1995). Laguna de Términos, Río Palizada

(18°17'16"N 91°56'52"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado & Kennedy 1997; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Laguna de Términos, el Cayo (18°30'10"N 91°41'20"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado & Kennedy 1997; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Laguna de Términos, Santa Gertrudis (18°26'51"N 91°49'38"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Lago Atasta (18°37'8"N 92°6'15"W); *Cichlasoma urophthalmum* and *Paraneetroplus synspilus* (Vidal-Martínez 1995; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Río Champotón (19°21'0"N 90°40'0"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado *et al.* 1997); *Thorichthys helleri* (Salgado-Maldonado 2013). Laguna de Términos, Llanuras (18°19'13"N 91°44'36"W); *Paraneetroplus synspilus* (Vidal-Martínez & Kennedy 2000). Silvituc (18°37'0"N 91°56'0"W); *Amphilophus robertsoni*, *Paraneetroplus synspilus* and *Paraneetroplus bifasciatus* (Salgado-Maldonado 2013). CHIAPAS: Presa Chicoasen (16°56'2"N 93°5'16"W); *Vieja pearsei* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Presa Nezahualcoyolt (17°10'49"N 93°36'49"W); *Vieja pearsei* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Río Lacantún, el Remolino (16°14'46"N 90°50'8"W); *Cichlasoma urophthalmum* and *Thorichthys helleri* (Salgado-Maldonado *et al.* 2011). Río San Pedro, Tzendales (16°17'54"N 90°53'13"W); *Petenia splendida* (Salgado-Maldonado *et al.* 2011). Río la Urbina (15°46'27"N 93°15'21"W); *Gobiomorus maculatus* (Salgado-Maldonado *et al.* 2011). GUERRERO: Presa Tepecoacuilco (18°18'1"N 99°28'16"W); *Cichlasoma istlanum* (Salgado-Maldonado *et al.* 2001a; Salgado-Maldonado 2013); *Amphilophus macracanthus* (Salgado-Maldonado 2013). HIDALGO: Río Tempoal, Atlapexco (20°55'16"N 98°17'27"W); *Amatitlania nigrofasciata*, *Herichthys cyanoguttatus* and *Herichthys labridens* (Salgado-Maldonado *et al.* 2004); *Herichthys labridens* (Salgado-Maldonado 2013). NAYARIT: Río Santiago, Presa Aguamilpa (21°46'42"N 104°55'36"W); *Cichlasoma beani* (Salgado-Maldonado *et al.* 2001b; Salgado-Maldonado 2013). OAXACA: Temascal (18°14'13"N 96°25'0.27"W); *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma salvini* (**this study**); *Petenia splendida* (Morales-Sosa 2008; Salgado-Maldonado 2013). San Juan Evangelista; *Rocio octofasciata*, *Thorichthys ellioti* (Salgado-Maldonado 2013). TABASCO: Río Carrizal (18°1'45"N 92°55'0"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012; García-Varela *et al.* 2011). Lago Canitzan, Tenosique (17°28'57"N 91°25'27"W); *Parachromis friedrichstalii* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Laguna las Ilusiones (17°59'46"N 92°56'17"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Pérez-Ponce de León *et al.* 1996; Martínez-Aquino *et al.* 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012); *Cichlasoma salvini* (Vidal-Martínez *et al.* 2001); *Thorichthys helleri*, *Thorichthys pasionis* and *Paraneetroplus synspilus* (Ramírez-Jiménez 1993; García-Magaña 1990; Pineda-López 1994; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Lago el Rosario (17°50'0"N 93°45'0"W); *Ariopsis felis*, *Cathorops melanopus*, *Paraneetroplus synspilus* and *Hyporhamphus mexicanus* (Fucugauchi-Suárez del Real *et al.* 1988); *Strongylura* sp. (Fucugauchi-Suárez del Real *et al.* 1988; Vidal-Martínez 1995); *Cichlasoma geddesi* (Pineda-López 1994); *Thorichthys helleri* (Fucugauchi-Suárez del Real *et al.* 1988; Pineda-López 1994; Vidal-Martínez 1995). Lago Santa Anita (18°22'15"N 92°53'10"W); *Cichlasoma geddesi*, *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma pearsei*, *Petenia splendida*, *Paraneetroplus fenestratus* and *Paraneetroplus synspilus* (Pineda-López *et al.* 1985; Pineda-López 1994; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Estanque Tuca (18°10'40"N 92°56'1"W); *Cichlasoma geddesi*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Parachromis friedrichstalii*, *Thorichthys pasionis* and *Paraneetroplus synspilus* (Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Lago el Chiribital (17°59'24"N 93°4'22"W; 17°59'0"N 93°4'0"W); *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma pearsei*, *Petenia splendida*, *Thorichthys meeki*, *Thorichthys pasionis*, *Paraneetroplus fenestratus*, and *Ictalurus furcatus* (Salgado-Maldonado 1985); *Cichlasoma* sp., *Cichlasoma urophthalmum*, *Petenia splendida*, *Thorichthys meeki* and *Thorichthys pasionis* (Osorio-Sarabia *et al.* 1987); *Cichlasoma urophthalmum*, *Thorichthys meeki* and *Thorichthys pasionis* (Salgado-Maldonado 2013). Lago el Espino (18°14'57"N 92°49'59"W); *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma pearsei*, *Petenia splendida*, *Thorichthys meeki*, *Thorichthys pasionis*, *Paraneetroplus fenestratus* and *Ictalurus furcatus* (Salgado-Maldonado 1985); *Cichlasoma* sp., *Cichlasoma urophthalmum*, *Petenia splendida* and *Thorichthys meeki* (Osorio-Sarabia *et al.* 1987); *Cichlasoma urophthalmum* and *Thorichthys helleri* (Pineda-López 1994); *Parachromis motaguensis*, *Thorichthys helleri*, and *Thorichthys pasionis* (Vidal-Martínez *et al.* 2001); *Paraneetroplus synspilus* (Pérez-Ponce de León *et al.* 1996). Río San Pedro (17°45'0"N 91°23'0"W); *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma pearsei*, *Petenia splendida*, *Thorichthys meeki*, *Thorichthys pasionis*, *Paraneetroplus fenestratus* and *Ictalurus furcatus* (Salgado-Maldonado 1985); *Petenia splendida* (Salgado-Maldonado 2013). Río Vicente Guerrero (18°24'20"N 92°54'35"W); *Cichlasoma rectangulare*, *Cichlasoma urophthalmum*, *Cichlasoma pearsei*, *Petenia splendida*, *Thorichthys meeki*, *Thorichthys pasionis*,

Paraneetroplus fenestratus and *Ictalurus furcatus* (Salgado-Maldonado 1985); *Cichlasoma urophthalmum*, *Parachromis fenestratus* and *Cichlasoma rectangulare* (Salgado-Maldonado 2013). Río Usumacinta, Emiliano Zapata (17°45'0"N 91°46'0"W); *Cichlasoma urophthalmum*, *Parachromis managuensis* and *Petenia splendida* (Pineda-López *et al.* 1985). Río Usumacinta, El Corozal (17°44'0"N 91°35'33"W); *Cichlasoma urophthalmum* and *Parachromis managuensis* (Pineda-López 1994; Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Aguada Santa Elena; *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado *et al.* 1997). Pantanos de Centla (17°57'0"N 92°6'0"W); *Cichlasoma urophthalmum* (López-Jiménez 2001); *Parachromis managuensis* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005a; Salgado-Maldonado 2013); *Petenia splendida* (Salgado-Maldonado 2013). Lago el Manguito (18°12'50"N 92°50'5"W); *Parachromis managuensis* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005a). Lago el Pozo (18°0'35"N 92°48'11"W); *Parachromis managuensis* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005a); *Thorichthys pasionis* (Vidal-Martínez *et al.* 2001). Río Usumacinta, Balancán (17°45'8"N 91°32'45"W); *Parachromis managuensis* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005a). Camellones Chontales (17°45'8"N 92°35'10"W); *Thorichthys pasionis* (Vidal-Martínez 1995). **VERACRUZ:** Lago de Catemaco (18°25'0"N 95°7'0"W); *Paraneetroplus fenestratus* (Salgado-Maldonado 1978; Salgado-Maldonado *et al.* 1992; Jiménez-García 1993; Salgado-Maldonado *et al.* 2005b; Martínez-Aquino *et al.* 2009; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Arrollo San Juan Evangelista; *Rocio octofasciata* and *Thorichthys ellioti* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005b). Río Tecolutla (20°26'0"N 97°10'0"W); *Gobiomorus dormitor* (Páez-Rodríguez *et al.* 2002). Río la Antigua (19°20'0"N 96°23'0"W); *Gobiomorus dormitor* (Páez-Rodríguez *et al.* 2002). **YUCATAN:** Cenote Chen-há (20°41'24"N 89°52'36"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Scholz *et al.* 1996). Ría Celestun (20°45'0"N 90°15'0"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado & Kennedy 1997; Salgado-Maldonado *et al.* 1997; Salgado-Maldonado 2013). Mitza (21°26'36"N 89°41'50"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Vidal-Martínez 1995; Vidal-Martínez *et al.* 1998).

Costa Rica: Quebrada Puercos (10°51'0"N 85°34'0"W); *Amatitlania nigrofasciata* (Martínez-Aquino *et al.* 2009). Lago Jalapa (10°31'52"N 84°1'50"W); *Parachromis managuensis*, *Parachromis loisellei*, *Amphilophus longinamus*, *Heterotilapia multiespinosa* and *Archocentrus centrarchus* (**this study**).

Nicaragua: Loonku creek (11°59'5"N 83°46'48"W); *Amphilophus alfari* and *Heterotilapia multiespinosa* (Aguirre-Macedo *et al.* 2001). Puente Chino (12°0'30"N 83°46'13"W); *Parachromis managuensis* and *Heterotilapia multiespinosa* (Aguirre-Macedo *et al.* 2001). Caño Negro (12°0'55"N 84°1'10"W); *Parachromis managuensis* (Aguirre-Macedo *et al.* 2001).

Specimens deposited. CNHE (8592, 6757, 6755, 6756, 6767, 6754, 601, 603, 604, 606, 631, 632, 6783, 8593, 8594, 6758, 8595, 8404, 8398, 8397, 8391, 8396, 8395, 8394, 8392, 8390, 8389, 8388, 8387, 8386, 8385, 8384, 8383, 8382, 8370, 6783, 5623, 650, 652-57, 660).

Note. This species was described from juvenile specimens in the Lago de Catemaco, Veracruz, Mexico from *Paraneetroplus fenestratus* (Salgado-Maldonado 1978), which was taxonomically incorrect, the same author four decades later described features, such as the size and shape of adult of male and female as well as the structure of the eggs (Salgado-Maldonado 2013).

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León & García-Varela 2012**

(Fig. 2e)

Mexico: **CHIAPAS:** Laguna Rion Pijijiapan (15°31'54.3"N 93°9'39.4"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Laguna Conquista (15°40'0.2"N 93°24'51.61"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). Estero Joaquin Amaro (15°46'16.19"N 93°24'30.11"W); *Dormitator latifrons* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). **OAXACA:** Puente Manialtepec (15°57'35.29"N 97°15'00.97"W); *Dormitator latifrons* (**this study**).

Guatemala: Las lisas (13°49'22.23"N 90°15'49.19"W); *Dormitator latifrons* (**this study**).

Honduras: Las brisas de Chamalecon, Puerto Cortés (15°53'13."N 87°2'48.37"W); *Dormitator maculatus* (**this study**).

Costa Rica: Quebrada Ganados (9°31'55"N 84°28'10"W); *Dormitator latifrons* (**this study**). Playa Grande (9°38'15"N 82°40'56"W); *Dormitator maculatus* (**this study**).

Specimens deposited. CNHE (8180, 8181, 8182, 8184, 8183, 8590, 8191).

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe & García-Varela, 2014**

(Fig. 2f)

Mexico: CAMPECHE: El Milagro (18°52'25.37"N 91°24'39.62"W); *Dormitator maculatus* (**this study**). TABASCO: Río el Espino (18°14'47"N 92°49'57"W); *Dormitator maculatus* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2014); *Petenia splendida* (**this study**). VERACRUZ: Laguna de Tamiahua (18°6.6'24"N 94°27'24.9"W); *Dormitator maculatus* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2014). Río Papaloapan, Tlacotalpan (18°36'0"N 95°39'0"W); *Dormitator maculatus* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005b; Pinacho-Pinacho *et al.* 2014); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005b; Martínez-Aquino *et al.* 2009); *Gobiomorus dormitor* (Velázquez-Silvestre 1994; Salgado-Maldonado *et al.* 2005b), *Rhamdia guatemalensis* (Salgado-Maldonado *et al.* 2005b). Laguna de Alvarado (18°45'0"N 95°45'0"W); *Dormitator maculatus* (Chávez-López *et al.* 1996; Montoya-Mendoza *et al.* 2004a, b; Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011); *Centropomus parallelus*, *Cichlasoma urophthalmum* (Trujillo-Álvarez 1995). Laguna de Sontecomapa (18°30'28"N 95°1'58"W); *Dormitator maculatus* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2014). Río Coatzacoalcos (18°6'35"N 94°30'3.9"W); *Dormitator maculatus* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2014). Río la palma (18°33'44.88"N 95°2'59.39"W); *Dormitator maculatus* (**this study**). Río Tesechoacán (18°36'0"N 95°39'0"W); *Cichlasoma urophthalmum* (Salgado-Maldonado 2013).

Specimens deposited. CNHE (8599, 8334, 8673, 8332, 8333, 6759, 6760, 8597, 8598, 8596, 3077, 8393).

Notes. This species was erroneously identified as *N. (N.) golvani* by Salgado-Maldonado *et al.* (2005b). Martínez-Aquino *et al.* (2009) recognized the specimens from eleotrif fishes in coastal lagoons across the Gulf of Mexico slope as independent lineages. The species was finally described using both, molecular and morphological characters by Pinacho-Pinacho *et al.* 2014).

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) panucensis* Salgado-Maldonado, 2013**

(Fig. 2g)

Mexico: HIDALGO: Río Atlapexco (21°0'53"N 98°20'24"W); *Herichthys labridens*, *Amatitlania nigrofasciata* and *Herichthys cyanoguttatus* (Salgado-Maldonado 2013). SAN LUIS POTOSÍ: Axtlan de Terrazas (21°26'1"N 98°52'28"W); *Herichthys cyanoguttatus* (Martínez-Aquino *et al.* 2009). VERACRUZ: Río Pantepec (20°53'35.8"N 97°47'18.8"W); *Herichthys* sp. (**this study**).

Specimens deposited. CNHE (8378, 8379, 8380).

Notes. This species was erroneously identified as *N. (N.) golvani* by Salgado-Maldonado (2006). Martínez-Aquino *et al.* (2009) recognized the specimens from cichlids fishes from Pánuco river as independent lineages and based on this phylogenetic framework Salgado-Maldonado (2013), described these specimens as a new species.

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) roseum* Salgado-Maldonado, 1978**

(Fig. 2h)

Mexico: NAYARIT: Estero La Tovara (21°31'37"N 105°14'29"W); *Citharichthys gilberti* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012). SINALOA: Laguna de Caimanero (25°36'30"N 108°26'26"W); *Achirus mazatlanus* (Salgado-Maldonado 1978; Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011; Pinacho-Pinacho *et al.* 2012).

Specimens deposited. CNHE (633, 634, 663-664, 6762-6763).

***Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) schmidti* Barger, Thatcher & Nickol, 2004**

(Fig. 2i)

Mexico: TABASCO: 24 km to S of Villahermosa; *Trachemys venusta* (Barger 2004; Barger *et al.* 2004). Pantanos de Centla (18°28'18.9"N 92°39'14.9"W). *Trachemys scripta* (Martínez-Aquino *et al.* 2009; García-Varela *et al.* 2011).

Specimens deposited. CNHE (6764), HWML (17667), USNPC (92883).

Species delimitation through phylogenetic analysis and genetic divergence. To demonstrate the species boundaries among the species reported in this checklist, we sequenced a total of 269 individuals of the species: *N. (N.) brentnickoli* (81 individuals from 16 localities); *N. (N.) roseum* (two individuals from two localities); *N. (N.) mamesi* (22 individuals from seven localities); *N. (N.) golvani* (80 individuals from 11 localities); *N. (N.) mexicoensis* (47 individuals from eight localities); *N. (N.) schmidtii* (five individuals from one locality); *N. (N.) emyditoides* (26 individuals from three localities); *N. (N.) panucensis* (four individuals from two localities); and *N. (N.) chimalapasensis* (two individuals from one locality). Additionally sequence of *N. saginata* plus *Floridosentis mugilis* and *Floridosentis pacifica* were aligned together, composing a data set of 806 bp with 274 terminals. Nucleotide frequencies for 28S rDNA data set were 0.246 (A), 0.178 (C), 0.276 (G), and 0.298 (T). Phylogenetic analyses of the available sequences for the genus *Neoechinorhynchus* through the Bayesian consensus tree yielded the same branch pattern as the ML tree (Fig. 3). Both trees yielded that the ten species of *Neoechinorhynchus* are monophyletic with strong nodal support ranging from 72 to 100 % of bootstrap, and 1.0 of posterior probability (Fig. 3). Both trees yielded three major clades. The first clade contained four species *N. (N.) roseum*, *N. saginata*, *N. (N.) schmidtii* and *N. (N.) emyditoides*. The second clade was composed of two species *N. (N.) golvani* and *N. (N.) panucensis* and had 100 % bootstrap support and 1.0 posterior probability. The third clade was composed of four species *N. (N.) chimalapasensis*, *N. (N.) brentnickoli*, *N. (N.) mamesi* and *N. (N.) mexicoensis* and received reliable bootstrap support and high values of posterior probability (Fig. 3).

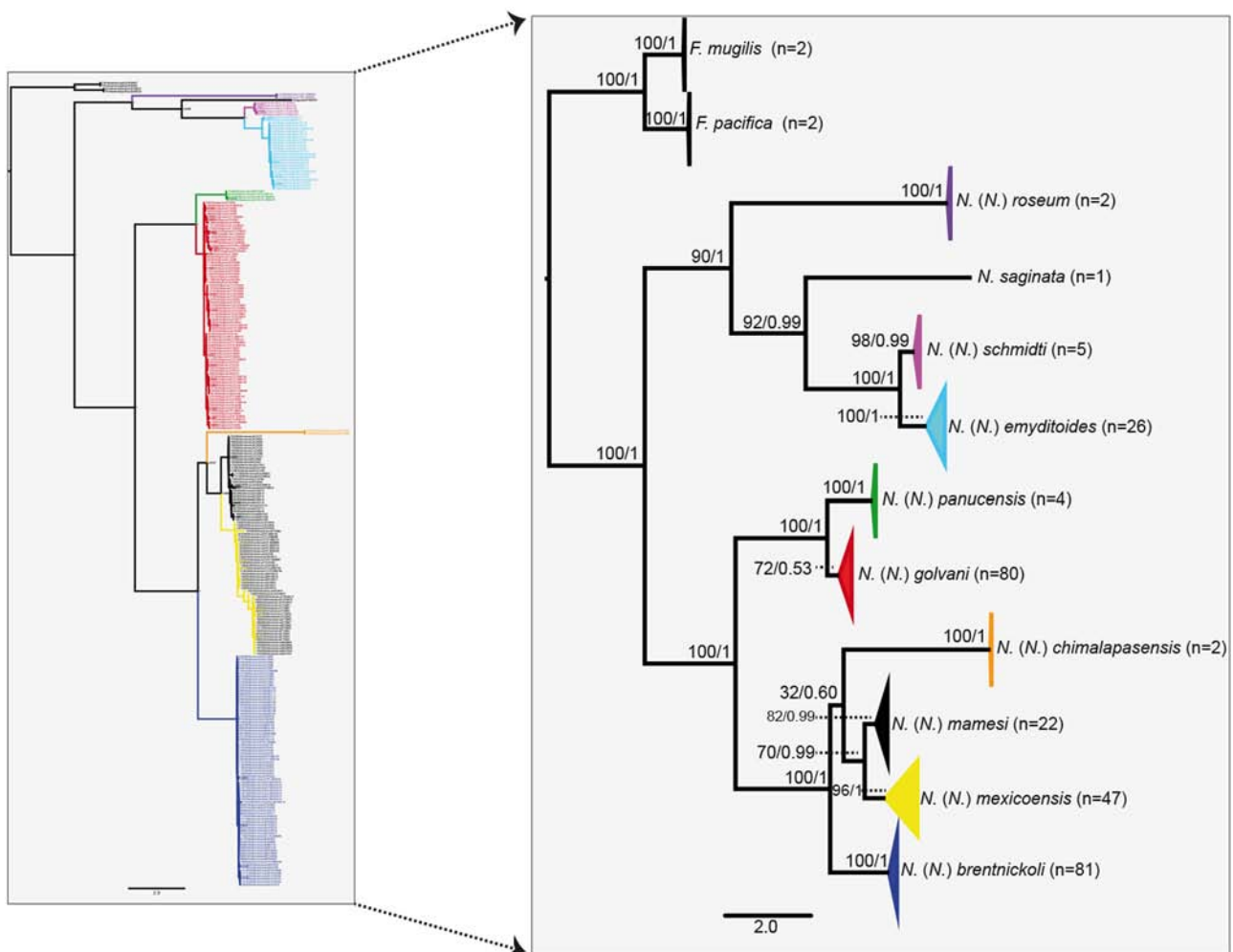


FIGURE 3. Phylogenetic tree obtained with Bayesian (consensus) and Maximum Likelihood methods. Parenthesis after terminals indicates number of sequences for each species. Numbers above branches represent bootstrap support values ML analysis/posterior probabilities of BY inference.

TABLE 1. Specimens information: collection sites (CS), samples analyzed for DNA, species analyzed, specimens examined (N), host species, localities, GenBank accession number and catalog number (CNHE) for specimens studied in this work. Sequences marked with an asterisk (*) were obtained in the current study.

CS	Samples (DNA)	Species	N	Host	Locality	GenBank	Specimens deposited CNHE
1	1-3	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	3	<i>Dormitator latifrons</i>	Todos los Santos, Baja California Sur, México	KR086167-KR086169*	
2	4-8	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Oasis San José del Cabo, Baja California Sur, México	KR086170-KR086174*	8586
3	9-12	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	4	<i>D. latifrons</i>	Topolobampo, Sinaloa, México	KR086175-KR086178*	
4	13-17	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	El Huizache, Sinaloa, México	KR086179-KR086183*	8587
5	18-22	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Vía Ferrea, Escuinapa, Sinaloa, México	KR086184-KR086188*	8588
6	23-27	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Nuevo Vallarta, Nayarit, México	KR086189-KR086193*	
7	28-33	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	6	<i>D. latifrons</i>	Estero Chamela, Jalisco, México	FJ388990, KR086194-KR086198*	8589
8	34	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	1	<i>D. latifrons</i>	Río Cuitzmala, Jalisco, México	FJ388989	
9	35-39	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Cuyutlan, Colima, México	KR086199-KR086203*	
10	40-49	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Estero Boca de Apiza, Michoacán, México	JN830782-JN830786, KR086204-KR086208*	8176
11	50-54	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Estero Huahua, Michoacán, México	KR086209-KR086213*	8177
12	55-59	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Estero Mexcalhuacan, Michoacán, México	JN830777- JN830781	8173
13	60-64	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Estero Barra de Pichi, Michoacán, México	KR086214-KR086218*	8174
14	65-66	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	2	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Coyuca, Guerrero, México	JN830775, JN830776	8175
15	67-76	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Tres Palos, Guerrero, México	FJ388991, FJ968156- FJ968159, KR086219-KR086223*	8178
16	77-81	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Río Tamarindo, Chautengo, Guerrero, México	KR086224-KR086228*	8179
17	82	<i>N. (N.) roseum</i>	1	<i>Achirus mazatlanus</i>	Laguna el Caimanero, Sinaloa, México	FJ388999	6762, 633, 634
18	83	<i>N. (N.) roseum</i>	1	<i>Citharichthys gilberti</i>	Estero La Tovar, Nayarit, México	FJ389000	6763
19	84-86	<i>N. (N.) mamesi</i>	3	<i>D. latifrons</i>	Puente Manialtepec, Oaxaca	KR086229-KR086231*	

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

CS	Samples (DNA)	Species	N	Host	Locality	GenBank	Specimens deposited CNHE
20	87-91	<i>N. (N.) mamesi</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Estero Joaquin Amaro, Chiapas, México	JN830770- JN830774	8183
21	92-95	<i>N. (N.) mamesi</i>	4	<i>D. latifrons</i>	Laguna la Conquista, Chiapas, México	JN830766- JN830769	8184
22	96-98	<i>N. (N.) mamesi</i>	3	<i>D. latifrons</i>	Laguna Rion Pijijiapan, Chiapas, México	JN830763- JN830765	8180, 8181, 8182
23	99-100	<i>N. (N.) mamesi</i>	2	<i>D. latifrons</i>	Quebrada Ganados, Costa Rica	KR086232*, KR086233*	8590
24	101-102	<i>N. (N.) mamesi</i>	2	<i>D. maculatus</i>	Playa Grande, Costa Rica	KR086234*, KR086235*	8191
25	103-105	<i>N. (N.) mamesi</i>	3	<i>D. latifrons</i>	Las lisas , Guatemala	KR086236-KR086238*	
26	106-107	<i>N. (N.) golvani</i>	1	<i>Parachromis managuensis</i>	Lago Jalapa, Costa Rica	KR086239*	
	108-109	<i>N. (N.) golvani</i>	2	<i>Parachromis loisellei</i>	Lago Jalapa, Costa Rica	KR086240*, KR086241*	
	110-111	<i>N. (N.) golvani</i>	2	<i>Amphilophus longimanus</i>	Lago Jalapa, Costa Rica	KR086242*, KR086243*	8592
	112	<i>N. (N.) golvani</i>	1	<i>Heterotilapia multiespinosa</i>	Lago Jalapa, Costa Rica	KR086244*	
	113-114	<i>N. (N.) golvani</i>	2	<i>Archocentrus centrarchus</i>	Lago Jalapa, Costa Rica	KR086245*, KR086246*	
27	115-116	<i>N. (N.) golvani</i>	2	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Quebrada Puercos, Costa Rica	FJ388998, KR086247*	6757
28	117-127	<i>N. (N.) golvani</i>	11	<i>Vieja pearsei</i>	Presa Chicoasen, Chiapas, México	FJ388995, FJ968136- FJ968138, KR086248-KR086254*	6755
29	128-132	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>V. pearsei</i>	Presa Nezahualcoyolt, Chiapas, México	FJ388996, FJ968141, FJ968142, KR086255*, KR086256*	6756
30	133-143	<i>N. (N.) golvani</i>	11	<i>Parachromis friedrichstalii</i>	Lago Canitzan, Tenosique, Tabasco, México	FJ388994, FJ968139, FJ968140, KR086257-KR086264*	6767
31	144-153	<i>N. (N.) golvani</i>	10	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Río Carrizal, Tabasco, México	FJ388993, FJ968134, FJ968135, KR086265-KR086271*	6754
32	154-156	<i>N. (N.) golvani</i>	3	<i>C. urophthalmum</i>	Lago las Ilusiones, Tabasco, México	FJ388992- FJ968144	
33	157-167	<i>N. (N.) golvani</i>	11	<i>Paraneotroplus fenestratus</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México	FJ388986, FJ968145, FJ968146, KR086272-KR086279*	601, 603, 604, 606, 631, 632, 6783
34	168-172	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>C. urophthalmum</i>	Presa Temascal, Oaxaca, México	KR086280-KR086284*	8593

.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

CS	Samples (DNA)	Species	N	Host	Locality	GenBank	Specimens deposited CNHE
	173-177	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>Cichlasoma salvini</i>	Presa Temascal, Oaxaca, México	KR086285-KR086289*	8594
35	178-182	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>C. urophthalmum</i>	Emiliano Zapata, Tabasco, México	KR086290-KR086294*	8595
36	183-186	<i>N. (N.) golvani</i>	4	<i>Thorichthys meeki</i>	Hool, Campeche, México	KR086295-KR086298*	
37	187-191	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>Dormitator maculatus</i>	Laguna de Tamiahua, Veracruz, México	KC004161-KC004165	8334
38	192-197	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	6	<i>D. maculatus</i>	Laguna de Alvarado, Veracruz, México	FJ388985, FJ968152- FJ968155, KC004171	6760
39	198-200	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	3	<i>D. maculatus</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	KR086299-KR086301*	8673, 8332, 8333
	201-206	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	6	<i>C. urophthalmum</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	FJ388987, FJ388988, FJ968149- FJ968151, KR086302*	6759
40	207-209	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	3	<i>D. maculatus</i>	Río la palma, Veracruz, México	KR086303-KR086305*	8596
41	210-214	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Laguna de Sontecomapa, Veracruz, México	KC004151-KC004155	8597
42	215-219	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Río Coatzacoalcos, Veracruz, México	KC004166-KC004170	8598
43	220-224	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Río Espino, Tabasco, México	KC004156-KC004160	
	225-228	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	4	<i>Petenia splendida</i>	Río Espino, Tabasco, México	KR086306-KR086309*	
44	229-233	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	El Milagro, Campeche, México	KR086310-KR086314*	8599
45	234-238	<i>N. (N.) schmidtii</i>	5	<i>Trachemys scripta</i>	Pantanos de Centla, Tabasco, México	FJ389001, HQ634785- HQ634788	6764
46	239-247	<i>N. (N.) emyditoides</i>	9	<i>T. scripta</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México	HQ634781, HQ634782, KR086315- KR086321*	6737
47	248-256	<i>N. (N.) emyditoides</i>	9	<i>T. scripta</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	HQ634784, HQ634783, KR086322-KR086328*	6695
48	257-264	<i>N. (N.) emyditoides</i>	8	<i>T. scripta</i>	Presa la Herradura, Monterrey, México	HQ634780, HQ634779, KR086329-KR086334*	6696
49	265	<i>N. (N.) panucensis</i>	1	<i>Herichthys</i> sp.	Río Pantepec, Veracruz, México	KR086335*	
50	266-268	<i>N. (N.) panucensis</i>	3	<i>Herichthys cyanoguttatus</i>	Axtlan de Terrazas, San Luis Potosí, México	FJ389002, FJ968147, FJ968148	6758
51	269	<i>N. (N.) chimalapasensis</i>	2	<i>Awaous banana</i>	Río Negro, Santa María Chimalapa, Oaxaca, México	KR086336*, KR086337*	5018, 5019, 5020

The sequence divergence estimated among the nine species herein considered, plus an additional sequence available for a species that occurs in freshwater fishes in North America (*N. saginata*) ranged from 3.2% to 48.7% (Table 2). Instead, the intraspecific genetic divergence varied markedly among all the isolates sequenced for each acanthocephalan species and it was never higher than 3% for all intraspecific comparisons. For instance, the divergence among 81 specimens of *N. (N.) brentnickoli* obtained from a wide geographic range, in 16 localities (localities 1-16 in Fig. 1) across the Pacific coast of northwestern Mexico, varied from 0 to 0.7% (Table 2). In other example, *N. (N.) roseum* corresponding to two individuals of two localities 1) Laguna el Caimanero, Sinaloa and 2) Estero La Tovar, Nayarit (localities 17-18), had genetic divergence from 0 to 0.04%. The species *N. (N.) mamesi* comprises 22 individuals from seven localities from Mexico, one of Guatemala and two from Costa Rica (localities 19-25 in Fig. 1), showing a genetic divergence from 0 to 1.3%. *N. (N.) golvani* shows genetic divergence from 0 to 1.5% among 80 specimens from 11 localities (see localities 26-36). The species *N. (N.) mexicoensis* corresponding to 47 individuals from eight localities (localities 37-44) from Gulf of Mexico shows a genetic divergence ranged from 0 to 3%. *N. (N.) schmidti* shows low genetic divergence ranged from 0-0.02% of specimens analyzed from the same locality. The species *N. (N.) emyditoides* corresponding three localities: 1) Lago de Catemaco, Veracruz, 2) Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz and 3) Presa la Herradura, Monterrey (localities 46-48), showed a genetic divergence from 0 to 1.3%. The specimens of *N. (N.) panucensis* are from Axtlan de Terrazas, San Luis Potosí, and Río Pantepec, Veracruz (localities 49-50), both localities are near of the type locality of *N. (N.) panucensis*. The genetic divergence among four isolates of *N. (N.) panucensis* ranged from 0.02–0.05%. Finally, the two specimens of *N. (N.) chimalapasensis* showed a genetic divergence equal to zero (locality 51).

TABLE 2. Pair-wise percentage sequence divergence (*p*) within and between *Neoechinorhynchus* spp., derived from 28S rDNA; ranges are given. Number of specimens examined = (n).

	1	2	3	4	5
1. <i>N. (N.) brentnickoli</i> (n = 81)	0–0.7	42–43	8.1–9.8	21.9–23.7	7.3–10
2. <i>N. (N.) roseum</i> (n = 2)		0–0.04	40.9–42.9	41.1–43.1	39.7–43.2
3. <i>N. (N.) mamesi</i> (n = 22)			0–1.3	21–23.6	2.40–5.50
4. <i>N. (N.) golvani</i> (n = 80)				0–1.5	21.0–24.6
5. <i>N. (N.) mexicoensis</i> (n = 47)					0–3.0
6. <i>N. (N.) schmidti</i> (n = 5)					
7. <i>N. (N.) emyditoides</i> (n = 26)					
8. <i>N. (N.) panucensis</i> (n = 4)					
9. <i>N. (N.) chimalapasensis</i> (n = 2)					
10. <i>N. saginata</i> (n = 1)					

continued.

	6	7	8	9	10
1. <i>N. (N.) brentnickoli</i> (n = 81)	39.3–39.7	38.8–39.5	23.2–24.5	20.3–21.0	39.2–39.6
2. <i>N. (N.) roseum</i> (n = 2)	31.3–31.6	32.8–33.2	42.8–43.8	48.4–48.7	38.7–38.8
3. <i>N. (N.) mamesi</i> (n = 22)	38.2–40.5	37.0–39.6	23.0–25.1	16.8–18.1	38.0–39.5
4. <i>N. (N.) golvani</i> (n = 80)	36.1–38.3	34.8–37.7	4.70–6.30	27.1–28.8	33.3–34.8
5. <i>N. (N.) mexicoensis</i> (n = 47)	37.1–39.1	35.5–38.2	23.0–26.1	18.2–20.6	37.4–39.9
6. <i>N. (N.) schmidti</i> (n = 5)	0–0.02	3.2–4.1	38.2–38.8	43.5–43.9	20.9
7. <i>N. (N.) emyditoides</i> (n = 26)		0–1.3	38.3–39.9	42.4–42.8	21.1–21.4
8. <i>N. (N.) panucensis</i> (n = 4)			0.02–0.05	28.6–28.9	35.9–36.5
9. <i>N. (N.) chimalapasensis</i> (n = 2)				0	41.19
10. <i>N. saginata</i> (n = 1)					0

Discussion

The checklist presented herein includes information for nine species of *Neoechinorhynchus* distributed in Middle-America, two of them occurs in freshwater turtles (*N. (N.) schmidtii* and *N. (N.) emyditoides*) from Gulf of Mexico, whereas *N. (N.) roseum*, *N. (N.) brentnickoli*, *N. (N.) mamesi*, and *N. (N.) mexicoensis* occur in marine and brackish fishes from both shoreline coasts of Mexico and other three species occur in freshwater fishes i. e., (*N. (N.) golvani*, *N. (N.) chimalapasensis* and *N. (N.) panucensis*) (see Pinacho-Pinacho *et al.* 2014). These species of the genus *Neoechinorhynchus* were found as adults in 55 species of fish, and one species of freshwater turtles in 87 localities comprising five countries: Mexico, Guatemala, Nicaragua, Honduras, and Costa Rica.

The acanthocephalan *N. (N.) golvani* and *N. (N.) panucensis* were found in cichlids and these parasites are considered as a component of the helminth fauna of this family of fishes (see Pérez-Ponce de León & Choudhury 2005). The distribution area of *N. (N.) golvani* extends from southeastern Mexico to Costa Rica, whereas *N. (N.) panucensis* is restricted to Panuco river on the Gulf of Mexico and it could be explained as a result of the contemporary and historical biogeography of their cichlid hosts (Concheiro-Pérez *et al.* 2007). The species *N. (N.) brentnickoli*, *N. (N.) mamesi* and *N. (N.) mexicoensis* were found in eleotrid fishes and are considered as a component of the helminth fauna of this family of fishes. The area of distribution of *N. (N.) brentnickoli* extends from the Isthmus of Tehuantepec northwards to the Sea of Cortez, associated to *D. latifrons*, whereas that *N. (N.) mamesi* is distributed from the Isthmus of Tehuantepec, in Chiapas, Mexico southwards to Costa Rican Pacific coast in Central America, associated to *D. latifrons* and *D. maculatus*. Whereas, *N. (N.) mexicoensis* is distributed in Gulf of Mexico associated to *D. maculatus* (Pinacho-Pinacho *et al.* 2014). The species *N. (N.) emyditoides* and *N. (N.) schmidtii* were found in freshwater turtles of the genus *Trachemys* distributed in Gulf of Mexico (see García-Varela *et al.* 2011). *N. (N.) emyditoides* was recorded previously in several localities of North America (Barger 2004).

The Bayesian and ML analyses inferred with the LSU dataset that include 274 taxa show that *Neoechinorhynchus* is divided into 10 clades representing the 10 species analyzed herein. The genetic divergence estimated among species ranged from 3.2% to 48.7%. These ranges of genetic divergence are similar to those reported by Martínez-Aquino *et al.* (2009); Rosas-Valdez *et al.* (2012); Pinacho-Pinacho *et al.* (2014) who identified species of the genera *Neoechinorhynchus* and *Floridosentis* from Neoechinorhynchidae. In the present study the large subunit of the ribosomal gene (LSU) was used as molecular marker to determinate differences/similarities among species of *Neoechinorhynchus*. This gene has faster rate of evolution than small subunit of the ribosomal gene (SSU) and was useful to recognize species of *Neoechinorhynchus* and also has been used for population studies or to detect species complex in acanthocephalans and therefore this gene could be used as an efficient supplement for classical DNA barcoding that use the cytochrome oxidase subunit I (cox 1) (Martínez-Aquino *et al.* 2009; Rosas Valdez *et al.* 2012; García-Varela & Pérez Ponce de León 2015).

Acknowledgments

We are grateful to David Hernández, Rogelio Rosas, Mirza Olivares, Arturo Angulo, Carlos Garita, Omar Dominguez, Eloísa Torres, Chavo RG, Angeles Pérez Ruíz, Edgar Sandoval, Gina Palacios, Adriana Andrade, Julio Herrera, Leopoldo Andrade, and Eduardo Hernández for their help during field work. We also thank Luis García Prieto for providing specimens deposited at the CNHE. This research was supported by grants from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN207213 to MGv and IN219904 to GPPL, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 179048 to MGv. Carlos Daniel Pinacho-Pinacho thanks the support of the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México to complete his Ph.D. degree, and to CONACYT for granting a scholarship.

References

- Aguirre-Macedo, M.L., Scholz, T., González-Solís, D., Vidal-Martínez V.M., Posel, P., Arjona-Torres, G., Dumailo, S. & Siu-Estrada, E. (2001) Some adult endohelminths parasitizing freshwater fishes from the Atlantic drainages of Nicaragua. *Comparative Parasitology*, 68 (2), 190–195.

- Amin, O.M. (2002) Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles and Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology*, 53 (1), 1–18.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1019953421835>
- Amin, O.M. (2013) Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica*, 60 (4), 273–305.
<http://dx.doi.org/10.14411/fp.2013.031>
- Amin, O.M. & Heckmann, R. (2009) Description of *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buckneri* n. sp. from the blacktailed redhorse *Moxostoma poecilurum* (Catostomidae) in the Tchoutacabouffa River, Mississippi, with a key to species of *Neoechinorhynchus* with different dorsoventral body wall thickness. *Comparative Parasitology*, 76 (2), 154–161.
<http://dx.doi.org/10.1654/4392.1>
- Barger, M.A. (2004) The *Neoechinorhynchus* of turtles: specimen base, distribution, and host use. *Comparative Parasitology*, 71 (2), 118–129.
<http://dx.doi.org/10.1654/4145>
- Barger, M.A., Thatcher, E.V. & Nickol, B.B. (2004) A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology*, 71 (1), 1–3.
<http://dx.doi.org/10.1654/4099>
- Bermingham, E. & Martin, A.P. (1998) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7 (4), 499–517.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x>
- Bravo-Hollis, M. (1946) *Neoechinorhynchus emydis* (Leidy, 1852) van Cleave, 1913, parásito del intestino de *Chrysemys ornata*. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México*, 17, 187–192.
- Bussing, W.A. (1985) Patterns of distribution of the Central American ichthyofauna. In: Stehli, F.G. & Webb, S.D. (Eds.), *The Great American Biotic Interchange*. New York Plenum Press, New York, pp. 453–473.
- Chávez-López, R., Montoya-Mendoza, J., Franco-López, J., Barrera-Escorcia, H. & Morán-Silva, A. (1996) Parásitos de peces colectados en la Laguna de Alvarado, Veracruz. *Revista Zoológica*, 2 (2), 35–56.
- Concheiro-Pérez, G.A., Rican, O., Ortí, G., Bermingham, E., Doadrio, I. & Zardoya, R. (2007) Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43 (1), 91–110.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.012>
- Contreras-Balderas, S., Obregon, S.H. & Lourdes-Lozano, M.L. (1996) Punta de Morro, an interesting barrier for distributional patterns of Continental fishes in North and Central Veracruz, Mexico. *Acta Biologica Venezuelica*, 16 (4), 37–42.
- Fisher, F.M. (1960) On Acanthocephala of turtles, with the description of *Neoechinorhynchus emyditoides* n. sp. *Journal of Parasitology*, 46, 257–266.
- Fucugauchi-Suarez del Real, M.G., García-Magaña, L. & Brito-Arjona, B. del R. (1988) Análisis previo de la parasitofauna de peces de la Laguna del Rosario, Huimanguillo, Tabasco. *Divulgación Científica*, 1, 319–335.
- García-Magaña, L. (1990) *Variación estacional de los helmintos endoparásitos de Cichlasoma synspilum en la Laguna de las Ilusiones, Tabasco, México*. B.S. Thesis, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, 123 pp.
- García-Prieto, L., García-Varela, M., Mendoza-Garfias, B., Pérez-Ponce de León, G. (2010) Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa*, 2419, 1–50.
- García-Varela, M., García-Prieto, L. & Pérez Rodríguez, R. (2011) Molecular identification and first description of the male of *Neoechinorhynchus schmidti* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae), a parasite of *Trachemys scripta* (Testudines) in México. *Parasitology International*, 60 (4), 433–439.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.07.005>
- García-Varela, M. & Nadler, S.A. (2005) Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 91 (6), 1401–1409.
<http://dx.doi.org/10.1645/GE-523R.1>
- García-Varela, M. & Pérez-Ponce de León, G. (2015) Advances in the classification of acanthocephalans: evolutionary history and evolution of the parasitism. In: *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics*. Cambridge, University Press, Cambridge, pp. 182–201.
- Garrido-Olvera, L., García-Prieto, L. & Mendoza-Garfias, B. (2004) Helminth parasites of the Pacific fat sleeper, *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844) (Osteichthyes: Eleotridae) from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *American Midland Naturalist*, 15 (1), 165–169.
[http://dx.doi.org/10.1674/0003-0031\(2004\)151\[0165:HPOTPF\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1674/0003-0031(2004)151[0165:HPOTPF]2.0.CO;2)
- Guzman-Speziale, M., Valdes-Gonzalez, C., Molina, E. & Gomez, J.M. (2005) Seismic activity along the Central America Volcanic Arc: is it related to subduction of the Cocos plate?. *Tectonophysics*, 400, 241–254.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tecto.2005.03.006>
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 (8), 754–755.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Huidobro, L., Morrone, J.J., Villalobos, J.L. & Alvarez, F. (2006) Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans

- and plants) from the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 33 (4), 731–741.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01400.x>
- Iturralde-Vinent, M.A. & MacPhee, R.D.E. (1999) Paleogeography of the Caribbean region: Implications for cenozoic biogeography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 238, 1–95.
- Jiménez-García, M.I. (1993) Fauna helmintológica de *Cichlasoma fenestratum* (Pisces: Cichlidae) del Lago de Catemaco, Veracruz, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 64 (1), 75–78.
- López-Jiménez, S. (2001) Estudio parasitológico de los peces de aguas dulces del estado de Tabasco. *Gaceta Sigolfo: Sistema de Investigación del Golfo de México*, 3, 8–10.
- Malyarchuk, B., Derenko, M., Mikhailova, E. & Denisova, G. (2014) Phylogenetic relationships among *Neoechinorhynchus* species (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from North-East Asia based on molecular data. *Parasitology International*, 63 (1), 100–107.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.012>
- Martin, A.P. & Bermingham, E. (1998) Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 9 (2), 192–203.
<http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1997.0461>
- Martínez-Aquino, A., Reyna-Fabián, M.E., Rosas-Valdez, R., Razo-Mendivil, U., Pérez-Ponce de León, G. & García-Varela, M. (2009) Detecting a complex of cryptic species within *Neoechinorhynchus golvani* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) inferred from ITSs and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 95 (5), 1040–1047.
<http://dx.doi.org/10.1645/GE-1926.1>
- Mateos, M. (2005) Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae : Cyprinodontiformes) in central Mexico. *Journal of Biogeography*, 32 (5), 775–780.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01236.x>
- Mayén-Peña, E. (2003) *Distribución intestinal de helmintos parásitos de los peces Agonostomus monticola (Pisces: Mugilidae) y Dormitator latifrons (Eleotridae) en tres localidades del Estado de Jalisco, México*. M. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, 98 pp.
- Méndez, O., Salgado-Maldonado, G., Caspeta-Mandujano, J.M. & Cabañas-Carranza G. (2010) Helminth parasites of some freshwater fishes from Baja California Sur, Mexico. *Zootaxa*, 2327, 44–50.
- Monks, S., Pulido-Flores, G. & Violante-González, J. (2011) A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Dormitator latifrons* (Perciformes: Eleotridae) from the Pacific Coast of Mexico. *Comparative Parasitology*, 78 (1), 21–8.
<http://dx.doi.org/10.1654/4462.1>
- Montoya-Mendoza, J., Chávez-López, R. & Franco-López, J. (2004a) Helminths from *Dormitator maculatus* (Pisces: Eleotridae) in Alvarado Lagoon, Veracruz, Mexico, and supplemental data for *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 from *Egretta caerulea* (Aves: Ardeidae). *Gulf and Caribbean Research*, 16, 115–127.
- Montoya-Mendoza, J., Osorio-Sarabia, D., Chávez-López, R. & Franco-López, J. (2004b) Helmintos del pez *Dormitator maculatus* (Osteichthyes: Eleotridae) de Alvarado, Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 52 (2), 393–396.
<http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v52i2.15255>
- Morales-Sosa, A. (2008) *Helmintofauna de Petenia splendida (Osteichthyes: Cichlidae) en algunas localidades dulceacuícolas de México*. B. S. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 105 pp.
- Morrone, J.J. (2002) Biogeographical regions under track and cladistic scrutiny. *Journal of Biogeography*, 29 (2), 149–152.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00662.x>
- Nadler, S.A. & Pérez-Ponce de León, G. (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, 138 (13), 1688–1709.
<http://dx.doi.org/10.1017/S003118201000168X>
- Nolan, M.J. & Cribb, T.H. (2005) The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in Parasitology*, 60, 101–163.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60002-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60002-4)
- Osorio-Sarabia, D., Pineda-López, R. & Salgado-Maldonado, G. (1987) Fauna helmintológica de peces dulceacuícolas de Tabasco. Estudio Preliminar. *Universidad y Ciencia*, 4, 5–31.
- Páez-Rodríguez, M., Páez-Bistraín, R., Campos-Pérez, J.J. & Velázquez-Silvestre, M.G. (2002) Parásitos en peces comerciales. In: Guzmán-Amaya, P., Quiroga-Brahams, C., Díaz-Luna, C., Fuentes-Castellanos, D., Contreras, C.M. & Silva-López, G. (Eds.), *La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de la Pesca y Universidad Veracruzana, Xalapa, pp. 127–144.
- Pérez-Ponce de León, G. & Choudhury, A. (2005) Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and processes. *Journal of Biogeography*, 32, 645–659.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01218.x>
- Pérez-Ponce de León, G. & Nadler S.A. (2010) What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology*, 96 (2), 453–464.
<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2260>
- Pérez-Ponce de León, G., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D. & León-Règagnon, V. (1996) *Listados Faunísticos de México VI. Helmintos parásitos de peces de aguas continentales de México*. Instituto de Biología, Universidad Nacional

Autónoma de México, Mexico, pp. 100.

- Pinacho-Pinacho, C.D., Pérez-Ponce de León, G. & García-Varela, M. (2012) Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International*, 61 (4), 634–644.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.06.006>
- Pinacho-Pinacho, C.D., Sereno-Urbe, A.L. & García-Varela, M. (2014) Morphological and molecular data reveal a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from *Dormitator maculatus* in the Gulf of Mexico. *Parasitology International*, 63 (6), 763–771.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.003>
- Pineda-López, R. (1994) *Ecology of the helminth communities of cichlid fish in the flood plains of Southeastern Mexico*. Ph. D. Thesis. University of Exeter, Exeter, 237 pp.
- Pineda-López, R., Carballo-Cruz, V., Fukugauchi-Suárez de Real, M.G. & García-Magaña L (1985) Metazoarios parásitos de peces de importancia comercial de la región de Los Ríos, Tabasco, México. In: Gobierno del Estado de Tabasco, Usumacinta, *Investigación Científica en la Cuenca del Usumacinta*, 1 (1), pp. 197–270.
- Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (7), 1253–1256.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4, Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 16 June 2016)
- Ramírez-Jiménez, P.D. (1993) *Caracterización de la helmintofauna de Cichlasoma pasionis Rivas, 1962 y Cichlasoma helleri Steindachner, en la Laguna de las Ilusiones, Tabasco, México*. B. S. Thesis, Escuela de Biología, Instituto de Artes y Ciencias de Chiapas, Tuxtla-Gutiérrez, Chiapas, 156 pp.
- Rosas-Valdez, R., Morrone, J.J. & García-Varela, M. (2012) Molecular phylogenetics of *Floridosentis ward*, 1953 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) parasites of mullets (Osteichthyes) from Mexico, using 28S rDNA sequences. *Journal of Parasitology*, 98 (4), 855–862.
<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2963.1>
- Salgado-Maldonado, G. (1978) Acanthocéfalos de peces IV. Descripción de dos especies nuevas de *Neoechinorhynchus* Hamann, 1892 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) y algunas consideraciones sobre este género. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 49 (1), 35–48.
- Salgado-Maldonado, G. (1985) Crecimiento alométrico y consideraciones taxonómicas sobre *Neoechinorhynchus golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) parásito de peces dulceacuícolas en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 2, 57–66.
- Salgado-Maldonado, G. (2013) Redescription of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) and description of a new species from freshwater cichlids (Teleostei: Cichlidae) in Mexico. *Parasitology Research*, 112 (5), 1891–1901.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3374-7>
- Salgado-Maldonado, G., Aguilar-Aguilar, R., Cabañas-Carranza, G., Soto-Galera, E. & Mendoza-Palmero, C. (2005b) Helminth parasites in freshwater fish from the Papaloapan river basin, Mexico. *Parasitology Research*, 96 (2), 69–89.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-005-1315-9>
- Salgado-Maldonado, G., Cabañas-Carranza, G., Caspeta-Mandujano, J.M., Soto-Galera, E., Mayén-Peña, E., Brailovsky, D. & Báez-Valé, R. (2001a) Helminth parasites of freshwater fishes of the Balsas River Drainage Basin of Southwestern Mexico. *Comparative Parasitology*, 68, 196–203.
- Salgado-Maldonado, G., Cabañas-Carranza, G., Soto-Galera, E., Caspeta-Mandujano, J.M., Moreno-Navarrete, G., Sánchez-Nava, P. & Aguilar-Aguilar, R. (2001b) A Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from the Lerma-Santiago River Basin, Mexico. *Comparative Parasitology*, 68, 204–218.
- Salgado-Maldonado, G., Caspeta-Mandujano, J.M. & Martínez-Ramírez, E. (2010) *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) chimalapasensis* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the freshwater fish *Awaous banana* (Valenciennes) (Gobiidae) in Mexico. *Systematic Parasitology*, 75 (3), 231–237.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11230-009-9218-2>
- Salgado-Maldonado, G., Caspeta-Mandujano, J.M., Moravec, F., Soto-Galera, E., Rodiles-Hernández, R., Cabañas-Carranza, G. & Montoya-Mendoza, J. (2011) Helminth parasites of freshwater fish in Chiapas, Mexico. *Parasitology Research*, 108 (1), 31–59.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2035-3>
- Salgado-Maldonado, G., Jiménez-García, I. & León-Règagnon, V. (1992) Presence of *Octospiniferoides chandleri* Bullock, 1957, in *Heterandria bimaculata* from Catemaco, Veracruz, and considerations about the acanthocephalans of fresh water fishes of Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (1), 239–240.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761992000500044>
- Salgado-Maldonado, G. & Kennedy, C.R. (1997) Richness and similarity of helminth communities in the tropical cichlid fish *Cichlasoma urophthalmus* from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Parasitology*, 114 (6), 581–590.
- Salgado-Maldonado, G., Mercado-Silva, N., Cabañas-Carranza, G., Caspeta-Mandujano, J.M., Aguilar-Aguilar, R. & Iñiguez-Dávalos, L.I. (2004) Helminth parasites of freshwater fishes of the Ayuquila River, Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, west Central Mexico. *Comparative Parasitology*, 71, 67–72.
<http://dx.doi.org/10.1654/4067>

- Salgado-Maldonado, G., Pineda-López, R., García-Magaña, L., López-Jiménez, S., Vidal-Martínez, V.M. & Aguirre-Macedo, L. (2005a) Helmintos parásitos de peces dulceacuícolas. In: Bueno, J., Álvarez, F. & Santiago, S. (Eds.), *Biodiversidad del Estado de Tabasco*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México and Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mexico, pp. 145–166.
- Salgado-Maldonado, G., Pineda-López, R., Vidal-Martínez, V.M. & Kennedy, C.R. (1997) A checklist of metazoan parasites of cichlid fish from Mexico. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 64 (2), 195–207.
- Scholz, T., Vargas-Vázquez, J., Moravec, F., Vivas-Rodríguez, C. & Mendoza-Franco, E. (1996) Cestoda and Acanthocephala of fishes from cenotes (= sinkholes) of Yucatan, Mexico. *Folia Parasitologica*, 43, 141–152.
- Smales, L.R. (2013) A review of the genus *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Australia with the description of two new species. *Journal of Parasitology*, 99 (6), 1106–1112.
<http://dx.doi.org/10.1645/13-184.1>
- Steinauer, M.L., Nickol, B.B. & Ortí, G. (2007) Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology*, 16 (19), 4097–4109.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03462.x>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2731–2739.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (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 (22), 4673–4680.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Trujillo-Álvarez, R. (1995) *Fauna helmintológica de la “mojarra” Cichlasoma urophthalmus (Günther, 1862) en el sistema lagunar de Alvarado, Veracruz, México*. B.S. Thesis, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Jalapa, Veracruz, 60 pp.
- Velázquez-Silvestre, M.G. (1994) *Comparación de la fauna helmintológica de Gobiomorus dormitor (Lacepede: 1800) en tres localidades del Estado de Veracruz, México*. B.S. Thesis, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Jalapa, Veracruz, 92 pp.
- Vidal-Martínez, V.M. (1995) *Processes structuring the helminth communities of native cichlid fishes from southern Mexico*. Ph. D. Thesis, Faculty of Science, University of Exeter, Exeter, 164 pp.
- Vidal-Martínez, V.M., Aguirre-Macedo, M.L., Scholz, T., González-Solis, D. & Mendoza-Franco, E.F. (2001) *Atlas of the helminth parasites of cichlid fish of Mexico*. Academia, Praha, 165 pp.
- Vidal-Martínez, V.M. & Kennedy, C.R. (2000) Potential interactions between the intestinal helminths of the cichlid fish *Cichlasoma synspilum* from Southeastern Mexico. *Journal of Parasitology*, 86 (4), 691–695.
[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0691:PIBTIH\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0691:PIBTIH]2.0.CO;2)
- Vidal-Martínez, V.M., Kennedy, C.R. & Aguirre-Macedo, M.L. (1998) The structuring process of the macroparasite community of an experimental population of *Cichlasoma urophthalmus* through time. *Journal of Helminthology*, 72 (3), 199–207.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X00016448>
- Violante-González, J. & Aguirre-Macedo, L. (2007) Metazoan parasites of fishes from Coyuca Lagoon, Guerrero, Mexico. *Zootaxa*, 1531, 39–48.
- Violante-González, J., Aguirre-Macedo, L. & Mendoza-Franco, E. (2007) A checklist of metazoan parasites of fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Parasitology Research*, 102 (1), 151–161.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0733-2>
- Wilgenbusch, J.C., Warren, D.L. & Swofford, D.L. (2004) AWTY: A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference. Available from: <http://ceb.csit.fsu.edu/awty> (accessed 16 June 2015)
- Zaldivar-Riveron, A., Leon-Regagnon, V. & de Oca, A.N.M. (2004) Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 30 (1), 38–49.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00141-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00141-6)



4. DISCUSIÓN GENERAL

El grupo de endoparásitos del género *Neoechinorhynchus* representan un modelo excelente para explorar y probar diferentes hipótesis dirigidas a la delimitación de especies de helmintos parásitos en peces dulceacuícolas, marinos y estuarinos de la región de Centroamérica. Estos organismos se encuentran distribuidos en sus huéspedes definitivos, en sistemas hidrológicos particulares como ríos, lagos, lagunas, esteros, presas y arroyos, los cuales pueden actuar como barreras geográficas y a su vez restringen su dispersión impidiendo el flujo génico entre huéspedes (Pinacho-Pinacho et al. 2015). Por estas características se espera recuperar una alta diversidad de especies en *Neoechinorhynchus*, las cuales serían el reflejo tanto de los sistemas hidrológicos donde se distribuyen más la propia historia evolutiva de sus huéspedes. Por lo tanto, el objetivo central de este estudio fue inferir los límites entre especies del género *Neoechinorhynchus*, un grupo de parásitos ampliamente distribuidos en Centroamérica, parasitando una alta diversidad de huéspedes.

Relaciones filogenéticas y delimitación de especies en *Neoechinorhynchus*

Con base en caracteres morfológicos y moleculares, y particularmente de los análisis filogenéticos de secuencias de ADN se determinaron y describieron dos nuevas especies para la ciencia, *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León y García-Varela 2012, asociada a *Dormitator latifrons* en tres lagunas costeras del estado de Chiapas, México (Pinacho-Pinacho et al. 2012). La segunda especie descrita fue *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe y García-Varela 2014, la cual se describió de organismos recuperados del intestino de *Dormitator maculatus* en lagunas y ríos del Golfo de México (Pinacho-Pinacho et al. 2014). Con la descripción de estas dos nuevas

especies en Centroamérica, la diversidad de especies se incrementó a nueve (Pinacho-Pinacho et al. 2015). La importancia de este hallazgo se centra en la utilidad de caracteres moleculares y morfológicos para poder delimitar estos dos linajes en un grupo altamente diverso de acantocéfalos.

Con base en la revisión de ejemplares depositados en la Colección Nacional de Helminthos (CNHE) y ejemplares recolectados en este estudio se elaboró un listado taxonómico de todas las especies de *Neoechinorhynchus* en Centroamérica (Pinacho-Pinacho et al. 2015). Este listado de especies fue la herramienta base para enfocar el estudio de la delimitación de especies. Como resultado de este listado se incluye información de nueve especies de *Neoechinorhynchus* encontrados en 55 especies de peces, una especie de tortuga, para 87 localidades a lo largo de cinco países (México, Guatemala, Nicaragua, Honduras y Costa Rica). Adicionalmente a las nueve especies de *Neoechinorhynchus* formalmente descritas en Centroamérica, en este estudio basado en el análisis de reconstrucción filogenética y de diferentes métodos para delimitar especies como lo son, *General Mixed Yule-Coalescent* model (GMYC) y en distancias genéticas con el método *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD), y análisis de árboles de especies *Species Tree by Multispecies Coalescent* (*BEAST), encontramos que *Neoechinorhynchus* representa un complejo de especies crípticas que comprende al menos 10 linajes con evolución independiente, estrechamente relacionadas a los sistemas hidrológicos y a los huéspedes que parasitan.

El linaje 1 está restringido a la Península de Baja California asociado al pez estuarino *Dormitator latifrons*. El linaje 2, asociado al mismo pez que el linaje 1 pero distribuido en la parte continental de México, desde Topolobampo, Sinaloa hasta el Río Cuitzmala, Jalisco. El linaje 3, distribuido en el Río Coatzacoalcos y el Río Espino en el Golfo de México asociado a *Dormitator maculatus*. Los linajes 4 y 5, al igual que el

linaje 3 parasitan al mismo huésped, pero distribuidos en sistemas hidrológicos de la vertiente del atlántico en Costa Rica y Honduras respectivamente. Los linajes 6 y 7, se encontraron distribuidos en la vertiente del Océano Pacífico en el suroeste de México y sistemas hidrológicos de Guatemala asociados a *Dormitator latifrons*. El linaje 8, distribuido en sistemas hidrológicos dulceacuícolas de ambas vertientes de Costa Rica asociado a 6 especies de peces de la familia Cichlidae. El linaje 9, distribuido en dos presas del sistema hidrológico Grijalva-Usumacinta, asociado al cíclido *Vieja pearsei*. Finalmente el linaje 10 asociado a 5 especies de cíclidos dulceacuícolas distribuidos en el sureste de México.

Escenario geográfico y distribución parásito-huésped

Lo más interesante de este estudio se relaciona con la distribución de cada una de estas especies crípticas (linajes) y de sus huéspedes. El linaje 1 de este estudio fue registrado por primera vez como *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) golvani* por Méndez et al. (2010), en los oasis de Baja California Sur asociado a *Dormitator latifrons*. Interesantemente, este huésped es un pez estuarino que se distribuye en lagunas costeras del Océano Pacífico desde el Golfo de California hasta las Costas de Perú (Galván-Quesada et al. 2016). El linaje 2 se encontró asociado a este mismo huésped pero en la parte continental de México, en lagunas y ríos de los estados de Sinaloa, Nayarit y Jalisco. Recientemente, Monks et al. (2011) describieron a la especie *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) brentnickoli* en lagunas costeras de Guerrero y Sinaloa, sin embargo, con este estudio se determinó que esta especie solo esta distribuida entre los estados de Guerrero y Colima. Siguiendo sobre la distribución del mismo huésped, en este estudio encontramos el linaje 6 de una sola localidad en el

estado de Oaxaca. En un estudio previo Pinacho-Pinacho et al. (2012) describieron la especie *Neoechinorhynchus (N.) mamesi* en tres lagunas costeras de Chiapas del mismo huésped. Finalmente, en este estudio se encontró el linaje 7 del mismo huésped de una sola localidad en Guatemala. Con estos datos se demuestra que *Dormitator latifrons* distribuido en las costas del Océano Pacífico es parasitado por al menos 6 especies/y o linajes de *Neoechinorhynchus*, dos de estas formalmente descritas (Monks et al. 2011; Pinacho-Pinacho et al. 2012). Por otro lado, en un estudio previo de *Dormitator latifrons* a lo largo de su distribución geográfica mostró un solo linaje con bajos niveles de variación genética (Galván-Quesada et al. 2016).

El linaje 3 se encontró asociado a *Dormitator maculatus* en lagunas y ríos de los estados de Veracruz y Tabasco. La distribución de este pez estuarino abarca lagunas costeras de la vertiente del Océano Atlántico desde la Florida en Estados Unidos hasta las costas de Brasil. Sin embargo, un estudio reciente demostró que este pez representa dos linajes, uno en el Golfo de México y el otro en el mar Caribe (Galván-Quesada et al. 2016). Pinacho-Pinacho et al. (2014) describieron a *Neoechinorhynchus (N.) mexicoensis* en el Río Papaloapan Veracruz del mismo huésped. El linaje 4 de este estudio se recolectó de una sola localidad en la costa atlántica de Costa Rica. Finalmente, el linaje 5 se recolectó de una sola localidad en Honduras. En contraste a *Dormitator latifrons* distribuido en las costas del Pacífico, *Dormitator maculatus* distribuido en las zonas costeras del Atlántico se encontró parasitado por al menos 4 especies/y o linajes de *Neoechinorhynchus*, estando solo una de estas formalmente descrita (Pinacho-Pinacho et al. 2014).

Los linajes 8, 9 y 10 están estrechamente relacionados a sus huéspedes de la familia Cichlidae en Centroamérica. Teniendo en cuenta que existen más de 120 especies de cíclidos y que la diversificación de este grupo es uno de los más complejos

en todo Centroamérica (Concheiro-Pérez et al. 2007; Říčan et al. 2008). Existen diferentes escenarios posibles sobre la colonización de los cíclidos en Centroamérica dependiendo del autor, los cuales son: 1) varios autores han apoyado una colonización a mitad del Cenozoico (Concheiro Pérez et al. 2007; Hulsey et al. 2010, 2011); 2) una colonización masiva en el Cretácico-Paleoceno (Chakrabarty 2006), y 3) dos colonizaciones de Centroamérica, una hacia las Antillas mayores se produjo de Sudamérica dentro de un corto periodo de tiempo durante el Oligoceno y la otra colonización de Centroamérica se produjo en el Mioceno (inferior-medio). Centroamérica después se fragmentó en varias ocasiones durante la segunda mitad del Mioceno, lo que llevó a la formación de las actuales provincias ictiológicas, antes del cierre final del Istmo de Panamá (Říčan et al. 2013). Teniendo en cuenta esta información nos podemos plantear las siguientes preguntas; ¿cómo afectó este proceso de diversificación de los cíclidos a los parásitos del género *Neoechinorhynchus*?; ¿el ancestro común de los cíclidos que colonizaron Centroamérica ya tendrían su *Neoechinorhynchus* o estos parásitos los adquirieron después de la colonización?. Las respuestas a estas preguntas probablemente se podrían obtener a partir de las especies de *Neoechinorhynchus* asociados a cíclidos africanos y de Sudamérica. Adicionalmente a estos 3 linajes, *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) panucensis* y *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) golvani* son la fauna principal de los peces de la familia Cichlidae. Por lo tanto, con este estudio se demuestra que los cíclidos son parasitados por al menos 5 especies /y o linajes en Centroamérica.

De manera general se puede observar que la distribución geográfica de cada especie /y o linaje de *Neoechinorhynchus* están asociadas con diferentes barreras biogeográficas que fragmentaron los diferentes sistemas hidrológicos en Centroamérica y que en algunas ocasiones también influenciaron en la distribución de sus huéspedes

por eventos de vicarianza. Por ejemplo, la separación del linaje 1 está asociada con el evento geológico que separó la Península de Baja California del resto del continente. Otro ejemplo es la divergencia entre *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) panucensis* y *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) golvani*, linajes 8, 9 y 10, la cual está estrechamente relacionada al surgimiento del eje neovolcánico y la separación del clado *Herhycthis* del resto de los cíclidos de Centroamérica.

Literatura citada

- Concheiro-Pérez G. A., O. Rican, G. Ortí, E. Bermingham, I. Doadrio y R. Zardoya. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43**: 91–110.
- Chakrabarty P. 2006. Systematics and historical biogeography of Greater Antillean Cichlidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**: 619–627.
- Galván-Quesada S., I. Doadrio, F. Alda, A. Perdices, R. G. Reina, M. García Varela, N. Hernández, A. Campos Mendoza, E. Bermingham y O. Domínguez-Domínguez. 2016. Molecular phylogeny and biogeography of the amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). PLOS ONE DOI: 10.1371/journal.pone.0153538.
- Hulsey C. D., B. P. Keck y P. R. J.r. Hollingsworth. 2011. Species tree estimation and the historical biogeography of heroine cichlids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**: 124–131.
- Hulsey C. D., P. R. Jr. Hollingsworth y J.A. Fordyce. 2010. Temporal diversification of Central American cichlids. *BMC Evolutionary Biology*, **10**: 279.

- Méndez O., G. Salgado-Maldonado, J. M. Caspeta-Mandujano y G. Cabañas-Carranza. 2010. Helminth parasites of some freshwater fishes from Baja California Sur, Mexico. *Zootaxa*, **2327**: 44–50.
- Monks S., G. Pulido-Flores y J. Violante-González. 2011. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Dormitator latifrons* (Perciformes: Eleotridae) from the Pacific Coast of Mexico. *Comparative Parasitology*, **78**: 21–8.
- Pinacho-Pinacho C. D., A. L. Sereno-Uribe y García-Varela M. 2014. Morphological and molecular data reveal a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from *Dormitator maculatus* in the Gulf of Mexico. *Parasitology International*, **63**: 763–771.
- Pinacho-Pinacho C. D., A. L. Sereno-Uribe, G. Pérez-Ponce de León y M. García-Varela. 2015. Checklist of the species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in fishes and turtles in Middle-America, and their delimitation based on sequences of the 28S rDNA. *Zootaxa*, **3985**: 098–116.
- Pinacho-Pinacho C. D., G. Pérez-Ponce De León y M. García-Varela. 2012. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International*, **61**: 634–644.
- Říčan O., I. Piálek, R. Zardoya, I. Doadrio y J Zrzavý. 2013. Biogeography of the Mesoamerican Cichlidae (Teleostei: Heroini): colonization through the GAARlandia land bridge and early diversification. *Journal of Biogeography*, **40**: 579–593.

Říčan O., R. Zardoya y I. Doadrio. 2008. Phylogenetic relationships of Middle American cichlids (Cichlidae, Heroini) based on combined evidence from nuclear genes, mtDNA, and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**: 941–957.



5. CONCLUSIONES GENERALES

- El género *Neoechinorhynchus* es el grupo más diverso de acantocéfalos con más de 116 especies con una distribución cosmopolita, en este estudio para una pequeña área como Centroamérica la diversidad fue inesperada encontrándose al menos 10 especies putativas (linajes), duplicándose en número las nueve especies descritas previamente para esta región.
- De las nueve especies formalmente reconocidas en Centroamérica, *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León y García-Varela 2012 y *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe y García-Varela 2014, fueron descritas como parte de esta tesis doctoral.
- *Neoechinorhynchus* representa un complejo de especies crípticas que comprende 10 linajes con evolución independiente, estrechamente relacionadas a los sistemas hidrológicos y a las especies de huéspedes que parasitan.
- El pez estuarino *Dormitator latifrons* se distribuye en lagunas costeras del Océano Pacífico desde el Golfo de California hasta las Costas de Perú, en este estudio se encontró que este pez es parasitado por *Neoechinorhynchus* (*N.*) *brentnickoli* y *Neoechinorhynchus* (*N.*) *mamesi* y por al menos otras cuatro especies crípticas (linajes 1, 2, 6 y 7).
- *Dormitator maculatus* es otro pez estuarino que se distribuye en las lagunas costeras de la vertiente del Océano Atlántico desde la Florida en Estados Unidos hasta las costas de Brasil, con este estudio se demuestra que esta especie de pez es parasitada por *Neoechinorhynchus* (*N.*) *mexicoensis* y tres especies crípticas (linajes 3, 4 y 5).

- Peces de la familia Cichlidae es el grupo de mayor radiación en Centroamérica con más de 120 especies. Actualmente, *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) panucensis* y *Neoechinorhynchus (N.) golvani* son especies representativas de esta familia. En este estudio se encontraron al menos otras tres especies crípticas (linajes 8, 9 y 10), asociadas a estos peces dulceacuícolas.
- De acuerdo a los patrones de distribución y los procesos de especiación en *Neoechinorhynchus* spp. pudimos observar que estos están estrechamente relacionados a los sistemas hidrológicos (cuencas hidrológicas, lagos cerrados, y lagunas costeras), a las especies de huéspedes definitivos como intermediarios (especies de peces, especies de ostrácodos) y a las características ecológicas (salinidad vs agua dulce).
- Los procesos de variación morfológica en el género son conservados, ya que de los nueve linajes detectados, solo uno (linaje 8) fue morfológicamente diferente.



6. APÉNDICES

6. 1. Apéndice 1

Un enfoque coalescente en la delimitación de especies en endoparásitos con complejos ciclos de vida: Un ejemplo en un grupo hiper-diverso (Acanthocephala, Neoechinorhynchidae, *Neoechinorhynchus*) en Centroamérica

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho y Martín García-Varela

En preparación

Un enfoque coalescente en la delimitación de especies en endoparásitos con complejos ciclos de vida: Un ejemplo en un grupo hiper-diverso (Acanthocephala, Neoechinorhynchidae, *Neoechinorhynchus*) en Centroamérica

CARLOS DANIEL PINACHO-PINACHO^{1,2}, MARTÍN GARCÍA-VARELA²

¹ *Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México;*

² *Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-153, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510, México*

RESUMEN

La delimitación de especies es uno de los temas centrales en biología evolutiva para reconocer, describir y estimar la diversidad biológica del planeta. Con el avance en los métodos de delimitación de especies ha sido posible poner a prueba las hipótesis taxonómicas a fin de generar propuestas robustas. El presente estudio tiene como objetivo investigar la diversidad y los límites entre especies del género *Neoechinorhynchus* en Centroamérica, un grupo de endoparásitos ampliamente distribuidos en peces dulceacuícolas, marinos, estuarinos y tortugas dulceacuícolas. Se llevó a cabo el muestreo en una amplia diversidad de sistemas hidrológicos (ríos, lagos, lagunas, esteros y arroyos), los huéspedes fueron revisados para obtener tejidos de diferentes especies de *Neoechinorhynchus*. Se amplificaron y secuenciaron 351 especímenes para el gen citocromo oxidasa 1 (COI), 329 especímenes para los espaciadores transcritos internos (ITS1+5.8S+ITS2) y 277 especímenes para los dominios D2+D3 de la subunidad mayor (28S). La delimitación de especies se realizó mediante dos enfoques: como primer paso se

obtuvo un árbol guía para el gen citocromo oxidasa 1 de todos los ejemplares secuenciados (n=351), el cual fue evaluado por diferentes métodos de delimitación de especies (ABGD, GMYC), como segundo enfoque el alineamiento de COI fue recortada y combinada con las otras bases de datos (COI+ITS+28S) en 203 ejemplares para obtener un segundo árbol guía mediante un análisis de árbol de especies (*species tree* en *BEAST). La evaluación morfológica de los especímenes se realizó sobre la longitud de los ganchos apicales, medios y posteriores de la proboscis ya que estos son caracteres diagnósticos para diferenciar a las especies, se realizaron análisis multivariado de varianza (MANOVA) y componentes principales (PCA). Los resultados mostraron que adicionalmente a las nueve especies descritas morfológicamente en Centroamérica, otras 10 especies putativas (linajes) fueron diagnosticadas basadas en ambos arboles guía. Por lo tanto, se concluye que con datos basados en los métodos para la delimitación de especies más análisis estadísticos morfológicos mostraron que el género *Neoechinorhynchus* en Centroamérica es un grupo hiper-diverso conformado por varias especies crípticas. En este estudio se encontraron al menos nueve especies crípticas y una especie morfológicamente distinta (linaje 8) asociados a especies de peces estuarinos del género *Dormitator* y peces dulceacuícolas de la familia Cichlidae.

INTRODUCCIÓN

Los acantocéfalos del género *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall, 1905 son endoparásitos de peces dulceacuícolas, marinos y estuarinos, así como de anfibios y tortugas dulceacuícolas. Estos parásitos son considerados uno de los géneros más diversos dentro del phylum Acanthocephala con aproximadamente 116 especies descritas con una distribución cosmopolita (Amin 2013; Smales 2013). En total 49 especies se han descrito

para el continente americano, 33 especies para Norteamérica y 16 para Centro y Sudamérica (Amin 2002; Barger et al. 2004; Amin y Heckmann 2009; Pinacho-Pinacho et al. 2012; Salgado-Maldonado 2013).

Particularmente, en México nueve especies del género *Neoechinorhynchus* se han descrito, dos de estas especies parasitan tortugas dulceacuícolas; *N. (N.) schmidti* Barger, Thatcher y Nickol, 2004 y *N. (N.) emyditoides* Fisher, 1960; y las otras siete ocurren en peces dulceacuícolas, marinos y estuarinos; *N. (N.) roseum* Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) golvani*, Salgado-Maldonado 1978; *N. (N.) chimalapasensis* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano y Martínez-Ramírez, 2010; *N. (N.) brentnickoli* Monks, Pulido-Flores y Violante-González, 2011; *N. (N.) mamesi* Pinacho-Pinacho, Pérez-Ponce de León y García-Varela, 2012, *N. (N.) panucensis* Salgado-Maldonado 2013, y *N. (N.) mexicoensis* Pinacho-Pinacho, Sereno-Uribe y García-Varela, 2015 (Pinacho-Pinacho et al. 2012; Salgado-Maldonado 2013).

Probablemente en acantocéfalos el método más usado para delimitar especies es basado en distancias genéticas (distancias p), que corresponde con el porcentaje de diferencias genéticas pareadas entre grupos de especies, todo esto apoyado por análisis filogenéticos donde una especie es diagnosticada como un clado. Sin embargo, en la última década han surgido múltiples métodos para delimitar especies (ver Camargo y Sites 2013). Estos métodos de delimitación disponibles son poco explorados en la delimitación de especies de diferentes grupos de parásitos, aunque sobresalen solo algunos estudios en trematodos (Martínez-Aquino et al. 2013; Herrmann et al. 2014; Blasco-Costa et al. 2014; Locke et al. 2015a, b). En este estudio el objetivo es explorar los límites entre especies del

género *Neoechinorhynchus*, un grupo de acantocéfalos ampliamente distribuidos en Centroamérica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de las muestras

Todos los huéspedes definitivos de acantocéfalos del género *Neoechinorhynchus* fueron capturados en México, Guatemala, Honduras y Costa Rica durante diversas salidas de campo en un periodo del 2012-2016. Peces y tortugas de 57 localidades fueron capturados con artes de pesca como chinchorro, atarraya, redes de enmalle y electropesca (Tabla 1). El material helmintológico se recolectó del intestinos de peces de la familia Eleotridae (principalmente de la especies *Dormitator latifrons* y *D. maculatus*) distribuidos en las vertiente del océano Pacífico y del océano Atlántico respectivamente. Adicionalmente se recolectaron parásitos del intestino de peces de las familias Cichlidae (principalmente especies de los géneros: *Paraneetroplus* spp., *Cichlasoma* spp., *Parachromis* spp., *Herichthys* spp., *Vieja* spp., *Thorichthys* spp.); Achiridae (*Achirus mazatlanus*); Gobiidae (*Awaous banana*) y de tortugas dulceacuícolas de la familia Emydidae (*Trachemys scripta*). A los huéspedes se les practicó una disección sobre la superficie ventral. Posteriormente se extrajo el intestino y se revisó bajo el microscopio estereoscópico en busca de acantocéfalos. Los acantocéfalos recuperados se fijaron de dos maneras: un grupo de ejemplares se colocaron en viales con agua destilada a 4°C durante 24 h, para posteriormente ser fijados en etanol al 70%. Otro grupo de parásitos se colocaron directamente en criotubos con etanol absoluto, método que permite la adecuada conservación del organismo y del material genético. Los parásitos fijados al 70% se usaron

para realizar preparaciones permanentes para su identificación morfológica. Para la identificación taxonómica, todas las muestras fueron teñidas con Paracarmín de Mayer, deshidratados en series graduales de etanol, aclarados con salicilato de metilo y se montaron en portaobjetos permanentes con bálsamo de Canadá. Las preparaciones permanentes de los ejemplares se depositaron en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología, UNAM.

Tabla 1. Información de los especímenes: número de sitios de colecta (CS), especies de parásitos colectados, número de organismo secuenciados (N), huéspedes registrados, localidades muestreadas (código), números de DNA secuenciados para el 28S, números de DNA secuenciados para ITSs, números de DNA secuenciados para COI, y números de especímenes depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE).

CS	Especies/Linaje de Parásitos	N	Huéspedes	Localidades (código)	LSU	ITS	COI	CNHE
1	Linaje 1	3	<i>Dormitator latifrons</i>	Todos los Santos, Baja California Sur, México (TLSB)	1025 1026 1027	1025 1026 1027	XX	
2	Linaje 1	5	<i>D. latifrons</i>	Oasis San José del Cabo, Baja California Sur, México (OBCS)	1020 1021 1022 1023 1024	1020 1021 1022 1023 1024	1020 1022 1023	8586
3	Linaje 2	4	<i>D. latifrons</i>	Topolobampo, Sinaloa, México (TOSI)	660 661 662 663	660 661 662 663	660 661 662 663	
4	Linaje 2	9	<i>D. latifrons</i>	El Huizache, Sinaloa, México (WISI)	1015 1016 1017 1018 1019	1015 1016 1017 1018 1019	1015 1016 1017 1018 1019 1555 1556 1558 1559	8587
5	Linaje 2	9	<i>D. latifrons</i>	Vía Ferrea, Escuinapa, Sinaloa, México (ESSI)	1010 1011 1012 1013 1014	1010 1011 1012 1013 1014	1010 1011 1012 1013 1014 1560 1561 1563 1564	8588
6	Linaje 2	8	<i>D. latifrons</i>	Nuevo Vallarta, Nayarit, México (NVNA)	866	866	866	

					867 868 869 870	867 868 869 870	867 868 869 870 1551 1552 1554	
7	Linaje 2	6	<i>D. latifrons</i>	Estero Chamela, Jalisco, México (CHJA)	176 (FJ388990) 876 877 878 879 880	176 876 877 878 879 880	876 877 878 879 880	8589
8	Linaje 2	1	<i>D. latifrons</i>	Río Cuitzmala, Jalisco, México (CUJA)	73 (FJ388989)	73	73	
9	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Cuyutlan, Colima, México (LCCO)	871 872 873 874 875	871 872 873 874 875	871 872 873 874 875 1546 1547 1548 1549 1550	
10	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Boca de Apiza, Michoacán, México (BAMI)	694 695 696 697 698 699 700 701 702 703	694 695 696 698 699 700 701 702 703	694 695 696 697 698 699 700 701 702 703	8176
11	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Estero Huahua, Michoacán, México (EHMI)	674 675 676 677 678	674 675 676 677 678	674 675 676 677 678 679 680 681 682 683	8177
12	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Estero Mexcalhuacan, Michoacán, México (EMMI)	664 665 666	664 665 666	664 665 666	8173

					667 668	667 668	667 668 669 670 671 672 673	
13	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Estero Barra de Pichi, Michoacán, México (EBPM)	684 685 686 687 688	684 685 686 687 688	684 685 686 687 688 689 690 691 692 693	8174
14	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Coyuca, Guerrero, México (LCGU)	650 651 652 653 654 655 656 657 658 659	651 654 655 656 657 658	650 651 652 653 654 655 656 657 658 659	8175
15	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Laguna de Tres Palos, Guerrero, México (LTGU)	71 274 275 276 278 279 280 281 282 283	71 274 275 276 278 279 280 281 282 283	71 274 275 276 278 279 280 281 282 283	8178
16	<i>N. (N.) brentnickoli</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Río Tamarindo, Chautengo, Guerrero, México (RTCG)	714 715 716 717 718	714 715 716 717 718	714 715 716 717 718 719 720 721 722 723	8179

17	<i>N. (N.) roseum</i>	3	<i>Achirus mazatlanus</i>	Laguna el Caimanero, Sinaloa, México (LCSI)	212 (FJ388999)	212 1378 1379	212	6762 633 634
18	<i>N. (N.) roseum</i>	3	<i>Citharichthys gilberti</i>	Estero La Tovar, Nayarit, México (ETSI)	211 (FJ389000)	211 1387 1388	211	6763
19	Linaje 6	11	<i>D. latifrons</i>	Puente Manialtepec, Oaxaca, México (PMOA)	1989 1990 1991	1989 1990 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429	1990 1991 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426	
20	<i>N. (N.) mamesi</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Estero Joaquin Amaro, Chiapas, México (EJCH)	762 763 768 769 770	762 763 768 769 770	762 763 764 765 766 767 768 769 770 771	8183
21	<i>N. (N.) mamesi</i>	10	<i>D. latifrons</i>	Laguna la Conquista, Chiapas, México (LCCH)	752 753 755 756	752 753 754 755 756	752 753 754 755 756 757 758 759 760 761	8184
22	<i>N. (N.) mamesi</i>	9	<i>D. latifrons</i>	Laguna Rion Pijijiapan, Chiapas, México (LRPC)	 730 732 733	 729 731 732 733	724 725 727 728 729 730 731 732 733	8180, 8181, 8182

23	<i>N. (N.) mamesi</i>	5	<i>D. latifrons</i>	Quebrada Ganados, Costa Rica (QGCR)	1686 1687	1686 1687 1688 1689 1690	XX	8590
24	Linaje 4	12	<i>D. maculatus</i>	Playa Grande, Costa Rica (PGCR)	1713 1714	1713 1714 1716 1717 2412 2413 2415 2416 2417 2418 2419	1713 1714 1716 1717 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419	8191
25	Linaje 7	6	<i>D. latifrons</i>	Las Lisas, Guatemala (LLGU)	2102 2103 2106	2101 2102 2103 2104 2105 2106	2101 2102 2103 2104 2105 2106	
26	Linaje 5	6	<i>D. maculatus</i>	Las Brisas del Chamalecon Honduras (LBCH)	2106 FALSO	2487 2488 2489 2490 2491	2488 2490 2491	
27	Linaje 8	2	<i>Parachromis managuensis</i>	Lago Jalapa, Costa Rica (LJCR)	1697	1696 1697	1697	
	Linaje 8	2	<i>Parachromis loisellei</i>	Lago Jalapa, Costa Rica (LJCR)	1698 1699	1698 1699	1698 1699	
	Linaje 8	4	<i>Amphilophus longimanus</i>	Lago Jalapa, Costa Rica (LJCR)	1700 1701	1700 1701 1702 1703	1700 1701 1702 1703	8592
	Linaje 8	6	<i>Heterotilapia multiespinosa</i>	Lago Jalapa, Costa Rica (LJCR)	1704	1704 1705 1706	1704 1705 1706 1707 1708 1709	
	Linaje 8	2	<i>Archocentrus centrarchus</i>	Lago Jalapa, Costa Rica (LJCR)	1710 1711	1711 1712	1710 1711 1712	
28	Linaje 8	2	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Quebrada Puercos, Costa Rica (QPCR)	72 (FJ388998) 786	72	72 786	6757

29	<i>N. (N.) golvani</i>	2	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	Las Lisas, Guatemala (LLGU)	XX	XX	2400 2401	
30	Linaje 10	5	<i>Thorichthys meeki</i>	Hool, Campeche, Mexico (HOCM)	1785 1786 1787 1788	1784 1785 1786 1787 1788	1784 1785 1786 1787 1788	
31	Linaje 10	3	<i>Thorichthys helleri</i>	La Libertad, Campeche, Mexico (LLCM)	XX	2377 2378 2379	2377 2378 2379	
	Linaje 10	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	La Libertad, Campeche, Mexico	XX	2374 2375	2373 2374 2375	
	Linaje 10	1	<i>Petenia splendida</i>	La Libertad, Campeche, Mexico	XX	2376	2376	
32	Linaje 9	11	<i>Vieja pearsei</i>	Presa Chicoasen, Chiapas, México (PCCH)	207 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303	207 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303	207 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303	6755
33	Linaje 9	6	<i>Vieja pearsei</i>	Presa Nezahualcoyolt, Chiapas, México (PNCH)	209 380 381 382 607	209 380 381 382 607 608	209 380 381 382 607 608	6756
34	Linaje 10	3	<i>Petenia splendida</i>	Metzabok, Chiapas, Mexico (MZCM)	XX	2364	2362 2363 2364	
	Linaje 10	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Metzabok, Chiapas, Mexico	XX	2358 2359	2358 2359 2360	
35	Linaje 10	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	El Ocotolito, Chiapas, Mexico (EOCM)	XX	2384 2383 2385	2384 2383 2385	
	Linaje 10	3	<i>Petenia splendida</i>	El Ocotolito, Chiapas, Mexico	XX	2380	2380 2381 2382	
36	Linaje 10	3	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Naha, Chiapas, Mexico (NHCM)	XX	2370 2368 2369	2370 2368 2369	

	Linaje 10	3	<i>Paraneetroplus synspilus</i>	Naha, Chiapas, Mexico	XX	2365 2366 2367	2365 2366 2367	
	Linaje 10	2	<i>Petenia splendida</i>	Naha, Chiapas, Mexico	XX	2371	2371 2372	
37	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Presa Temascal, Oaxaca, Mexico (PTOM)	1318 1319 1320 1321 1322	1318 1320 1321	1321 1322	8593
	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>Cichlasoma salvini</i>	Presa Temascal, Oaxaca, Mexico	1313 1314 1315 1316 1317	1315 1317	xx	8594
38	Linaje 10	11	<i>Parachromis friedrichstali</i>	Lago Canitzan, Tenosique, Tabasco, México (LCTT)	156 336 337 338 339 340 602 603 604 605 606	156 336 337 338 339 340 602 603 604 605 606	156 336 337 338 339 340 603 604 605 606	6767
39	Linaje 10	10	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Río Carrizal, Tabasco, México (RCTA)	121 304 305 306 307 308 309 310 316 317	121 304 305 306 307 309 310 316 317	121 304 305 306 307 309 310 316 317	6754
40	Linaje 10	4	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Lago las Ilusiones, Tabasco, México (LITA)	169 378 379	169 378 379	169 378 379 397	
41	Linaje 10	5	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Emiliano Zapata, Tabasco, México (EMZT)	1778 1779 1780 1781 1782	1778 1779 1780 1781 1782	1778 1779 1780 1781 1782	8595
42	<i>N. (N.) golvani</i>	11	<i>Paraneetroplus fenestratus</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México (LCAT)	70 284	70 284	70 284	601, 603, 604, 606,

					285 286 287 288 289 290 291 292 293	285 287 288 289 290 291 292 293	285 286 287 288 289 290 291 292 293	631, 632 6783
	<i>N. (N.) golvani</i>	5	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México	XX	XX	1323 1324 1325 1326 1327	
	<i>N. (N.) golvani</i>	4	<i>Thorichthys ellioti</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México	XX	XX	1328 1329 1331 1332	
43	<i>N. (N.) panucensis</i>	1	<i>Herichthys</i> sp.	Río Pantepec, Veracruz, México (RPVE)	704	704	704	
44	<i>N. (N.) panucensis</i>	3	<i>Herichthys cyanoguttatus</i>	Axtlan de Terrazas, San Luis Potosí, México (ATVE)	213 383 384	213 383 384	XX	6758
45	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Laguna de Tamiahua, Veracruz, México (LTVE)	921 922 923 924 925	921 922 923 924 925	XX	8334
46	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	6	<i>D. maculatus</i>	Laguna de Alvarado, Veracruz, México (LAVE)	206 321 322 323 324 325	206 321 322 323 324 325	321 322 323 324 325	6760
47	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México (RPTL)	1363 1364 1365	1363 1364 1365 1366 1367	1363 1365 1366 1367	8673, 8332, 8333
	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	6	<i>Cichlasoma urophthalmum</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	155 174 311 312 313 314	155 174 311 312 313 314	311 312 313 314	6759
48	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Río la palma, Veracruz, México (RPVE)	1343 1344 1345	1343 1344 1345	XX	8596

						1346 1347		
49	<i>N. (N.) mexicoensis</i>	5	<i>D. maculatus</i>	Laguna de Sontecomapa, Veracruz, México (LSVE)	1333 1334 1335 1336 1337	1333 1334 1335 1336 1337	XX	8597
50	Linaje 3	7	<i>D. maculatus</i>	Río Coatzacoalcos, Veracruz, México (RCVE)	1353 1354 1355 1356 1357	1353 1354 1355 1356 1357	1353 1357 1358 1359 1360 1361 1362	8598
51	Linaje 3	5	<i>D. maculatus</i>	Río Espino, Tabasco, México (RETA)	1368 1369 1370 1371 1372	1368 1369 1370 1371 1372	1372 1376	
	Linaje 3	4	<i>Petenia splendida</i>	Río Espino, Tabasco, México	120 507 508 509	507 508 509	XX	
52	Linaje 3	5	<i>D. maculatus</i>	El Milagro, Campeche, México	1789 1790 1791 1792 1793	1789 1790 1791 1792 1793	XX	8599
53	<i>N. (N.) schmidti</i>	5	<i>Trachemys scripta</i>	Pantanos de Centla, Tabasco, México	210 609 610 611 612	210 609 610 611 612	XX	6764
54	<i>N. (N.) emyditoides</i>	9	<i>Trachemys scripta</i>	Lago de Catemaco, Veracruz, México	331 332 333 334 335 450 451 452 453	331 332 333 334 335 451 452 453	331 332 333 334 335 450 451 452	6737
55	<i>N. (N.) emyditoides</i>	9	<i>Trachemys scripta</i>	Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	326	326	326	6695

				(RPVE)	327 328 329 330 439 440 441 442	327 328 329 330 439 440 441 442 446	327 328 329 330 439 440 441 442 446	
56	<i>N. (N.) emyditoides</i>	9	<i>Trachemys scripta</i>	Presa la Herradura, Monterrey, México (PHMN)	362 363 364 365 454 455 456 457	361 362 363 364 365 454 455 456 457	361 362 363 364 365 454 456 457	6696
57	<i>N. (N.) chimalapasensis</i>		<i>Awaous banana</i>	Río Negro, Santa María Chimalapa, Oaxaca, México (RNCH)	2187 2188	2187 2188	2187 2188	5018=1, 5019=1, 5020=12

Especies de parásitos muestreadas

Los huéspedes fueron identificados utilizando las claves de Miller et al. (2005). Un espécimen de la especie *Floridosentis mugilis* Machado Filho 1951 fue utilizado como grupo externo en los análisis filogenéticos. Especies del género *Neoechinorhynchus* recolectadas durante esta investigación fueron identificadas siguiendo las claves de Amin (2002) y con las descripciones originales más recientes (por ejemplo, Pinacho-Pinacho et al. 2012; Salgado-Maldonado 2013).

Amplificación y secuenciación de ADN

Los gusanos colectados se incubaron a 56°C en una solución con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na₂ EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl, y 0.1 mg/ml de proteinasa K. El DNA se extrajo del sobrenadante usando el reactivo DNAzol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante). Para un total de 351 organismos de *Neoechinorhynchus* spp., a lo largo de su distribución en México y partes de Centroamérica, parte del gen mitocondrial (COI) y de los espaciadores transcritos internos (ITS1, 5.8S, ITS2) y los dominios (D2+D3) del 28S ribosomal) fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un fragmento del gen mitocondrial, citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) se amplificó utilizando el primer forward 5'-AGTTCTAATCATAA (R) GATAT (Y) GG-3' y el primer reverse 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'. Sin embargo, primers específicos fueron diseñadas para algunas de las especies (Ver Pinacho-Pinacho et al. 2012). La región de los ITS se amplificó utilizando el primer forward BD1 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3' y el primer reverse BD2 5'-ATCTAGACCGGACTAGGCTGTG-3' (Bowles et al. 1995). Los dominios (D2 + D3) del

28S ribosomal fueron amplificados utilizando el primer forward 502 5' - CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' y el primer reverse 536 5'- GTCGATAGGACTCCCTTTG-3' (García-Varela y Nadler 2005). Las reacciones de PCR (25µl) consistieron en 10µM de cada primer, 2.5µl de buffer 10x, 2 mM de MgCl₂, y 1U de Taq ADN polimerasa (Taq Platinum, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brasil). Parámetros de los ciclos de la PCR para amplificaciones de los espaciadores transcritos internos (ITS1+5.8S+ITS2) y Dominios (D2+D3) del 28S ribosomal incluyeron desnaturalización a 94° C durante 1 min, seguido por 35 ciclos de 94° C durante 1 min, alineamiento a 50° C durante 1 min, y una extensión a 72° C durante 1 min, seguido de una incubación posterior a la amplificación en 72° C durante 10 min. Condiciones de la PCR para la amplificación del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) fueron desnaturalización a 94° C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 94° C durante 1 min, alineamiento a 40-50° C durante 1 min, (dependiendo de la especie de *Neoechinorhynchus*) y una extensión a 72° C durante 1 min, seguido de una incubación post-amplificación a 72° C durante 10 min. Los productos amplificados por PCR fueron separados y observados en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio al 1% en un buffer de Tris-Boratos, para posteriormente ser purificados y secuenciados usando primer internos. Los electroferogramas derivados de las reacciones de secuenciación se exportarán al programa de cómputo Codoncode, en donde se evaluó cada uno de los picos del electroferogramas.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas para cada uno de los genes fueron ensambladas en una secuencia consenso con el programa CodonCode (<http://www.codoncode.com/>). Posteriormente las secuencias consenso fueron alineadas con el programa ClustalW

(Thompson et al., 1994) y editadas manualmente con el programa MacClade (Madison y Madison 2002). Para los análisis filogenéticos el primer paso fue estimar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para cada una de las base de datos de todos los genes, así como la distribución gamma y el parámetro de la tasa de heterogeneidad entre sitios, los cuales se calcularon con el programa jModeltest (Posada 2008) de acuerdo al criterio de información de Akaike (AIC). Se realizaron análisis filogenéticos con dos métodos, máxima verosimilitud (ML) con el programa RaxML (Stamatakis 2006) e inferencia bayesiana (IB) con el programa MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Para los análisis de máxima verosimilitud el programa RaxML se utilizó, el modelo generado a partir de programa jModeltest se implementó en RaxML para cada una de los alineamientos (modelos menos complejos que el GTR no es posible implementar en RAXML). El apoyo de los nodos fue evaluado mediante 10,000 réplicas de bootstrap.

La estimación de árboles filogenéticos con inferencia bayesiana se realizó con el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Se realizaron dos corridas simultáneas con cuatro cadenas (una fría y tres calientes) para cada corrida. *Metropolis-coupling Markov chain Monte Carlo (MCMCMC = MC³)* se corrieron para 100 millones de generaciones, con un muestreo cada 10000 generaciones, y árboles del inicio fueron eliminados por un burnin del 25%. Los archivos de salidas de MrBayes fueron examinados con el programa Tracer v1.4 (Rambaut y Drummond 2007) para evaluar si hubo convergencia de los diferentes parámetros, determinar el número aproximado de generaciones a la que los valores de probabilidad se estabilizaron, identificar el tamaño efectivo de la muestra (EES) para cada parámetro, y la magnitud estimada de los parámetros del modelo en las corridas individuales y combinados. El primer 25% de

MCMCs se verificó para incluir todas las generaciones donde las cadenas habían alcanzado un estado estacionario. Probabilidades posteriores (PP) de los clados se obtuvieron del 50% del consenso de mayoría en los árboles después de excluir el 25% como burnin.

Delimitación de especies

La delimitación de especies se realizó mediante dos estrategias: a) como primer paso se obtuvo un **árbol guía del gen COI** con todas las muestras (n=351). Este primer árbol (IB) fue sometido al modelo GMYC (Pons et al. 2006) el cual estima la transición de coalescencia en patrones de ramificación de la especiación en un árbol ultramétrico bayesiano. Resumiendo, el método identifica el punto más probable (umbral) donde hay una transición en las tasas de ramificación (dentro y entre las especies) y compara la probabilidad del modelo de GMYC con un modelo nulo asumiendo que todas las secuencias se derivan de una sola especie (Pons et al. 2006). Se utilizó el árbol obtenido del análisis de inferencia bayesiana (BI) del (COI) el cual fue transformado en un árbol ultramétrico, totalmente dicotómico (politomias se resolvieron utilizando ramas de longitud cero) utilizando Mesquite v 1.12 (Maddison y Maddison 2011). Se identificaron las especies putativas utilizando el modelo de un solo y múltiples umbrales GMYC, implementada por SPLITS en el programa R (Species' Limits by Threshold Statistics versión 2.10 (<https://r-forge.r-project.org/projects/splits/>)).

Adicionalmente el alineamiento de COI fue sometido al método ABGD (Puillandre et al. 2012), el cual busca automáticamente la distancia a la que se produce un gap de código de barras y ordena las secuencias en especies putativas sobre la base de esta distancia (Puillandre et al. 2012). En otras palabras, el método deduce estadísticamente la diferencia de códigos de barras de los datos y particiones de los datos en consecuencia.

Alineamiento del (COI) fue subido a la página siguiente (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) y el método ABGD se ejecutó con la configuración predeterminada ($P_{min} = 0.001$, $P_{max} = 0.1$, Steps = 10, X (relative gag width) = 1.5, Nb bins= 20) y con distancias K2P.

b) como segunda estrategia se obtuvo un **segundo árbol guía**. Para poder obtener este árbol el alineamiento de COI fue recortada al mismo número de especímenes secuenciados para ITS y 28S. Las base de datos de COI+ITS+28S fue de 203 especímenes y estas bases de datos fueron analizadas con el método (*Species Tree Ancestral Reconstruction*, por sus siglas en inglés) en cual fue implementado en el programa *BEAST v.1.6.1 (Drummond y Rambaut 2007). Este método fue usado para buscar congruencia entre las topologías de los arboles obtenidos del análisis de inferencia bayesiana (IB) de los marcadores genéticos usados, citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y de los espaciadores transcritos internos (ITS1,5.8S,ITS2) y los dominios (D2+D3) del 28S ribosomal. El análisis en *BEAST opera bajo un marco bayesiano, el cual co-estima la distribución posterior de las especies y los árboles de genes, utilizando un modelo coalescente. El método combina priors de eventos de especiación y de genética de poblaciones, lo que permite estimar polimorfismo intraespecífico y sorteo incompleto de linajes en una estimación filogenética (Heled y Drummond 2010). El análisis en *BEAST se corrió para 100 millones de generaciones con una frecuencia de muestreo de cada 10,000 generaciones. Se utilizó un reloj log normal, sin calibración de fósiles y una tasa media fija a 1. El prior de árbol Yule se utilizó para el análisis a nivel de especie y un modelo coalescente constante se utilizó para el análisis a nivel de población. Modelos de evolución de secuencias de ADN fueron asignadas a cada partición con base a los resultados obtenidos con jModeltest (Posada 2008) (mismos modelos de sustitución utilizados en

análisis bayesiano y de máxima verosimilitud). Valores por defecto se utilizaron para el resto de los priors. El árbol de especies *BEAST final fue un árbol de clados de máxima credibilidad, posteriormente un burnin de 25% fue quitado. Convergencia en los análisis se confirmó con el programa Tracer v 1.5 (Rambaut y Drummond 2007), con el árbol de especies construido a partir del programa Tree Annotator v 1.6.1 (Drummond y Rambaut 2007). El apoyo a los nodos se determinó utilizando probabilidades posteriores (PP).

Análisis morfológico

El género *Neoechinorhynchus* posee más de 116 especies con una distribución cosmopolita, esta diversidad de especies se diferencian principalmente en el tamaño de los ganchos de la proboscis, la cual tiene 18 ganchos ordenados en tres hileras con 6 ganchos cada una, siendo estos ganchos un carácter diagnóstico del género y de las especies. En este estudio cada una de las especies candidatas reconocidas a través de ambos arboles guía fue analizada la longitud de los ganchos de la proboscis. Los ganchos de la proboscis se dividieron en ganchos apicales, medios y posteriores (Figura 1). Se tomaron medidas morfométricas para cada uno de estos ganchos para machos y hembras. Se realizaron análisis multivariado de varianza (MONOVA) y análisis de componente principales (PCA) con el programa Statistica (StatSoft, Inc. 2005. STATISTICA data analysis software system, version 7.1. www.statsoft.com).

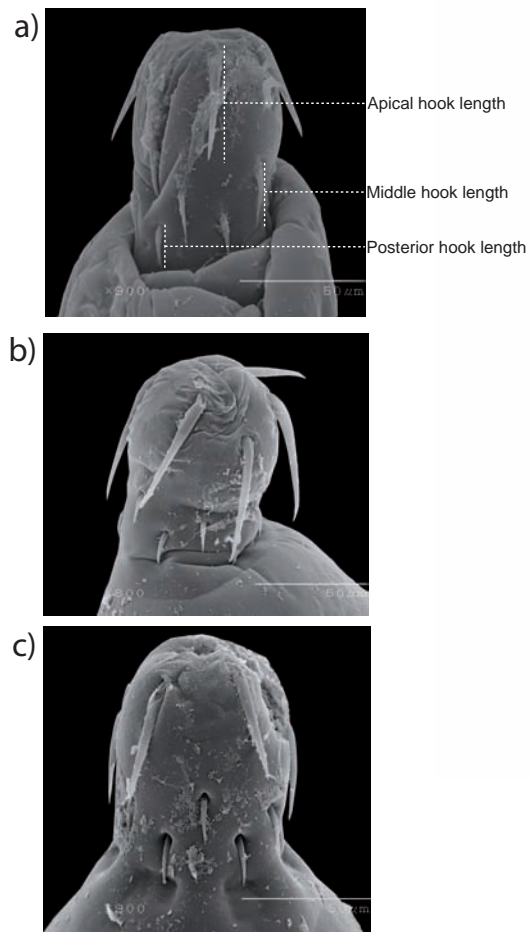


Figura 1. Medidas de los ganchos apicales, medios y posteriores que fueron analizados en este estudio. a) *N. (N.) golvani*, b) *N. (N.) mexicoensis*, c) *N. (N.) brentnickoli*.

RESULTADOS

Recolecta del material biológico y delimitación de especies

Se colectaron nueve especies del género *Neoechinorhynchus* formalmente descritas y 10 especies putativas (linajes) que fueron diagnosticadas en este estudio principalmente en México y algunas localidades de Centroamérica (ver Tabla 1; Figura 2). La especie *N. (N.) brentnickoli* se recolectó del intestino de *Dormitator latifrons* en ocho localidades de lagunas costeras y ríos en la vertiente del pacífico mexicano con una distribución que abarca desde el sur del estado de Guerrero hasta Colima. La especie *N. (N.) roseum* fue muestreada en dos localidades, una laguna y un estero principalmente en los estados de Sinaloa y Nayarit; esta especie de acantocéfalo está asociada a las especies de peces como *Achirus mazatlanus* y *Citharichthys gilberti*. Otra especie colectada fue *N. (N.) mamesi* la cual fue descrita por Pinacho-Pinacho et al. (2012); esta especie se recolectó en tres lagunas costeras del estado de Chiapas la cual está asociada a *Dormitator latifrons*. La especie *N. (N.) golvani* fue recolectada de tres localidades, Catemaco, Veracruz; Presa Temascal, Oaxaca, México y de la localidad las Lisas en Guatemala. Del intestino de tortugas dulceacuícolas se colectaron dos especies *N. (N.) schmidti* y *N. (N.) emyditoides* en una y tres localidades, respectivamente en el Golfo de México. Adicionalmente *N. (N.) chimalapasensis*, *N. (N.) panucensis* y *N. (N.) mexicoensis* fueron colectadas en las localidades tipo para estas especies. En total se recolectaron especímenes en 57 localidades de Centroamérica (Tabla 1; Figura 2).

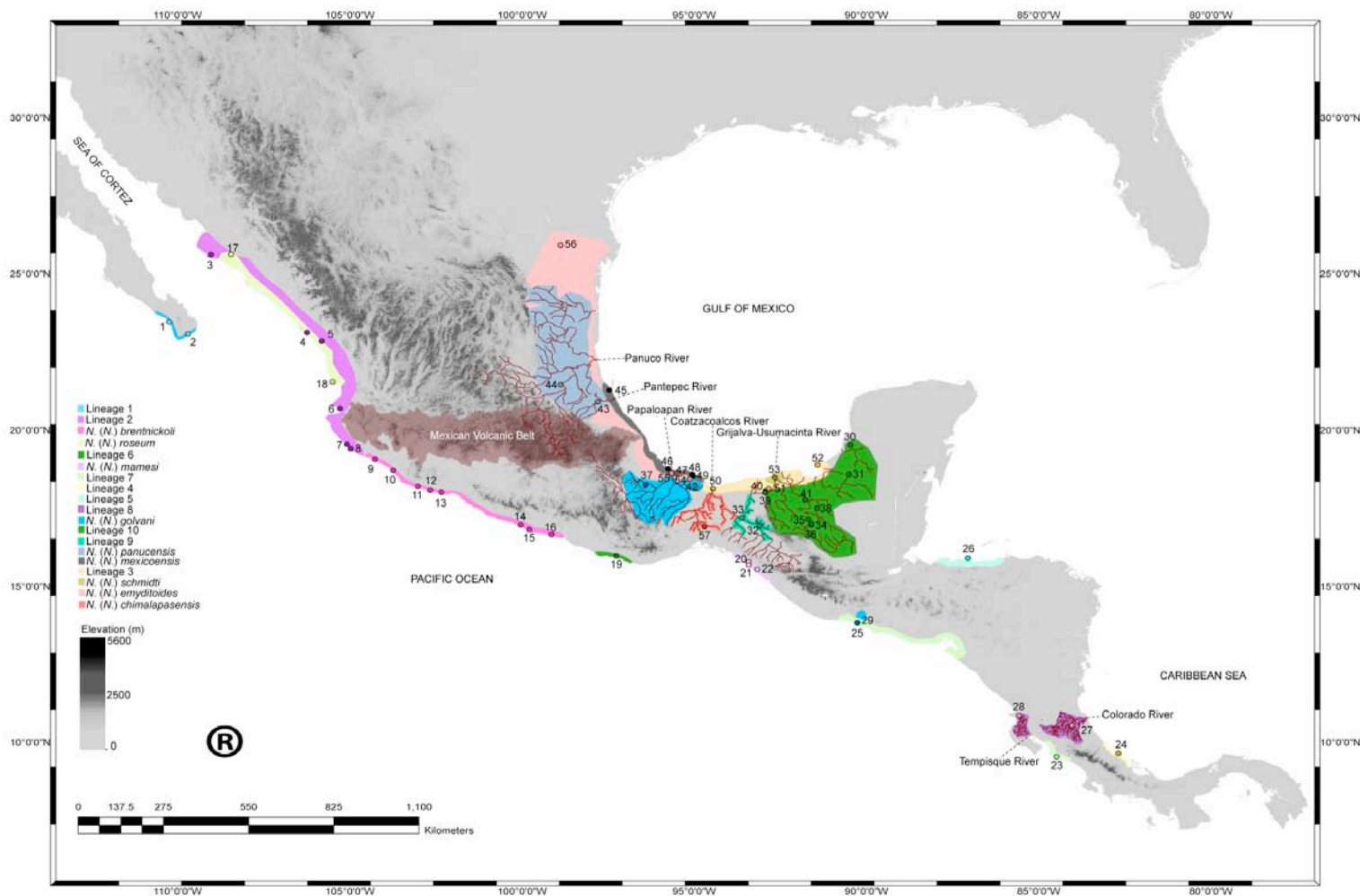


Figura 2. Localidades de muestreo para *Neoechinorhynchus* spp. en Centroamérica

Como parte de este estudio se diagnosticaron 10 linajes o especies putativas en peces estuarinos y dulceacuícolas (Figuras 3 y 4). El linaje 1 se recolectó en dos localidades del estado de Baja California Sur, México, este linaje está asociado a *Dormitator latifrons*. El linaje 2 se recolectó en seis localidades que abarca desde Topolobampo, Sinaloa hasta el Río Cuiztmala, Jalisco. Como linaje 3 se colectaron ejemplares en el Río Coatzacoalcos y Río el Espino, ambas localidades en el Golfo de México asociado al pez *Dormitator maculatus*. Los linajes 4 y 5 solo se recolectaron de una localidad (Playa Grande, Costa Rica y Las Brisas del Chamalecon, Honduras respectivamente) del intestino de *Dormitator*

maculatus. Los linajes 6 y 7 se colectaron de una localidad (Puente Manialtepec, Mexico y las Lisas, Guatemala, respectivamente), ambos del intestino de *Dormitator latifrons*. Como linaje 8 se colectaron especímenes en dos localidades de Costa Rica (Lago Jalapa y Quebrada Puercos) de 6 especies de peces de la familia Cichlidae. El linaje 9 se colectó del intestino de *Vieja pearsei* en dos presas del Río Grijalva en Chiapas, México. Finalmente el linaje 10 se colectó de múltiples localidades y huéspedes de la familia Cichlidae, principalmente en el sureste de México (Tabla 1; Figuras 3 y 4).

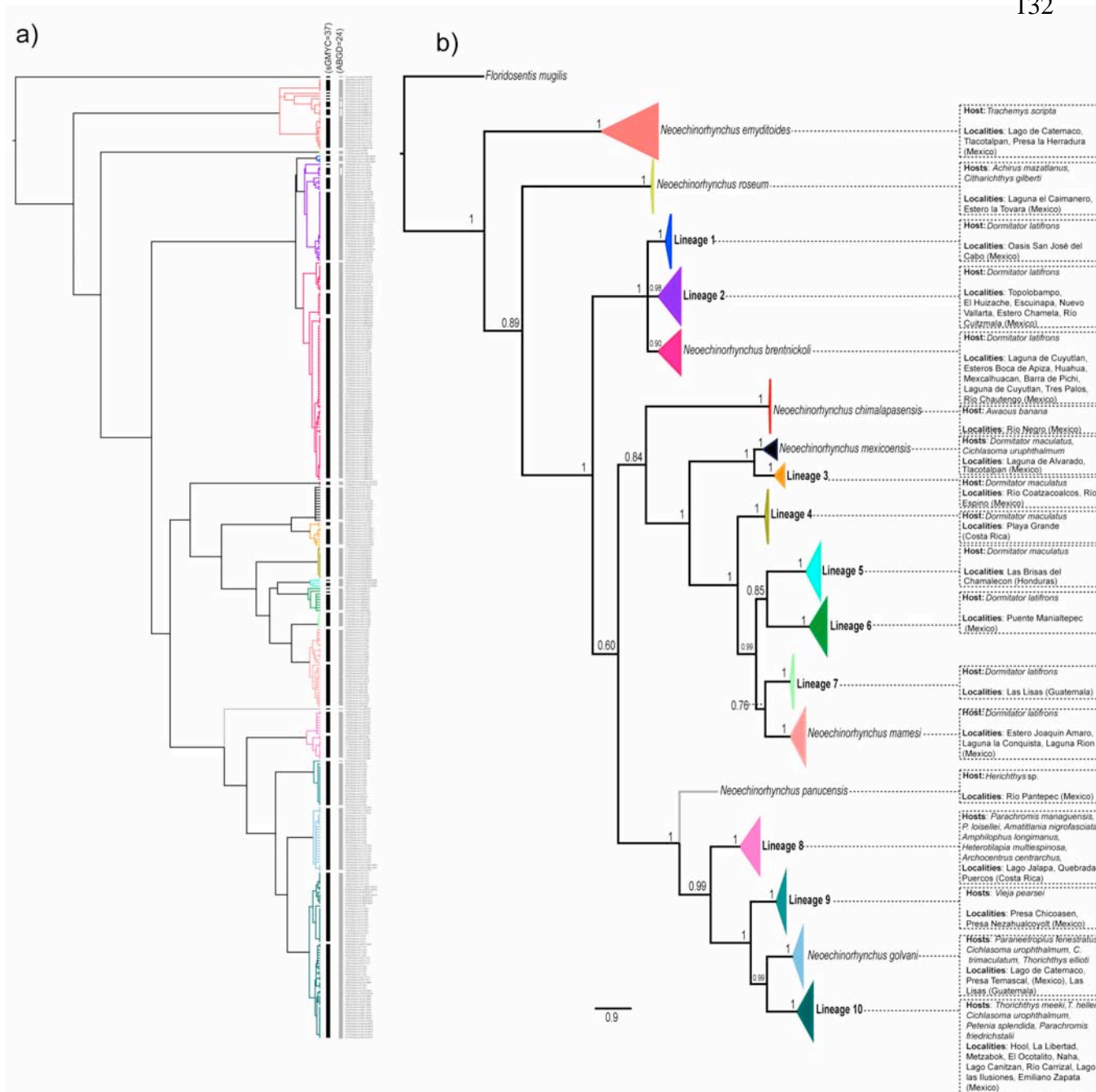


Figura 3. Primera estrategia para obtener árbol guía basado en 353 secuencias parciales del gen citocromo oxidasa 1 (COI). a) árbol ultramétrico obtenido del modelo GMYC, líneas negras en las terminales representan las entidades detectadas bajo GMYC, líneas grises representan los grupos obtenidos con el método ABGD con una divergencia del 1.3 al 2.2%. b) resumen del árbol guía, clados en colores representan especies o linajes. Valores en los nodos representan probabilidades posteriores.

Análisis morfológico de MANOVA y PCA

De los datos morfométricos, los ganchos de la proboscis mostraron la mayor variación entre especies y/o linajes, y entre la mayor fueron los ganchos apicales. Los ganchos medios y posteriores mostraron poca variación siendo muy similares entre linajes. De los 10 linajes encontrados en este estudio, solo el linaje 8 (Lago de Jalapa, Costa Rica) mostró una variación significativa en el tamaño de los ganchos apicales tanto en machos como en hembras con respecto a las otras especies y/o linajes en Centroamérica (Figura 5). Los otros 9 linajes no mostraron variación significativa con respecto a las otras especies.

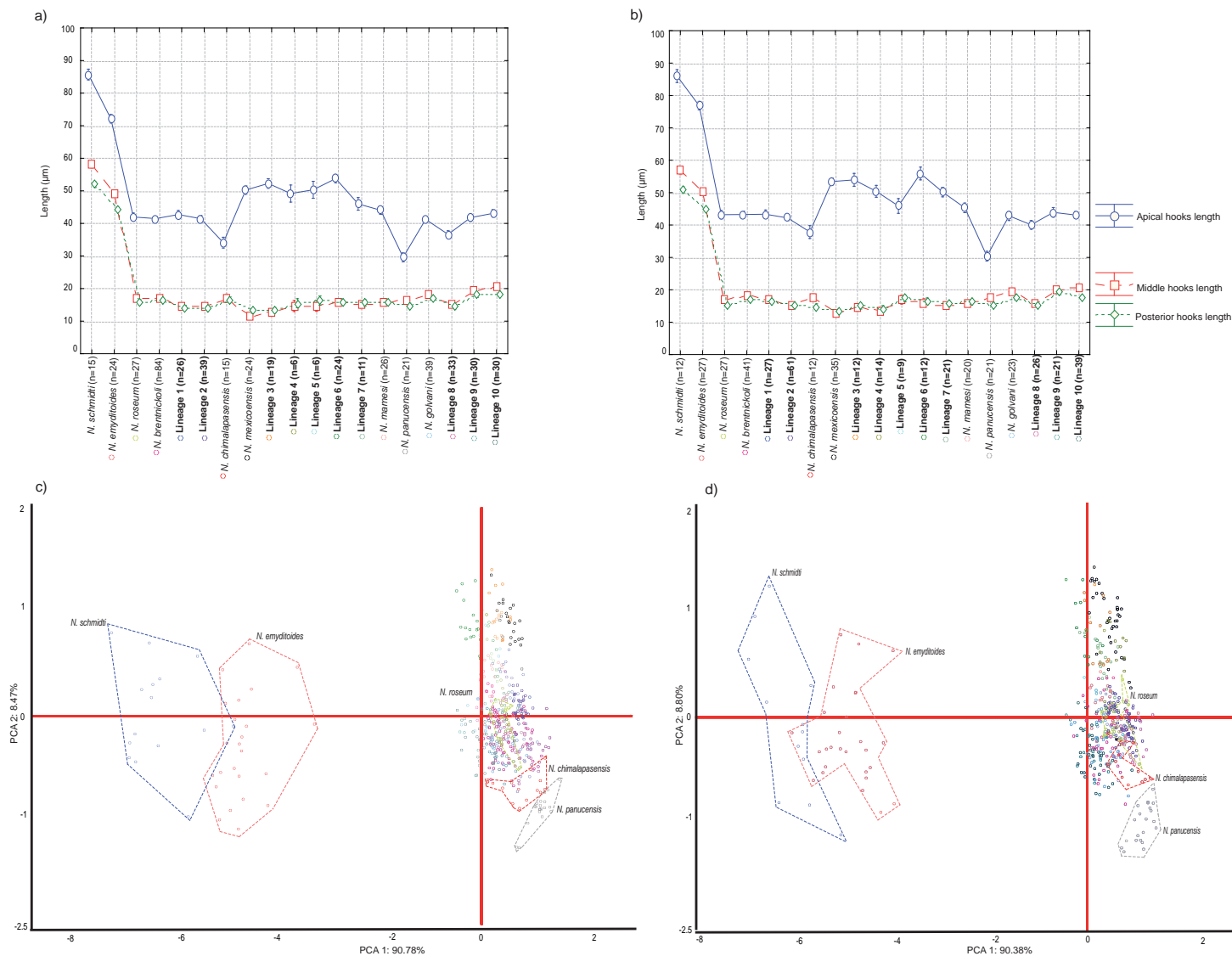


Figura 5. Análisis morfométricos de los ganchos de todas las especies y linajes de este estudio. a) MANOVA de los ganchos de la proboscis en machos, b) MANOVA de los ganchos en hembras, el eje de las X representa la longitud en micrómetros, el eje de las Y representa a cada especie o linaje y entre paréntesis el número de ganchos analizados. c) PCA para ganchos de machos, d) PCA para ganchos de hembras.

DISCUSIÓN

Adicionalmente a las nueve especies descritas morfológicamente en Centroamérica, otras 10 especies putativas fueron diagnosticadas basando en ambos árboles guía. Análisis basados en múltiples métodos para la delimitación de especies más análisis estadísticos morfológicos mostraron que especies del género *Neoechinorhynchus* en Centroamérica es un grupo hiper-diverso conformado por múltiples especies crípticas. En este estudio se encontraron al menos nueve especies crípticas y una especie diagnosticada morfológicamente distinta (linaje 8) asociados a especies de peces esturinos del género *Dormitator* y peces dulceacuícolas de la familia Cichlidae.

LITERATURA CITADA

Amin O. M. y R. Heckmann. 2009. Description of *Neoechinorhynchus* (*N.*) *buckneri* n. sp. from the blacktailed redhorse *Moxostoma poecilurum* (Catostomidae) in the Tchoutacabouffa River, Mississippi, with a key to species of *Neoechinorhynchus* with different dorsoventral body wall thickness. *Comparative Parasitology*, **76**: 154–161.

- Amin O. M. 2002. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology*, **53**: 1–18.
- Amin O. M. 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica*, **60**: 273–305.
- Barger M. A., E. V. Thatcher y B. B. Nickol. 2004. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology*, **71**: 1–3.
- Bowles J., D. Blair y D. P. McManus. 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**: 103–109.
- Blasco-Costa I., A. Faltyňková, S. Georgieva, K. Skírnisson, T. Scholz y A. Kostadinova. 2014. Fish pathogens near the Arctic Circle: molecular, morphological and ecological evidence for unexpected diversity of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) in Iceland. *International Journal of Parasitology*, **44**: 703–715.
- Camargo A. y J. W. Sites. 2013. Species delimitation: a decade after the Renaissance. In: Pavlinov I. (edi.) *The species problem-ongoing issues*. InTech. doi:10.5772/52664.
- García-Varela M. y S. A. Nadler. 2005. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, **91**: 1401–1409.
- Herrmann K. K., R. Poulin, D. B. Keeney y I. Blasco-Costa. 2014. Genetic structure in a progenetic trematode: signs of cryptic species with contrasting reproductive strategies. *International Journal of Parasitology*, **44**: 811–818.

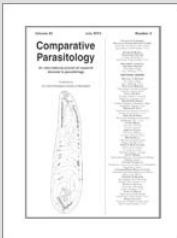
- Huelsenbeck J. P. y F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, **17**:754–5.
- Locke S. A., M. Caffara, D. J. Marcogliese y M. L. Fioravanti. 2015a. A large-scale molecular survey of *Clinostomum* (Digenea, Clinostomidae). *Zoologica Scripta*, **44**: 203–217.
- Locke S. A., F. S. Al-Nasiri, M. Caffara, F. Drago, M. Kalbe, A. R. Lapierre, J. D. McLaughlin, P. Nie, R. M. Overstreet, G. T. R. Souza, R. M. Tokemoto y D. J. Marcogliese. 2015b. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. *International Journal of Parasitology*, **45**: 841–855.
- Maddison D. R., y W. P. Maddison. 2002. *MacClade Version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Maddison W. P. y D. R. Maddison. 2011. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis Version 2.75*. Available: <http://mesquiteproject.org>.
- Martínez-Aquino A., F. S. Ceccarelli y G. Pérez-Ponce de León. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Margotrema* (Digenea: Allocreadiidae), parasitic flatworms of goodeid freshwater fishes across central Mexico: species boundaries, host-specificity, and geographical congruence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **168**: 1–16.
- Miller R. R., W. L. Minckley y S. M. Norris. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois. p. 559.

- Pinacho-Pinacho C. D., G. Pérez-Ponce De León y M. García-Varela. 2012. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International*, **61**: 634–644.
- Pons J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D Sumlin y A. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, **55**: 595–609.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 1253–1256.
- Puillandre N., A. Lambert, S. Brouillet y G. Achaz. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**:1864–1877.
- Rambaut A. y A. J. Drummond. 2007. Tracer v1.4, Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Salgado-Maldonado G. 2013. Redescription of *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) and description of a new species from freshwater cichlids (Teleostei: Cichlidae) in Mexico. *Parasitology Research*, **112**:1891–1901.
- Smales L. R. 2013. A review of the genus *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Australia with the description of two new species. *Journal of Parasitology*, **99**: 1106–1112.

Stamatakis A. 2006. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**: 2688–2690.

Thompson J., D. Higgins y T. 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.

6. 2. Apéndice 2



First Record of the Intermediate Host of *Pseudocorynosoma constrictum* Van Cleave, 1918 (Acanthocephala: Polymorphidae) in Central Mexico

Martín García-Varela, Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Ana-L. Sereno-Uribe, Berenít Mendoza-Garfías

Comparative Parasitology (2013) 80: 171–178

First Record of the Intermediate Host of *Pseudocorynosoma constrictum* Van Cleave, 1918 (Acanthocephala: Polymorphidae) in Central Mexico

MARTÍN GARCÍA-VARELA,¹ CARLOS-DANIEL PINACHO-PINACHO, ANA-LUCIA SERENO URIBE, AND BERENÍT MENDOZA-GARFÍAS

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, Mexico (e-mail: garciav@unam.mx; danyboy_jd26@hotmail.com; moquitolino@yahoo.com.mx; berenit@ibunam2.ibiologia.unam.mx)

ABSTRACT: *Pseudocorynosoma constrictum* Van Cleave, 1918 (Polymorphidae) is an endoparasite that infects a variety species of waterfowl from North America. Specimens of *P. constrictum* were recovered in central Mexico from 7 species of definitive host as well as from the freshwater amphipod *Hyalella azteca*, its intermediate host. In total, 69 amphipods were infected with 15 acanthella and 58 cystacanths. Morphologically, the adults and cystacanths of *P. constrictum* possess triangular spines covering most of the anterior part of the trunk, they have a slight constriction separating the anterior and posterior regions of the trunk, and they have an ovoid or cylindrical proboscis with a slightly swollen region covered with 16 longitudinal rows of 10 hooks each. Sequences of the mitochondrial coding gene cytochrome *c* oxidase were generated for 21 samples of *P. constrictum* (14 adults, 3 acanthella, and 4 cystacanths). The genetic divergence estimated among specimens was very low, ranging from 0 to 3%. All these sequences were aligned with 18 other taxa, representing 6 genera of Polymorphidae, forming a data set of 39 taxa with 655 nucleotides. The maximum parsimony and maximum likelihood trees indicated that the 21 sequences of *P. constrictum* formed a well-supported clade. The morphological evidence, in combination with the genetic divergence, plus the systematic position in the phylogenetic trees, indicated that all the samples of *P. constrictum* belong to the same lineage. The presence of *P. constrictum* in 7 species of waterfowl from central Mexico could be explained as a result of host-sharing, as the result of these hosts occurring in sympatry, and by the fact that they feed on the same species of amphipod known to harbor cystacanths. This study also confirms that a complete life cycle occurs in central Mexico wetlands.

KEY WORDS: Acanthocephala, *Pseudocorynosoma constrictum*, adult, cystacanth, cox 1, genetic divergence, Mexico, phylogenetic analysis, maximum likelihood, maximum parsimony.

Species of *Pseudocorynosoma* Aznar, Pérez Ponce de León and Raga (Acanthocephala), distributed throughout North and South America, are endoparasites that use waterfowl and amphipods to complete their life cycle (Van Cleave, 1945; Podesta and Holmes, 1970; Aznar et al., 2006; Duclos et al., 2006). Morphologically, *Pseudocorynosoma* is distinct from other genera of Polymorphidae Meyer, 1931 in possessing spines covering the anterior part of the trunk, an ovoid or cylindrical proboscis with a slightly swollen region, a truncated cone-shaped neck, spines surrounding the genital pore, and by the presence of from 4 to 6 tubular cement glands in the male. Furthermore, the eggs have a prominent polar protrusion in the middle fertilization membrane. Based on these morphological features, the genus currently includes 5 species: *Pseudocorynosoma constrictum* Van Cleave, 1918 (type species); *Pseudocorynosoma peposacae* Porta, 1914; *Pseudocorynosoma anatarium* Van Cleave 1945; *Pseudocorynosoma enrietti* Molfi and Fernandes, 1953; and

Pseudocorynosoma iheringi Machado Filho, 1961 (Aznar et al., 2006).

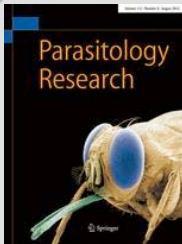
The acanthocephalan *P. constrictum* is one of the most abundant species of polymorphids and is associated with several species of waterfowl in North America (Van Cleave, 1945; Farias and Canaris, 1986). *Pseudocorynosoma constrictum* has an indirect life cycle involving 2 hosts: the freshwater amphipod *Hyalella azteca*, the intermediate, and several species of waterfowl that serve as definitive hosts (Podesta and Holmes, 1970; Duclos et al., 2006). Adults of *P. constrictum* have been recorded in 2 species of waterfowl in central Mexico: *Anas diazi* and *Anas clypeata* (see Farias and Canaris, 1986; García-Prieto et al., 2010). In the current study, cystacanths identified as *P. constrictum* are reported for the first time from its intermediate host in central Mexico. The cystacanth was linked to the adult by using a combination of morphological and molecular features.

MATERIALS AND METHODS

Adults and cystacanths identified as *P. constrictum* were collected from naturally infected vertebrate and invertebrate hosts in central Mexico (Table 1). Definitive hosts were

¹ Corresponding author.

6. 3. Apéndice 3



Using mitochondrial and ribosomal DNA sequences to test the taxonomic validity of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 in fish-eating birds and freshwater fishes in Mexico, with the description of a new species

Ana L. Sereno-Uribe, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Martín García-Varela, Gerardo Pérez-Ponce de León

Parasitology Research (2013) 112: 2855-2870

Using mitochondrial and ribosomal DNA sequences to test the taxonomic validity of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 in fish-eating birds and freshwater fishes in Mexico, with the description of a new species

Ana L. Sereno-Uribe · Carlos D. Pinacho-Pinacho ·
Martín García-Varela · Gerardo Pérez-Ponce de León

Received: 3 April 2013 / Accepted: 8 May 2013 / Published online: 25 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The taxonomic history and species composition of the genus *Clinostomum* has been unstable. Two species, *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 and *Clinostomum marginatum* Rudolphi, 1819, have been particularly problematic and its validity has been disputed for nearly 200 years. In this paper, we have made use of an integrative taxonomy approach, and we used, in first instance, DNA sequences of two genes (*cox1* and ITS) to test the validity of *C. complanatum*, a species apparently widely distributed in Mexico and to link the metacercariae and adult forms of the recognized species of *Clinostomum*. Combining molecular data with morphology, host association, and geographical distribution, we searched for the potential existence of undescribed species. A new species of *Clinostomum* is described based on adults found in the mouth cavity of three species of fish-eating birds as well as in metacercariae found in freshwater and estuarine fishes. A few morphological characteristics distinguish the new species from other congeners even though reciprocal monophyly in a phylogenetic tree based on maximum-likelihood and Bayesian analysis, genetic divergence, and a multivariate analysis of variance and a principal component analysis of 18 morphometric traits for adults and metacercariae demonstrates the validity of the new species. Based on our results, it seems that *C. complanatum* is not currently distributed in Mexico, although this requires further verification with a more thorough sampling in other areas of

the country, but it is plausible to support the hypothesis that *C. marginatum* is the American form, as previously suggested by other authors.

Introduction

Clinostomum Leidy, 1856 is one of the three genera currently allocated to the subfamily Clinostomatinae Luhe, 1901 infecting, as adults, fish-eating birds and usually found in the mouth cavity and esophagus of herons (Ardeidae) distributed worldwide (Matthews and Cribb 1998; Kanev et al. 2002; Gustinelli et al. 2010; Bonett et al. 2011; Caffara et al. 2011). The taxonomic history of *Clinostomum* as well as its species composition has been unstable; several authors addressed this particular issue in the past arguing about the high degree of morphological variability within species (see Ukoli 1966; Yamaguti 1971; Feizullaev and Mirzoeva 1983; Matthews and Cribb 1998). The confusing taxonomic history of the genus was recently reviewed by Gustinelli et al. (2010), which recognized between 13 and 27 valid species. For instance, Caffara et al. (2011) discussed that the taxonomic validity of two common species, i.e., *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 and *Clinostomum marginatum* Rudolphi, 1819, has been disputed for nearly 200 years. The metacercariae of cosmopolitan species of *Clinostomum* (commonly known as “yellow grub”) produce severe damages in their freshwater fish intermediate hosts (e.g., Shareef and Abidi 2013), and in addition to that, this digenean may infect human beings, and because of that, it has received a great attention and many published accounts do exist in the world literature.

A. L. Sereno-Uribe · C. D. Pinacho-Pinacho · M. García-Varela ·
G. P.-P. de León (✉)
Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad
Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-153,
C.P. 04510, México, D.F., México
e-mail: ppdleon@ibiologia.unam.mx



6. 4. Apéndice 4

Diversity of sea lice (Copepoda: Caligidae) parasitic on marine fishes with commercial and aquaculture importance in Chamela Bay, Pacific coast of Mexico by using morphology and DNA barcoding, with description of a new species of *Caligus*

Francisco Neptalí Morales-Serna, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Samuel Gómez, Gerardo Pérez-Ponce de León

Parasitology International (2014) 63:69–79



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Diversity of sea lice (Copepoda: Caligidae) parasitic on marine fishes with commercial and aquaculture importance in Chamela Bay, Pacific coast of Mexico by using morphology and DNA barcoding, with description of a new species of *Caligus*

Francisco Neptalí Morales-Serna^{a,*}, Carlos Daniel Pinacho-Pinacho^b, Samuel Gómez^c, Gerardo Pérez-Ponce de León^a

^a Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-153, C.P. 04510, México D.F., México

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-153, C.P. 04510, México D.F., México

^c Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán 82040, Sinaloa, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2012

Received in revised form 14 August 2013

Accepted 5 September 2013

Available online 13 September 2013

Keywords:

Siphonostomatoida

Crustacean

Fish parasites

Aquaculture

Phylogeny

COI

ABSTRACT

The occurrence of parasitic copepods of the family Caligidae on wild and cultured marine fishes from Chamela Bay, on the Pacific coast of Mexico, is reported. A total of 16 species of *Caligus* and 1 species of *Lepeophtheirus* were found on 19 wild fish species. The description of *Caligus chamelensis* n. sp. parasitizing *Kyphosus elegans* is presented. Among the species of *Caligus* reported here, *Caligus serratus* is the most common since it was found infecting 11 fish species. On cultured fish, *Lutjanus guttatus* and *L. peru*, only one species of *Caligus*, *C. sclerotinosus* was collected. DNA barcodes [mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences] were obtained for the majority of the sea lice species herein reported. The molecular analyses support the recognition of the new species and suggest that neither *Caligus* nor *Lepeophtheirus* are monophyletic. COI is shown to be a good candidate for parasitic copepod species identification, although a more robust reference database is needed to expand our ability to accomplish a molecular identification.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Promotion of aquaculture in offshore waters has been increasing worldwide. Finfish farms have been using sea cages as a suitable method of aquaculture. However, there are some problems related to water quality and flow as well as to the presence of some other marine organisms in the cages, such as parasites which may cause diseases and mortality [1,2]. Populations of ectoparasites with direct life cycles increase under farming conditions since aggregation of fish in cages may facilitate the spread of infections [2]. That is particularly true for parasitic copepods the importance of which as disease causing agents has become evident [3].

Members of the family Caligidae, mainly species of *Caligus* Müller, 1785 and *Lepeophtheirus* Nordmann, 1832, represent a group of siphonostomatoid copepods commonly known as “sea lice” which have impacted finfish aquaculture worldwide. For instance *Caligus amblygenitalis* Pillai, 1961 and *Caligus chistos* Lin & Ho, 2003 were

significantly associated with the severity of gross eye damage in southern bluefin tuna farmed in South Australia [4]; *Caligus epidemicus* Hewitt, 1971 is an important pathogen in Asia, causing mortality in more than 10 marine cultured fish species [5]; *Caligus orientalis* Gusev, 1951 often causes serious problems at fish farms in brackish-water regions of Japan, Taiwan and China [6]; *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 has been the most important parasite for the salmon industry in Chile [7,8]; and *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) causes serious damage in farms of Atlantic salmon in Canada, Ireland, Norway and Scotland [9,10]. Additionally, a decline of wild fish populations in areas surrounding sea cages has been ascribed to sea lice epidemics [11,12].

Development of marine finfish culture is taking place in Mexico, with important efforts to scale-up production of highly valued food fishes (e.g. [13–15]). In particular, wild juvenile snappers, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) and *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922), are captured and grown in sea cages in coastal waters of Jalisco, western Mexico. Under these circumstances, information on potential threats by sea lice is needed in order to provide a baseline for future studies such as those on biosecurity, risk analysis and epidemiology, for disease prevention, control and management [16].

This paper is part of an ongoing survey of the parasitic copepods occurring in marine fishes of Chamela Bay (Mexican Pacific), including

* Corresponding author at: Instituto de Biología, UNAM, 04510, México, D.F., México. Tel.: +52 5 56229131; fax: +52 5 55500164.

E-mail addresses: neptalims@hotmail.com (F.N. Morales-Serna), danyboy_jd26@hotmail.com (C.D. Pinacho-Pinacho), samueltgomez@ola.icmyl.unam.mx (S. Gómez), ppdleon@ib.unam.mx (G. Pérez-Ponce de León).

6. 5. Apéndice 5



Richness and similarity of helminth communities of the freshwater fish *Profundulus punctatus* (Pisces: Cyprinodontidae) from Oaxaca, Mexico

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Ma. de los Ángeles Pérez-Ruiz, Ana L. Sereno-Uribe, Martín García-Varela, Emilio Martínez-Ramírez

Revista Mexicana de Biodiversidad (2014) 85: 1129-1138



Richness and similarity of helminth communities of the freshwater fish *Profundulus punctatus* (Pisces: Cyprinodontidae) from Oaxaca, Mexico

Riqueza y similitud de comunidades de helmintos del pez dulceacuícola *Profundulus punctatus* (Pisces: Cyprinodontidae) en Oaxaca, México

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho^{1✉}, Ma. de los Ángeles Pérez-Ruiz¹, Ana L. Sereno-Uribe², Martín García-Varela² and Emilio Martínez-Ramírez³

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-153, 04510 México D.F., Mexico.

²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-153, 04510 México D.F., Mexico.

³Departamento de Investigación, Área de Acuicultura, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Hornos Núm. 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, 71230 Oaxaca, Mexico.

✉ danyboy_jd26@hotmail.com

Abstract. The helminth parasite fauna of *Profundulus punctatus* in 7 localities from Oaxaca State, Mexico, was studied. A total of 132 fish were analyzed. Fourteen helminth taxa were recorded, including 9 digeneans (*Paracreptotrema blancoi*, *Paracreptotrema profundulusi*, *Phyllodistomum* sp., *Culuwiya* cf. *cichlidorum*, *Clinostomum* sp., Diplostomidae gen. sp., *Posthodiplostomum minimum*, *Ascocotyle (Ascocotyle) felippei* and *Centrocestus formosanus*), 2 monogeneans (*Gyrodactylus* sp. and *Salsuginus* sp.), and 3 nematodes (*Spinitectus humbertoi*, *Rhabdochona salgadoi*, and *Eustrongylides* sp.). Helminth parasite communities showed low values of richness (14 species) and diversity (Shannon–Wiener and Brillouin indices ranged between 0.359 to 2.083 and 0.358 to 2.042 bits/ind.) in the 7 localities, and some were dominated by 3 helminth species (*Ascocotyle (Ascocotyle) felippei*, *Centrocestus formosanus*, and *Rhabdochona salgadoi*). With the current data, we concluded that *P. punctatus* is parasitized by a particular group of helminth species (e. g., *Paracreptotrema blancoi*, *Paracreptotrema profundulusi*, *Spinitectus humbertoi*, and *Rhabdochona salgadoi*) exclusive to this fish family that are not shared with other Central American fish species.

Key words: species richness, community diversity.

Resumen. Se estudió la helmintofauna de *Profundulus punctatus* de 7 localidades del estado de Oaxaca, México. Se examinó un total de 132 peces. El registro helmintológico de este pez consta de 14 taxa de helmintos, los cuales incluyen 9 taxa de digéneos (*Paracreptotrema blancoi*, *Paracreptotrema profundulusi*, *Phyllodistomum* sp., *Culuwiya* cf. *cichlidorum*, *Clinostomum* sp., Diplostomidae gen. sp., *Posthodiplostomum minimum*, *Ascocotyle (Ascocotyle) felippei* y *Centrocestus formosanus*), 2 taxa de monogéneos (*Gyrodactylus* sp. y *Salsuginus* sp.) y 3 taxa de nemátodos (*Spinitectus humbertoi*, *Rhabdochona salgadoi* y *Eustrongylides* sp.). Las comunidades de helmintos mostraron bajos valores de riqueza (14 especies) y diversidad (índices de Shannon–Wiener y Brillouin mostraron valores entre 0.359 a 2.083 y 0.358 a 2.042 bits/ind.) en las 7 localidades y algunas de estas fueron dominadas por 3 especies de helmintos (esto es, *Ascocotyle (Ascocotyle) felippei*, *Centrocestus formosanus* y *Rhabdochona salgadoi*). Nuestros datos sugieren que *Profundulus punctatus* es parasitado por un grupo particular de helmintos (esto es, *Paracreptotrema blancoi*, *Paracreptotrema profundulusi*, *Spinitectus humbertoi* y *Rhabdochona salgadoi*) especies exclusivas de esta familia de peces y al parecer no se encuentran en otras especies de peces de Centroamérica.

Palabras clave: riqueza de especies, diversidad de la comunidad.

Introduction

Members of Profundulidae Hoedeman and Bronner are distributed along the Atlantic and Pacific Ocean slopes of southern Mexico, Guatemala, and Honduras (Miller, 1955,

2005; Doadrio et al., 1999; Matamoros and Schaeffer, 2010). This group shows low levels of richness with 7 known species classified in a single genus (*Profundulus* Hubbs) and all their members represent an endemic lineage, that probably inhabited this region since the Pliocene and perhaps even the Miocene (Miller, 1955; Doadrio et al., 1999; González-Díaz et al., 2005; Nelson, 2006; Frose and Pauly, 2010; Matamoros and Schaeffer, 2010).

Recibido: 09 septiembre 2013; aceptado: 21 mayo 2014



6. 6. Apéndice 6

Morphological and molecular analyses of larval and adult stages of *Echinoparyphium recurvatum* von Linstow 1873 (Digenea: Echinostomatidae) from central Mexico

Ana L. Sereno-Uribe, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Victor Sánchez Cordero y Martín García-Varela

Journal of Helminthology (2015) 89: 458–464

Morphological and molecular analyses of larval and adult stages of *Echinoparyphium recurvatum* von Linstow 1873 (Digenea: Echinostomatidae) from central Mexico

A.L. Sereno-Uribe, C.D. Pinacho-Pinacho, V. Sánchez Cordero and M. García-Varela*

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C. P. 04510, Distrito Federal, México

(Received 20 November 2013; Accepted 12 March 2014; First Published Online 17 April 2014)

Abstract

In central Mexico, populations of the freshwater snail *Physella cubensis* were infected with metacercariae from a species of *Echinoparyphium* (Digenea: Echinostomatidae). In the current study, we describe both larval and adult stages of this species obtained from experimental and natural infections. A total 180 snails were collected from Patzcuaro Lake, Michoacan state in central Mexico in July 2012. In the laboratory snails were placed in individual vials and exposed to light with the aim of observing emergence of cercariae. To obtain metacercariae, uninfected snails (*P. cubensis*) were exposed to cercariae. Chicks were infected with metacercariae to obtain adults. Nine days post-infection, eggs were recovered and incubated in tap water at room temperature to observe miracidia. Adults obtained from natural and experimentally infected hosts possess a head collar with 45 spines in two alternating rows, confirming the identification as *Echinoparyphium recurvatum* von Linstow 1873. To test the conspecificity of all stages, sequences of nuclear internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S and ITS2 rDNA were obtained from two adult worms recovered from chicks and also a natural avian host, the shoveler duck *Anas clypeata*, together with five cercarial and four metacercarial isolates from nine snails. The genetic divergence estimated among the 13 isolates was very low, ranging from 0 to 0.6%. Phylogenetic analyses inferred by maximum likelihood and Bayesian methods showed that all isolates of *E. recurvatum* form a single clade with strong support. The presence of *E. recurvatum* in *P. cubensis* and *A. clypeata* from central Mexico represents new host reports, and extends the distribution range in the Americas.

Introduction

Species of *Echinoparyphium* Dietz 1909 infect the gastrointestinal tracts of aquatic birds and mammals worldwide (McCarthy, 1990; Kostadinova & Gibson, 2000). *Echinoparyphium* is distinct from other genera of

Echinostomatidae Looss, 1899 because the species possess a well-developed head collar with 29–45 spines in a double row, with small spines covering the tegument and extending to the testicular level ventrally and to the anterior margin of the ventral sucker dorsally. The large testes are tandem and located in the centre of the hind body. They are elongated–oval, smooth or irregular, contiguous and post-equatorial. The ovaries are small, spherical, and median or submedian pre-equatorial.

*Fax: (525) 5550 0164
 E-mail: garciav@unam.mx; garciav@ib.unam.mx



6. 7. Apéndice 7

Phyllodistomum spinopapillatum sp. nov. (Digenea: Gorgoderidae), from the Oaxaca killifish *Profundulus balsanus* (Osteichthyes: Profundulidae) in Mexico, with new host and locality records of *P. inecoli*: Morphology, ultrastructure and molecular evidence

Gerardo Pérez-Ponce de León, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**,
Berenit Mendoza-Garfias, Martin García-Varela

Acta Parasitologica (2015) 60: 298–307

***Phyllodistomum spinopapillatum* sp. nov.** (Digenea: Gorgoderidae), from the Oaxaca killifish *Profundulus balsanus* (Osteichthyes: Profundulidae) in Mexico, with new host and locality records of *P. inecoli*: Morphology, ultrastructure and molecular evidence

**Gerardo Pérez-Ponce de León^{1*}, Carlos D. Pinacho-Pinacho^{1,2},
 Berenit Mendoza-Garfias¹ and Martin García-Varela¹**

¹Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ap. Postal 70-153 C.P. 04510, México D.F., México;

²Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, C.P. 04360, México D.F., México

Abstract

Phyllodistomum spinopapillatum sp. nov. is described from the urinary bladder of the Oaxaca killifish, *Profundulus balsanus* Ahl (Profundulidae) in Río Pueblo Viejo and Río Santa Cruz, Oaxaca, southwestern Mexico. The new species is described based on evidence gathered from morphology, scanning electron microscopy (SEM), and partial sequences of the 28S rRNA gene. Diagnostic characters of the new species of *Phyllodistomum* Braun 1899 are the presence of spines on the entire body surface and having a ventral sucker almost half the size of oral sucker. The new species possess a large number of dome-like papillae on the body surface with scattered distribution along the hindbody, and these papillae are characteristically spinulated. *Phyllodistomum spinopapillatum* sp. nov. most closely resembles *P. inecoli* Razo-Mendivil, Pérez-Ponce de León and Rubio-Godoy, 2013, a parasite of the twospot livebearer *Pseudoxiphophorus bimaculatus* (Heckel) from Veracruz, in the Atlantic slope of Mexico. In addition to the new species, specimens of *P. inecoli* were also found parasitising the urinary bladder of cyprinodontiforms such as the Mexican molly *Poecilia sphenops* Valenciennes in a pond at Santa María Coyotepec, and in *Profundulus* sp. in Río Templo, both in Oaxaca, and in the Porthole livebearer *Poeciliopsis gracilis* (Heckel) in Río San Juan, as well as in *Profundulus punctatus* (Günther) from Río Nueva Francia, both in Chiapas. The distribution and host range of *P. inecoli* is extended to freshwaters of the Pacific slope of Mexico, and to other cyprinodontiforms.

Keywords

Digenea, *Phyllodistomum*, Gorgoderidae, Profundulidae, Poeciliidae, Middle-America, Mexico.

Introduction

Members of Gorgoderidae (Looss) are parasitic flukes that typically inhabit in the urinary bladder of fishes, amphibians and reptiles. Of these, *Phyllodistomum* (one of the most speciose groups within the Digenea with more than 100 described species) has a worldwide distribution and contain parasites of amphibians, and both marine and freshwater fishes (Campbell 2008; Rosas-Valdez *et al.* 2011). The classification of the genus *Phyllodistomum* within the family Gorgoderidae, and its species composition, is under scrutiny and remains contro-

versial, with evidence gathered from rRNA ribosomal genes such as ITS and 28S (see Cutmore *et al.* 2013). These authors demonstrated that the large genus *Phyllodistomum* is paraphyletic relative to other genera within Gorgoderidae. Much progress has been gained in the last few years regarding the taxonomy of these digeneans (see Rosas-Valdez *et al.* 2011; Cutmore *et al.* 2013; Razo-Mendivil *et al.* 2013; Petkevičiūtė *et al.* 2014; Urabe *et al.* 2014; Ho *et al.* 2014), but still classification remains unsettled and new species descriptions continue to be published on regular basis.

In Mexico, six nominal species of *Phyllodistomum* have been recorded thus far, four of them in marine or brackish

*Corresponding author: ppdleon@ib.unam.mx



6. 8. Apéndice 8

Haliotrematoides spp. (Monogenoidea:Dactylogyridae) parasitizing *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae) in two localities of the Pacific coast of Mexico, and their phylogenetic position within the Ancyrocephalinae through sequences of the 28S rRNA

Adriana García-Vásquez, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Lilia Catherine Soler-Jiménez, Emma Josefina Fajer-Ávila, Gerardo Pérez-Ponce de León Revista Mexicana de Biodiversidad (2015) 86:298–305



Taxonomy and systematics

Haliotrematoides spp. (Monogeneoidea: Dactylogyridae) parasitizing *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae) in two localities of the Pacific coast of Mexico, and their phylogenetic position within the Ancyrocephalinae through sequences of the 28S rRNA

Haliotrematoides spp. (Monogeneoidea: Dactylogiridae) parasitando *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae) en dos localidades de la costa pacífica de México y su posición filogenética dentro de Ancyrocephalinae a través de secuencias del 28S rRNA

Adriana García-Vásquez^{a,b,*}, Carlos Daniel Pinacho-Pinacho^a, Lilia Catherine Soler-Jiménez^c, Emma Josefina Fajer-Ávila^c, Gerardo Pérez-Ponce de León^a

^a Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-153, Coyoacán, 04510 México, D.F., Mexico

^b Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A. C., Km 2.5 Antigua carretera a Coatepec, 91070 Xalapa, Veracruz, Mexico

^c Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo en Acuicultura y Manejo Ambiental, A. C., Unidad Mazatlán, Estero del Yugo s/n, 82000 Mazatlán, Sinaloa, Mexico

Received 20 August 2014; accepted 3 February 2015

Available online 21 May 2015

Abstract

Specimens of wild populations of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindacher) were studied for monogenean parasites in 2 localities along the Mexican Pacific coast (Mazatlán, Sinaloa and Chamela Bay, Jalisco). Five species of dactylogyrids were found on the gills of their hosts: *Haliotrematoides guttati* (García-Vargas, Fajer-Ávila, & Lamothe-Argumedo, 2008), *H. plectridium* Kristky and Mendoza-Franco in Kritsky, Tingbao, & Yuan, 2009, *H. spinatus* Kristky and Mendoza-Franco in Kritsky et al. (2009), *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila & Lamothe-Argumedo, 2008 and *E. mehen* (Soler-Jiménez, García-Gasca, & Fajer-Avila, 2012). Freshly collected specimens provided an opportunity to study and compare specimens from different localities in further detail and few morphological characters were added to the description of each species. Additionally, a fragment of 856 bp of the 28S ribosomal RNA (D1–D3) was obtained for all the sampled monogeneans, and a phylogenetic analysis along with all available sequences of dactylogyrids was conducted to establish the systematic position of the species within the Ancyrocephalinae. Our results suggest that species of *Haliotrema* might be included in *Haliotrematoides* genus. In addition, the genetic divergence data suggest that *H. guttati* and *H. spinatus* may represent a species complex; however, this asseveration needs additional data. All Rights Reserved © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Keywords: *Euryhaliotrema*; 28S rRNA gene; Cryptic species; Mexico; Monogenea; Snapper

Resumen

Se estudiaron los monogéneos que parasitan poblaciones silvestres de “pargos” o “huachinangos”, *Lutjanus guttatus* (Steindacher) en 2 localidades de la costa del Pacífico mexicano (Mazatlán, Sinaloa y Bahía de Chamela, Jalisco). Se recolectaron 5 especies de dactylogíridos de las branquias de sus hospederos: *Haliotrematoides guttati* (García-Vargas et al., 2008), *H. plectridium* Kristky and Mendoza-Franco en Kritsky, Tingbao, and Yuan (2009), *H. spinatus* Kristky and Mendoza-Franco en Kritsky et al. (2009), *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas,

* Corresponding author.

E-mail address: tocha76@hotmail.com (A. García-Vásquez).

Peer Review under the responsibility of Universidad Nacional Autónoma de México.



6. 9. Apéndice 9

Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea:Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas

Martin García-Varela, Ana L. Sereno-Uribe, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Omar Domínguez-Domínguez, Gerardo Pérez-Ponce de León

Journal of Helminthology

Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas

M. García-Varela^{1*}, A.L. Sereno-Uribe¹, C.D. Pinacho-Pinacho¹,
O. Domínguez-Domínguez² and G. Pérez-Ponce de León¹

¹Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, México: ²Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

(Received 24 October 2014; Accepted 18 January 2015)

Abstract

The diplostomid genus *Austrodiplostomum* currently contains two species, i.e. *A. mordax* and *A. ostrowskiae*. Adults of these species inhabit the intestine of cormorants of the genus *Nannopterum*, whereas larval forms (metacercariae) are found in the eyes (vitreous humor) of freshwater fishes. Records of both species have been established across a wide geographic range in the Americas. Diplostomid adults and metacercariae were collected from a wide geographical range that spans from south-eastern Mexico, southwards to Central and South America. Even though the diplostomid has been largely reported in Mexico as *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum*, our specimens were identified morphologically as *A. ostrowskiae*. Sequences of the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase (*cox 1*) were obtained for 86 individuals, including 15 adults recovered from the intestine of *Nannopterum brasiliense*, in five localities, and 71 metacercariae from the eyes of ten fish species, in 13 localities. Sequences were used to evaluate the genetic diversity, and to test conspecificity of these specimens with the available sequence of *A. ostrowskiae*. Sequences were aligned with another 12 taxa representing five genera of Diplostomatidae, forming a dataset of 104 taxa with 478 nucleotides. The genetic divergence estimated among the 86 sequenced individuals, and that of *A. ostrowskiae* from the double-crested cormorant, *Nannopterum auritus*, in the USA, was very low, ranging from 0 to 0.8%. The maximum likelihood (ML) and Bayesian consensus trees showed that all sequences nested within a monophyletic lineage, with strong bootstrap and Bayesian posterior probability support values (100/1.0). In conclusion, a link between the metacercariae in fish and the adults in cormorants was established, indicating also that a single species is found in the distribution range comprising southern USA, southwards to Venezuela. Previous records of this species, particularly from Mexico, need to be corrected.

*Fax: (525) 5550 0164
E-mail: garciav@unam.mx; garciav@ib.unam.mx



1. 10. Apéndice 10

Checklist of the helminth parasites of the genus *Profundulus* Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes, Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Martín García-Varela, Jesús S. Hernández-Orts, Carlos A. Mendoza-Palmero, Ana L. Sereno-Uribe, Emilio Martínez-Ramírez, Leopoldo Andrade-Gómez, Alejandra López-Jiménez, Eduardo Hernández-Cruz, Gerardo Pérez-Ponce de León

ZooKeys (2015) 523:1–30

Checklist of the helminth parasites of the genus *Profundulus* Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes, Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America

Carlos Daniel Pinacho-Pinacho^{1,2}, Martín García-Varela¹, Jesús S. Hernández-Orts¹, Carlos A. Mendoza-Palmero¹, Ana L. Sereno-Uribe¹, Emilio Martínez-Ramírez³, Leopoldo Andrade-Gómez¹, Alejandra López-Jiménez¹, Eduardo Hernández-Cruz¹, Gerardo Pérez-Ponce de León¹

1 Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, C. P. 14510, México, D. F., México **2** Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, C.P. 04510, México, D.F., México **3** Departamento de Investigación, Área de Acuacultura, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Hornos Núm. 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, 71230 Oaxaca, México

Corresponding author: Carlos Daniel Pinacho-Pinacho (danyboy_jd26@hotmail.com)

Academic editor: D. Gibson | Received 18 June 2015 | Accepted 27 August 2015 | Published 28 September 2015

<http://zoobank.org/35E4923C-71F1-4F7F-9DA2-CAFAC7E0F6D5>

Citation: Pinacho-Pinacho CD, García-Varela M, Hernández-Orts JS, Mendoza-Palmero CA, Sereno-Uribe AL, Martínez-Ramírez E, Andrade-Gómez L, López-Jiménez A, Hernández-Cruz E, de León GP-P (2015) Checklist of the helminth parasites of the genus *Profundulus* Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes, Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America. ZooKeys 523: 1–30. doi: 10.3897/zookeys.523.6088

Abstract

From December 2012 to November 2014, 267 fish belonging to the family Profundulidae (representing nine of the 11 species of the genus *Profundulus*) were collected in 26 localities of Middle-America, across southern Mexico, Guatemala, and Honduras, comprising the distribution range of the genus, and analyzed for helminth parasites. Additionally, a database with all ten available published accounts of the helminth parasite fauna of this genus (the only genus within the family) was assembled. Based on both sources of information, a checklist containing all the records was compiled as a tool to address future questions in the areas of evolutionary biology, biogeography, ecology and phylogeography of this host-parasite association. The helminth parasite fauna of this fish group consists of 20 nominal species, classified in 17 genera and 14 families. It includes six species of adult digeneans, five metacercariae, two monogeneans, one adult cestode, three adult nematodes and three larval nematodes. The profundulid

6. 11. Apéndice 11



An integrative taxonomic study reveals a new species of *Tylodelphys* Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico

Martín García-Varela, Ana. L. Sereno-Uribe, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Eduardo Hernández-Cruz y Gerardo Pérez-Ponce de León

Journal of Helminthology

An integrative taxonomic study reveals a new species of *Tylodelphys* Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico

M. García-Varela*, A.L. Sereno-Uribe, C.D. Pinacho-Pinacho,
 E. Hernández-Cruz and G. Pérez-Ponce de León

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, México

(Received 5 July 2015; Accepted 10 September 2015)

Abstract

Tylodelphys azteca n. sp. (Digenea: Diplostomidae) is described from adult specimens obtained from the intestine of the pied-billed grebe (*Podilymbus podiceps*) and the metacercariae found in the body cavity of freshwater fishes of the families Goodeidae and Cyprinidae in eight localities across central and northern Mexico. The new species is mainly distinguished from the other four described species of *Tylodelphys* from the Americas (*T. adulta*, *T. americana*, *T. elongata* and *T. brevis*) by having a forebody slightly concave, a larger ventral sucker, two larger pseudosuckers and by having between 2 and 7 eggs in the uterus. Partial DNA sequences of the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox1*), and the internal transcribed spacers (ITS1 + 5.8S + ITS2) of the ribosomal DNA, were generated for both developmental stages and compared with available sequences in GenBank of other congeners. The genetic divergence estimated among *Tylodelphys azteca* n. sp. and other congeneric species varied from 12 to 15% for *cox1*, and from 3 to 11% for ITS. In contrast, the genetic divergence among metacercariae and adults of the new species was very low, ranging between 0 and 1% for *cox1* and between 0 and 0.3% for ITS. Phylogenetic analyses inferred with both molecular markers using maximum likelihood and Bayesian inference placed the adults and their metacercariae in a single clade, confirming that both stages are conspecific. The morphological evidence and the genetic divergence, in combination with the reciprocal monophyly in both phylogenetic trees, support the hypothesis that the diplostomids found in the intestines of the pied-billed grebe bird and the body cavity from goodeid and cyprinid fishes in central and northern Mexico represent a new species.

Introduction

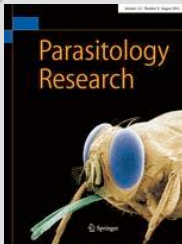
Modern taxonomic practices in helminths combine morphological data and DNA sequences, allowing the establishment of a link between larval and adult stages in different host species in an ecosystem. Recent studies on diplostomid trematodes illustrate the usefulness of such

approaches, with the internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA and the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox1*) as the most popular molecular markers used for the identification and delimitation of species in these trematodes (Chibwana *et al.*, 2013, 2015; Georgieva *et al.*, 2013; Blasco-Costa *et al.*, 2014; García-Varela *et al.*, 2015; Selbach *et al.*, 2015). Further, the development of diplostomid-specific primers flanking the barcode region (*cox1*), allowed the construction of a large barcode library of diplostomids that includes

*Fax: (525) 5550 0164

E-mails: garciav@unam.mx; garciav@ib.unam.mx

6. 12. Apéndice 12



Maritrema corai n. sp. (Digenea: Microphallidae) from the white ibis
Eudocimus albus (Linnaeus) (Aves: Threskiornithidae) in Mexico

Jesús S. Hernández-Orts, **Carlos Daniel Pinacho-Pinacho**, Martín
García-Varela y Aneta Kostadinova

Parasitology Research (2015)

Maritrema corai n. sp. (Digenea: Microphallidae) from the white ibis *Eudocimus albus* (Linnaeus) (Aves: Threskiornithidae) in Mexico

Jesús S. Hernández-Orts¹ · Carlos D. Pinacho-Pinacho¹ · Martín García-Varela¹ · Aneta Kostadinova²

Received: 25 July 2015 / Accepted: 1 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract *Maritrema corai* n. sp. is described based on material from the intestine of the white ibis *Eudocimus albus* (L.) (Threskiornithidae) in Mexico. The new species can be distinguished morphologically from all congeners by the unique combination of the following morphological features: a very long cirrus sac attenuated distally [cirrus sac to body length ratio 1:0.90–1.29 (mean 1:1.07)]; a large, elongate-oval seminal receptacle, located dorsally between the cirrus sac and ovary; and long, filiform, unarmed, evaginable cirrus. Phylogenetic analyses of 28S ribosomal DNA (rDNA) sequences for the new species and for *Maritrema* spp. and *Microphallus* spp. depicted strong support for the two genera (excluding *Microphallus fusiformis*) and revealed close relationships between *Ma. corai* n. sp. and the clade formed by *Maritrema novaezealandense* Martorelli, Fredensborg, Mouritsen & Poulin, 2004, *Maritrema heardi* (Kinsella & Deblock, 1994) and *Maritrema* cf. *eroliae*.

Keywords *Maritrema* · *Eudocimus albus* · Microphallidae · 28S rDNA · Phylogeny · North America

Introduction

Species of the microphallid genus *Maritrema* Nicoll, 1907 are cosmopolitan parasites of birds and occasionally mammals (Deblock 2008). Their life cycles involve gastropods as first intermediate hosts and crustaceans as second intermediate hosts and take place in brackish, marine or freshwater habitats (Deblock 1971). *Maritrema* is divided into two subgenera, *Maritrema (Maritrema)* Nicoll, 1907 for species characterised by a simple, slightly differentiated, unarmed genital pore and *Maritrema (Atriospinosum)* Deblock, 1973 for species with a modified genital pore, provided with spinous atrio-acetabular plate and subtegumentary muscular rings (Deblock 2008).

Despite the large diversity of species of *Maritrema* (about 65 species), a single species has so far been reported from Mexico, i.e. *Maritrema patulus* Coil, 1955 from the solitary sandpiper *Tringa solitaria* (Wilson) in the region of Salina Cruz, Oaxaca, Pacific coast of Mexico (Coil 1955).

In a study of parasites of the white ibis *Eudocimus albus* (L.) (Threskiornithidae) along the Atlantic and the Pacific coasts of Mexico, we collected numerous microphallid digeneans. Detailed morphological and molecular analyses revealed that this material represents a species new to science and the second species of *Maritrema* to be described from Mexico. This paper provides morphological and genetic characterisation of *Maritrema (Maritrema) corai* n. sp.

Materials and methods

Sample collection

Seventy-one adult white ibises were collected between 2006 and 2015 from 15 localities along the Atlantic and Pacific coasts of Mexico (see map in Fig. 1). The digestive tract of fresh birds was

✉ Jesús S. Hernández-Orts
jesus.s.hernandez@uv.es

¹ Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, CP 04510 Distrito Federal, México

² Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic



6. 13. Apéndice 13

Phylogenetic analysis using the 28S rRNA gene reveals that the genus *Paracreptotrema* Choudhury, Pérez-Ponce de León, Brooks and Daverdin, 2006 (Digenea: Allocreadiidae) is not monophyletic; description of two new genera and one new species

Gerardo Pérez-Ponce de León, Carlos Daniel Pinacho-Pinacho, Berenit Mendoza-Garfias, Anindo Choudhury y Martín García-Varela

Journal of Parasitology (2016)

PHYLOGENETIC ANALYSIS USING THE 28S rRNA GENE REVEALS THAT THE GENUS *PARACREPTOTREMA* (DIGENEA: ALLOCREADIIDAE) IS NOT MONOPHYLETIC; DESCRIPTION OF TWO NEW GENERA AND ONE NEW SPECIES

Gerardo Pérez-Ponce de León, Carlos D. Pinacho-Pinacho, Berenit Mendoza-Garfias, Anindo Choudhury*, and Martín García-Varela

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-153. C.P. 04510, México D.F., México. Correspondence should be sent to: ppdleon@ib.unam.mx

ABSTRACT: This study investigates the systematics of *Paracreptotrema* Choudhury, Pérez-Ponce de León, Brooks and Daverdin, 2006 using morphological data (stained whole mounts and scanning electron microscopy) and partial sequences of the 28S ribosomal rRNA gene, obtained from freshly collected material. In total, 484 specimens representing 4 species, i.e., *Paracreptotrema blancoi* (157), *Paracreptotrema profundulusi* (12), *Paracreptotrema rosenthali* (8), and *Paracreptotrema blancoi* sensu Salgado-Maldonado et al. (2011) (307) were collected. Existing museum depositions were also studied. The 28S rRNA gene sequences of these *Paracreptotrema* spp. were aligned, along with sequences from 22 other allocreadiids and 4 other non-allocreadiid xiphidiatan species. Bayesian inference and maximum likelihood analyses indicated a paraphyletic *Paracreptotrema* split into 3 clades: 1 comprising *P. blancoi* and *P. rosenthali* that was sister to a clade formed by 3 other species of allocreadiids (species of *Wallinia*, *Creptotrematina*, and *Auriculostoma*) typically found in characid fishes, a second clade formed solely by *Paracreptotrema heterandriae* as the sister taxon of the aforementioned species, and a third by *P. profundulusi* and specimens erroneously identified as *P. blancoi*. Two new taxa were erected to reflect these results: *Paracreptotrematoides* for *Paracreptotrema heterandriae*, and *Pseudoparacreptotrema* for *Paracreptotrema profundulusi* and *P. macroacetabulata* (the species erroneously identified as *P. blancoi* from profundulids across Middle America). Closer consideration of the morphology corroborates these findings. The revised systematics also indicated that *Paracreptotrema* spp. are found in poeciliids, whereas *Pseudoparacreptotrema* spp. parasitize profundulids. The study demonstrates the value of an integrative taxonomy approach to address the apparently complicated systematics of the allocreadiids.

The allocreadiid genus *Paracreptotrema* was established by Choudhury et al. (2006) for *Paracreptotrema blancoi* Choudhury, Pérez-Ponce de León, Brooks and Daverdin, 2006, an intestinal parasite of the poeciliid *Priapichthys annectens* (Regan, 1907) from the Río Orosí, Guanacaste Province, Costa Rica. In the same study, *Felldistomum mendezi* Sogandares-Bernal, 1955, a parasite of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi* (Steindachner, 1878) from Gatun Lake in Panama, was transferred to *Paracreptotrema*. Subsequently, 3 other congeners were described, all from Mexico: *Paracreptotrema profundulusi* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano and Martínez-Ramírez, 2011, in killifishes *Profundulus punctatus* (Günther, 1866) and *Profundulus balsanus* Ahl 1935 from the Tehuantepec and Atoyac-Verde River basins respectively; *Paracreptotrema heterandriae* Salgado-Maldonado, Caspeta-Mandujano and Vázquez, 2012, in the poeciliid *Pseudoxiphophorus bimaculatus* (Heckel, 1848) from the Antigua River basin, in Veracruz; and *Paracreptotrema rosenthali* Bautista-Hernández, Monks, Pulido-Flores, and Miranda, 2015 in 2 poeciliids, *Xiphophorus malinche* Rauchenberger, Kallman and Morizot, 1990, and *Pseudoxiphophorus jonesii* (Günther, 1874), from the Malila River, of the Panuco River basin (Salgado-Maldonado et al., 2011, 2012; Bautista-Hernández et al., 2015). In addition, Salgado-Maldonado et al. (2011) reported *Paracreptotrema blancoi* in 3 species of *Profundulus* Hubbs, 1924 from the Tehuantepec, Atoyac-Verde and Papagayo River basins, and in some localities sympatrically with *Paracreptotrema profundulusi*. Pinacho-Pinacho et al. (2014) also reported *P. blancoi* from 7 localities in separate river basins of the Oaxacan lowlands. Salgado-Maldonado et al. (2014) expanded the host and distribution records of *P. blancoi* in 4 species of *Profundulus*

from localities in Oaxaca and Chiapas, Mexico, and in Guatemala and El Salvador. In a recent comprehensive checklist of helminth parasites of profundulids (Pinacho-Pinacho et al., 2015) *Paracreptotrema blancoi* is listed as occurring in 8 species of *Profundulus* and in 38 localities across Middle America. Thus, the genus currently comprises 5 species that parasitize cyprinodontiform fishes in Middle America; the distribution range extends from Gatun Lake in Panama in the south, northward to the Papagayo River basin in Guerrero, and from the southwestern Pacific slope of Mexico in the west to La Antigua and Panuco River basins in Veracruz, on the Atlantic slope of Mexico.

All 5 species of *Paracreptotrema* were described from stained whole mounts and without the benefit of molecular data or surface ultrastructure information (scanning electron microscope [SEM] studies). The reportedly wide distribution of *P. blancoi* prompted us to examine specimens reported by Salgado-Maldonado et al. (2011), deposited in the Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Mexico City; our observations suggested that these specimens may not be of *P. blancoi*, and raised questions about some of the morphological characters used to distinguish species of *Paracreptotrema*.

Over the past several months, we sampled freshwater cyprinodontiforms (species of *Profundulidae* and *Poeciliidae*) in several areas of Middle America, including localities in Guatemala, Honduras, Costa Rica, and southern Mexico (in rivers across the states of Hidalgo, Oaxaca, and Chiapas), where species of *Paracreptotrema* have been reported. As a matter of convenience, in this paper we use Middle America for the region between the southern boundary of the Nearctic biogeographic region in Mexico and the southern border of Panama in Central America, thereby avoiding current controversy over the term Mesoamerica (Winker, 2011; Sánchez-González et al., 2013). Our sampling included the type hosts and localities of *P. profundulusi*, and *P. rosenthali*, both in Mexico, and *P. blancoi* in Costa Rica, which allowed us to reassess relationships among members of the

Received 2 July 2015; revised 26 October 2015; accepted 5 November 2015.

* Division of Natural Sciences, St. Norbert College, 100 Grant Street, DePere, Wisconsin 54115.

DOI: 10.1645/15-815