



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

**VALIDACIÓN DE LA ESPECIE *Rhabdochona ictaluri* (NEMATODA:  
RHABDOCHONIDAE) PARÁSITA DE PECES ICTALÚRIDOS (ICTALURIDAE) DE  
MÉXICO, EN UN CONTEXTO INTEGRATIVO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**OMAR LAGUNAS CALVO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO OCTUBRE 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

**VALIDACIÓN DE LA ESPECIE *Rhabdochona ictaluri* (NEMATODA:  
RHABDOCHONIDAE) PARÁSITA DE PECES ICTALÚRIDOS (ICTALURIDAE) DE  
MÉXICO, EN UN CONTEXTO INTEGRATIVO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**OMAR LAGUNAS CALVO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO OCTUBRE 2017**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/620/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **7 de agosto de 2017** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del (la) alumno(a) **LAGUNAS CALVO OMAR** con número de cuenta **516013358** con la tesis titulada "**Validación de la especie *Rhabdochona ictaluri* (Nematoda: Rhabdochonidae) parásita de peces ictalúridos (Ictaluridae) de México, en un contexto integrativo**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR:**

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI  
Vocal: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA  
Secretario: DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID  
Suplente: DR. GORGONIO RUIZ CAMPOS  
Suplente: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 3 de octubre de 2017

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
Coordinador del Programa



AGNS/MJFM/ASR/ipp

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca CONACYT 584259 otorgada para realizar mis estudios de posgrado

Al proyecto “Análisis de patrones biogeográficos y gradientes de diversidad de ácaros acuáticos (Trombidiformes: Hydrachnidiae) de la Península de Baja California” PAPIIT-IN218414 -UNAM a cargo del Dr. Gerardo Rivas Lechuga por el apoyo económico en la salidas de campo realizadas a los estados de Chihuahua, Durango, Sonora y Zacatecas.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN202617 otorgado al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por los recursos destinados a la obtención de secuencias de DNA de distintas especies del género *Rhabdochona* Railliet, 1916 empleadas en el presente estudio.

A la Biól. Ana Ofelia Santacruz Vázquez por la ayuda para obtener las secuencias de DNA de distintas especies del género *Rhabdochona* empleadas en el presente estudio

Al M. en C. David Iván Guadalupe Hernández Mena por la ayuda en la realización de los análisis moleculares incluidos en el presente estudio.

Al M. en C. Luis García Prieto por las facilidades prestadas para la obtención de literatura especializada y el préstamo ejemplares de la Colección Nacional de Helmintos.

A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias por las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido y microscopia en campo claro de distintas estructuras diagnosticas de ejemplares pertenecientes al género *Rhabdochona*.

A los pescadores Jaime Aarón Guzmán Nájera y Saúl Montoya por su apoyo en la captura de los ejemplares.

A los coordinadores y administrativos del Posgrado en Ciencias Biológicas:

Dr. José Martín García Varela

Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes

M. en C. Lilia Judith Espinosa Sánchez

Erica Flores Téllez

Por todo el apoyo brindado para el ingreso al Posgrado

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Rogelio Aguilar Aguilar

Dr. Hugo Harlan Mejía Madrid

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Por aceptar dirigir mi trabajo, por sus valiosos comentarios y sugerencias, así como por todo el apoyo brindado.

A los miembros de mi jurado:

Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Dr. José Martín García Varela

Dr. Juan José Morrone Lupi

Por sus valiosos comentarios y sugerencias, así como por todo el apoyo brindado.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
<i>Las especies y su delimitación</i> .....	4
<i>La delimitación de especies en el contexto de la Taxonomía Integrativa</i> .....	5
<i>El problema taxonómico de las especies <i>Rhabdochona ictaluri</i> Aguilar-Aguilar, Rosas-Valdez y Pérez-Ponce de León, 2010 y <i>Rhabdochona kidderi</i> Pearse, 1936</i> .....	6
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
<i>Caracterización morfológica</i> .....	9
<i>Análisis estadísticos</i> .....	9
<i>Caracterización molecular</i> .....	10
<i>Alineamiento múltiple, concatenado, cladogramas y cálculo de distancias genéticas</i> .....	14
RESULTADOS.....	15
<i>Datos morfológicos</i> .....	16
<i>Caracterización morfológica</i> .....	18
<i>Rhabdochona ictaluri</i> .....	18
<i>Rhabdochona kidderi</i> .....	22
<i>Análisis estadísticos</i> .....	25
<i>Base de datos para COX1</i> .....	29
<i>Cladogramas</i> .....	29
<i>Divergencias genéticas</i> .....	32
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	41

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

**Figura 1.** Microfotografías de los adultos de *Rhabdochona ictaluri* capturadas con microscopía óptica (A-D) y microscopía electrónica de barrido (E-H). A) Porción anterior del macho a 10x; B) porción anterior de la hembra a 40x mostrando los dientes basales; C) espícula derecha e izquierda del macho a 20x; D) huevos sin filamentos de la hembra a 40x; E) detalle del prostoma mostrando seis dientes en la base del vestíbulo; F) detalle de la región posterior del macho mostrando el área rugosa; G); posición del deiridio en el primer tercio del cuerpo; H) detalle del deiridio.

**Figura 2.** Microfotografías de los adultos de *Rhabdochona kidderi* capturadas con microscopía óptica (A-D) y microscopía electrónica de barrido (E-H). A) Porción anterior del macho a 10x; B) porción anterior de la hembra a 40x; C) espícula derecha e izquierda del macho a 20x; D) huevos sin filamentos de la hembra a 40x; E) detalle del prostoma sin dientes en la base del vestíbulo; F) detalle de la región posterior del macho; G); posición del deiridio en el primer tercio del cuerpo; H) detalle del deiridio.

**Figura 3.** Agrupamiento de los machos de *Rhabdochona ictaluri* y *R. kidderi* en el espacio morfométrico. Códigos de los vectores: BL= longitud del cuerpo, MxBW= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, LEL= longitud espícula izquierda, FL= longitud del fuste, FP= porcentaje que representa el fuste, RSL=Longitud de la espícula derecha, RBSL=radio entre las espículas, CL= largo de la cauda.

**Figura 4.** Agrupamiento de las hembras de *Rhabdochona ictaluri* y *R. kidderi* en el espacio morfométrico. Códigos de los vectores: BL= longitud del cuerpo, MxBW= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, DV= posición de la vulva desde el extremo posterior del cuerpo, EL= largo de los huevos, EW= ancho de los huevos, CL= largo de la cauda.

**Figura 5.** Cladograma derivado de las secuencias del marcador mitocondrial *COX1* para *Rhabdochona* spp. utilizando el análisis de Máxima Verosimilitud (InL=-2750.471585). Los valores de soporte junto a los nodos corresponden al Bootstrap. La barra de escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las abreviaturas en la figura representan las siguientes localidades: CCC= Cenote Choo-ha, Quintana Roo; CPC= Cenote Punta Laguna, Quintana Roo; HAO= Camino a Hierve el Agua, Oaxaca; MC= Miñaca, Chihuahua; MM= La Minzita, Michoacán; NDD= Nombre de Dios, Durango; PA= Plan de Ayala, Tamaulipas; PM= Pátzcuaro, Michoacán; RAP= Río Ahuehuello, Puebla; RJ= Río Jalpan, Querétaro; SHO= Santa María Huatulco, Oaxaca; SJT= San Juan Teita, Oaxaca; SLP= Axtla de Terrazas, San Luis Potosí; SZ= Sain Alto, Zacatecas y TM= Tocumbo, Michoacán.

**Figura 6.** Cladograma derivado de las secuencias del marcador mitocondrial *COX1* para *Rhabdochona* spp. utilizando el análisis de Inferencia Bayesiana (árbol de la regla de la mayoría del 50%). Los valores de soporte asociados a los nodos junto a las ramas corresponden a la probabilidad posterior (> 0.95). La

barra de escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las abreviaturas en la figura representan las siguientes localidades: CCC= Cenote Choo-ha, Quintana Roo; CPC= Cenote Punta Laguna, Quintana Roo; HAO= Camino a Hierve el Agua, Oaxaca; MC= Miñaca, Chihuahua; MM= La Minzita, Michoacán; NDD= Nombre de Dios, Durango; PA= Plan de Ayala, Tamaulipas; PM= Pátzcuaro, Michoacán; RAP= Río Ahuehuello, Puebla; RJ= Río Jalpan, Querétaro; SHO= Santa María Huatulco, Oaxaca; SJT= San Juan Teita, Oaxaca; SLP= Axtla de Terrazas, San Luis Potosí; SZ= Sain Alto, Zacatecas y TM= Tocumbo, Michoacán.

**Cuadro 1.** Localidades y huéspedes (familia/especie) muestreadas en el presente estudio. Se incluyen las coordenadas de los sitios de captura. Códigos para los encabezados: Nh= Número de huéspedes examinados; Pv (%)= Prevalencia, expresada en porcentaje; Ab= Abundancia; Ip= Intensidad Promedio. Códigos al interior del cuadro: NC= No calculado.

**Cuadro 2.** Especímenes de *Rhabdochona* spp. y *Spinitectus* spp. examinados en el presente estudio. Se incluye la especie de huésped y la familia a la cual pertenece, así como la localidad y las coordenadas de captura. De igual forma se muestran los números de acceso de GenBank, el número de secuencias obtenidas para *COX1* de cada especie de nematodo y la referencia.

**Cuadro 3.** Medidas de los caracteres diagnósticos obtenidas para cada sexo de cada una de las especies analizadas en el presente estudio. Las medidas se muestran en un intervalo (con promedio y desviación estándar). El signo “?” indica datos faltantes.

**Cuadro 4.** Resumen del análisis de la función discriminante para 40 machos de *R. ictaluri* y *R. kidderi* con 11 variables morfométricas. En rojo se indican los valores que tienen un aporte mayor a la función discriminante.

**Cuadro 5.** Resumen del análisis de la función discriminante para 40 hembras de *R. ictaluri* y *R. kidderi* con siete variables morfométricas. En rojo se indican los valores que tienen un aporte mayor a la función discriminante.

**Cuadro 6.** Valores de la contribución de 11 variables morfométricas (machos) y siete (hembras) a las componentes del PCA de *R. ictaluri* y *R. kidderi*. Códigos de las variables: BL= longitud del cuerpo, MxBW= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, LEL= longitud espícula izquierda, FL= longitud del fuste, FP= porcentaje que representa el fuste, RSL=longitud de la espícula derecha, RBSL=radio entre las espículas y DV= posición de la vulva desde el extremo posterior del cuerpo.

**Cuadro 7.** Divergencias genéticas entre las secuencias del marcador COX1 obtenidas entre los géneros *Rhabdochona* y *Spinitectus*. Los colores indican el huésped *Notropis boucardi* y *Gila conspersa*.

**Cuadro 8.** Divergencias genéticas entre las secuencias del marcador COX1 obtenidas entre poblaciones de las especies *Rhabdochona ictaluri* y *Rhabdochona kidderi*. Los colores indican la localidad *Cenote Choo-ha* y el *Cenote Punta Laguna*, Quintana Roo.

## RESUMEN

Las especies son las unidades básicas para la mayoría de los estudios biológicos; sin embargo, la delimitación de especies es un tema complejo. Las discusiones recientes sobre la delimitación de especies coinciden en la integración de diferentes fuentes de evidencia para delimitar a las especies morfológicas. En esta tesis probamos la validez de dos especies nominales de nematodos que actualmente están bajo una incertidumbre taxonómica. Un total de 12 especies del género *Rhabdochona* han sido registradas en diversas localidades y especies de huésped en México. Entre éstas, la especie *Rhabdochona ictaluri* asociada a peces ictalúridos del centro y norte de México es la más recientemente descrita. La validez de este taxón fue refutada con base en una aparente similitud morfológica con *R. kidderi*, y por lo tanto considerada como un sinónimo. Este conflicto sirve como modelo para poner a prueba estas hipótesis en el contexto de la taxonomía integrativa, utilizando evidencia biogeográfica, filogenéticas, la especificidad hospedatoria y la variación genética, las cuales no se ha considerado hasta ahora.

Para probar esta hipótesis, se comparó la diversidad genética y morfológica de *R. ictaluri* y *R. kidderi* de diferentes huéspedes en distintas localidades. La diversidad genética se analizó utilizando secuencias del marcador molecular *COX1* de diferentes morfo-especies del género *Rhabdochona*, mientras que el análisis morfológico se concentró sólo en especímenes de *R. ictaluri* y *R. kidderi*. Los resultados mostraron una variación morfológica y molecular significativa entre ambos taxones de nematodos,

permitiendo delimitarlos a nivel de especie, lo que sugirió que la inclusión de evidencia derivada de diferentes fuentes de información son fundamentales para evitar evaluaciones parciales basadas en caracteres morfológicos.

## **ABSTRACT**

Species are the basic unit for most biological studies; however, species delimitation is currently a highly complex issue. Recent discussions about species delimitation agree in the integration of different sources of evidence in order to effectively separate morphological species. In this thesis, we tested the validity of two nematode species. A total of 12 species of the genus *Rhabdochona* were recorded from diverse localities and host species in Mexico. *Rhabdochona ictaluri* from ictalurid fishes from central and north Mexico is the most recent described and the validity of this taxon was rebutted on the basis of an apparent morphological similarity, and thus considered as a synonym of *R. kidderi*. We consider this conflict as a model to test contradictory opinions through the context of integrative taxonomy, using evidence derived from diverse aspects inherent to the species, such as, biogeographic affinities, phylogenetic relationships, host specificity and genetic variability, which has not been considered to date.

To test our hypothesis, we analyzed the genetic and morphological diversity of *R. ictaluri* and *R. kidderi* from different hosts localities in an integrative context. Genetic diversity analyzed using *COX1* molecular marker sequences from different morphospecies of the genus *Rhabdochona*, while the morphological analysis focused only on specimens of *R. ictaluri* and *R. kidderi*.

The results showed a significant morphological and molecular variation between both nematode taxa, allowing them to be established as different species.

Our conclusions suggest that the inclusion of evidence derived from different sources could be very useful for delimiting species and reduce the impact of partial evaluations that rely heavily morphological characters.

## INTRODUCCIÓN

### *Las especies y su delimitación*

Las especies son las unidades básicas de la mayor parte de los estudios biológicos, sin embargo, la delimitación de especies es un tema complejo (Sites y Marshall, 2004; McKay et al., 2013). Cuando se revisa la literatura biológica al respecto, es posible encontrar que existen numerosas definiciones de especie (Mayden, 1997; de Queiroz, 2007). Estas definiciones reflejan los distintos tipos de preguntas evolutivas y/o de organismos en los cuales sus autores estaban interesados al momento de establecerlas o delimitarlas. Por tanto, un concepto de especie puede ser evaluado en términos de una meta o propósito particular (Templeton, 1989).

Actualmente, un gran número de especies se delimitan con base en comparaciones morfológicas de especímenes de museo y las descripciones publicadas de nuevas especies comúnmente incluyen a un espécimen designado como holotipo y una lista de características morfológicas diagnósticas (Wiens y Servedio, 2000). Sin embargo, esta manera de delimitar especies presenta algunos problemas desde el punto de vista biológico, ya que ignora propiedades biológicas inherentes a la especie como la variación genética, la distribución geográfica y las relaciones ecológicas (Mayr, 1966; Templeton, 1989; Wiens y Servedio, 2000). Otra problemática a considerar es que a veces la variación continua de los caracteres morfológicos puede confundir a los taxónomos (McKay et al., 2013); esto se debe a que dichos caracteres son tratados de forma subjetiva o son evaluados de forma equívoca al momento de

asignarlos como sinapomorfías (Hawkins, 2000). Este efecto ha sido discutido especialmente en el caso de los complejos de especies (McKay et al., 2013).

### ***La delimitación de especies en el contexto de la Taxonomía Integrativa***

Para reducir el impacto que tiene la delimitación de especies basada en una sola propiedad biológica respecto al artificio de la sobre o subestimación de estas entidades, es necesario incluir diferentes fuentes de información biológica al momento de delimitarlas. En este sentido, el marco conceptual de la taxonomía integrativa resulta útil. La taxonomía integrativa es una disciplina biológica que permite delimitar las unidades de la biodiversidad desde perspectivas múltiples y complementarias, como la ecología, la biogeografía, la genética de poblaciones, la biología comparada, entre otras, con la finalidad de reconocer especies (Dayrat, 2005, Will et al., 2005; Pante et al., 2015). En este contexto, una especie se define como la población más inclusiva de individuos que poseen potencial para la cohesión fenotípica a través de mecanismos como el intercambio genético y demográfico, y se sitúa dentro del marco del concepto cohesivo de especie (Templeton, 1989). Este es el concepto que se adoptará en este trabajo.

De esta forma, la evidencia morfológica es combinada con evidencia molecular para detectar variaciones intraespecíficas que posiblemente estén siendo ignoradas por una morfología relativamente estable (Hey, 2006). Así mismo, otros aspectos importantes de la especie como sus relaciones ecológicas, su área de distribución y sus relaciones filogenéticas son considerados (Page, 2003; Dayrat, 2005).

Un modelo de estudio adecuado para evaluar el impacto de la inclusión o exclusión de diversas fuentes de evidencia en la delimitación de especies, deberá incluir una especie delimitada a través de caracteres morfológicos, cuyas relaciones ecológicas y filogenéticas, así como su distribución no hayan sido evaluadas. En este sentido, la especie *Rhabdochona ictaluri* cumple con las características mencionadas.

***El problema taxonómico de las especies Rhabdochona ictaluri* Aguilar-Aguilar, Rosas-Valdez y Pérez-Ponce de León, 2010 y *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936**

Hasta el año 2012, existía el registro de un total de 12 especies del género *Rhabdochona* en distintas localidades y especies de huésped en México (Garrido-Olvera et al., 2006; Pérez-Ponce de León et al., 2009; Aguilar-Aguilar et al., 2010). De estas, *Rhabdochona ictaluri* es la especie más recientemente descrita en el país. Esta especie ha sido recuperada de los huéspedes *Ictalurus pricei* (Rutter) e *Ictalurus dugesii* (Bean) capturados en los estados de Durango y Nayarit.

Sin embargo, en la revisión de la especie *Rhabdochona kidderi* de Moravec et al. (2012) se sugiere que *R. ictaluri* debe ser considerada como un especie sinónima de *R. kidderi*. Para estos autores, los caracteres diagnósticos utilizados para la descripción de *R. ictaluri* (como son la presencia de dientes basales en el prostoma, la ausencia de una barba dorsal en la espícula izquierda y la relación longitudinal entre las espículas) no son suficientes para considerarla

una nueva especie, debido a que en algunas poblaciones, la especie *R. kidderi* presenta caracteres similares producto de su variabilidad morfológica.

Aparentemente, estos autores ignoraron aspectos inherentes a la especie, como su afinidad biogeográfica, las relaciones filogenéticas y ecológicas con sus huéspedes definitivos y la variabilidad genética, lo que permite explorar la posibilidad que estas especies sean dos entidades diferentes o especies claramente delimitables en un contexto integrativo.

## **HIPÓTESIS**

Las especies *Rhabdochona kidderi* de distribución neotropical y *Rhabdochona ictaluri* distribuida en la región neártica representan dos entidades distintas, debido a sus diferencias morfológicas, biogeográficas y ecológicas; y el análisis integrativo de dichas entidades mostrará un grado de divergencia significativo que permita diferenciarlas como dos especies.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Evaluar mediante análisis moleculares y morfológicos, si las especies *Rhabdochona kidderi* y *Rhabdochona ictaluri*, actualmente sinónimas, son dos especies diferentes.

**Objetivos particulares:**

Realizar una caracterización molecular de diferentes especies del género *Rhabdochona*, que sirvan de marco de referencia para delimitar *R. ictaluri* y *R. kidderi*.

Realizar un análisis morfométrico de diferentes poblaciones de las morfoespecies *R. ictaluri* y *R. kidderi* con la finalidad de delimitar a ambas especies.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Durante 2015 y 2016 se capturaron distintas especies de peces dulceacuícolas, mediante el uso de distintos artes de pesca, en algunas localidades de México con el objetivo de obtener nematodos pertenecientes al género *Rhabdochona* (Cuadro 1). Los rabdocónidos fueron recuperados a través de un examen parasitológico general que se realizó a los huéspedes en un máximo de 24 horas posteriores a su captura. Para ello, el intestino de cada pez fue extraído y colocado en cajas Petri con solución salina al 0.75 %. Posteriormente, el intestino se examinó bajo el microscopio estereoscópico con ayuda de agujas de disección. Los parásitos recuperados se fijaron en etanol absoluto para la extracción del material genético o en formol salino caliente al 4% para realizar la determinación a nivel de morfoespecie. Los parásitos y los huéspedes fueron identificados con ayuda de literatura especializada.

### **Caracterización morfológica**

Los nematodos preservados en formol fueron colocados en un portaobjetos con una gota de glicerina y agua destilada en proporción 1:1, y cubiertos con un cubre objetos con la finalidad de aclarar la cutícula para hacer visibles las estructuras internas (Lamothe-Argumedo, 1997). Un total de 40 nematodos de la especie *R. ictaluri* y 30 de *R. kidderi* (20 machos y 20 hembras por especie) fueron fotografiados con la ayuda de una cámara de la marca Media-Cybernetics modelo Evolution-MP incorporada a un microscopio fotónico invertido de la marca OLYMPUS modelo IX81 en un aumento de 10X, 20X o 40X dependiendo de la estructura interna que se observara. Con las fotografías obtenidas, se realizaron observaciones y medidas de las estructuras diagnósticas de los nematodos con ayuda del programa Image-Pro Plus 7.0. Adicionalmente, se tomaron microfotografías con un Microscopio electrónico de barrido (MEB) marca Hitachi modelo SU1510 a 10kilovolts. Para ello, los nematodos fijados en formol fueron deshidratados en alcoholes graduales, secados en punto crítico con CO<sub>2</sub>, montados sobre platinas metálicas con pasta de plata y cubiertos con oro. Las imágenes obtenidas tanto con luz clara como con MEB fueron utilizadas para caracterizar morfológicamente a las especies *R. ictaluri* y *R. kidderi*.

### **Análisis estadísticos**

Con las medidas obtenidas, se elaboró una matriz de 11 variables métricas (medidas somáticas) en el caso de los machos y 10 variables en las hembras. La igualdad de varianzas entre los grupos se examinó mediante la prueba F. Los valores de las variables morfométricas se estandarizaron y se usaron para

realizar un análisis de función discriminante estándar para evidenciar las diferencias significativas entre los ejemplares de las dos poblaciones analizadas. Complementariamente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para explorar y describir los patrones de variación entre los datos, con el objetivo de visualizar el agrupamiento de especímenes en el espacio morfométrico (Agustí et al., 2005). Para los análisis de función discriminante y PCA, se seleccionaron 20 individuos de cada sexo. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA versión 7.1 (StatSoft Inc 2005).

### ***Caracterización molecular***

Los nematodos preservados en alcohol absoluto fueron transferidos a tubos de 0.5 ml con 150  $\mu$ l de agua ultrapura por aproximadamente 10 minutos para eliminar el exceso de alcohol. Posteriormente, el agua se reemplazó por 25  $\mu$ l de *Extraction solution* y 6.25  $\mu$ l de *Tissue Preparation Solution* incluidos en el kit de extracción REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA). Las muestras se incubaron por un lapso de 10 a 60 minutos a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, el tubo se colocó en un termociclador modelo PTC100, MJ Research Inc (Global Medical Instrumentation Inc, Ramsey, USA) a 95°C durante tres minutos. Para detener la reacción fueron añadidos 25  $\mu$ l de la *Neutralization Solution B* y mezclados mediante vórtex. Los productos de la extracción se almacenaron en tubos de 0.5 ml previamente rotulados con la información relacionada al nematodo y se anotó en la bitácora del laboratorio.

Los productos de la extracción fueron empleados como templado para amplificar el gen de la citocromo oxidasa subunidad 1 (COX1) con los primers COLint-F (TGATTGGTGGTTTTGGTAA) y COLint-R (ATAAGTACGAGTATCAATATC) mediante una Reacción de la Cadena de la Polimerasa o PCR (Casiraghi et al., 2001). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µl: 2.5 µl de Buffer 10XA, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2.5 µl de dNTP's 2mM, 1 µl de cada primer, 0.125 µl de *Taq* Vivantis, 14.375 µl de agua bidestilada y 2 µl de DNA. Las muestras se incubaron en un termociclador modelo PTC100, MJ Research Inc. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: paso 1: desnaturalización a 94°C por dos minutos, paso 2: 94°C por 30 segundos, paso 3: alineación de primers a 45°C, paso 4: extensión a 72°C por dos minutos. Los pasos del 2 al 4 fueron repetidos 35 veces. Paso 6: 72°C por siete minutos, paso 7: 4°C para finalizar. Los productos amplificados se evaluaron por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 1% en un buffer de Tris-Boratos-EDTA a 95 volts durante 45 minutos. Las bandas resultantes fueron visualizadas a través de una cámara de luz ultravioleta.

Los productos de PCR amplificados se procesaron en un secuenciador automático ABI Prism modelo 310 Perkin Elmer. Los electrofenogramas resultantes se exportaron al programa de cómputo Geneious versión 5.0.4. (Drummond et al., 2010) con la finalidad de editar las secuencias para obtener un consenso. Adicionalmente, se obtuvieron secuencias del género *Rhabdochona* disponibles en la base de datos del GenBank (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Localidades y huéspedes (familia/especie) muestreadas en el presente estudio. Se incluyen las coordenadas de los sitios de captura. Códigos para los encabezados: Nh= Número de huéspedes examinados; Pv (%)= Prevalencia, expresada en porcentaje; Ab= Abundancia; Ip= Intensidad Promedio. Códigos al interior del cuadro: NC= No calculado.

Localidad	Coordenadas	<i>Rhabdochona</i> spp. (Individuos)	Nh	Pv (%)	Ab	Ip
<b>Familia Characidae</b>						
<i>Astyanax aeneus</i> (Günter)						
Frontera, Tabasco	17° 48' 24"N, 93° 00' 58" W	No encontrados	6	0	0	0
<i>Astyanax</i> sp.						
Frontera, Tabasco	17° 48' 24" N, 93° 00' 58" W	No encontrados	2	0	0	0
Sain Alto, Zacatecas	23° 34' 40" N, 103° 20' 48" W	No encontrados	2	0	0	0
<b>Familia Cichlidae</b>						
<i>Cichlasoma trimaculatum</i> (Günter)						
Huaquechula, Puebla	18° 46' 13" N, 98° 32' 09" W	No encontrados	1	0	0	0
<b>Familia Cyprinidae</b>						
<i>Gila conspersa</i> Garman						
Sain Alto, Zacatecas	23° 34' 40" N, 103° 20' 48" W	<i>Rhabdochona canadensis</i> (23)	30	33.33	0.77 ± 2.22	2.3 ± 3.36
<i>Gila</i> sp.						
Miñaca, Chihuahua	28° 13' 40" N, 107° 24' 52" W	<i>Rhabdochona canadensis</i> (1)	1	100	1 ± 0.0	1 ± 0.0
<b>Familia Goodeidae</b>						
<i>Ilyodon whitei</i> Meek						
Huaquechula, Puebla	18° 46' 13" N, 98° 32' 09" W	<i>Rhabdochona ahuehuellensis</i> (33)	21	NC	NC	NC
<b>Familia Heptapteridae</b>						
<i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)						
Frontera, Tabasco	17° 48' 24" N, 93° 00' 58" W	<i>Rhabdochona</i> sp. (2)	1	100	2 ± 0.0	1 ± 0.0
<b>Familia Ictaluridae</b>						
<i>Ictalurus pricei</i> (Rutter)						
Nombre de Dios, Durango	23° 47' 22" N, 104° 18' 09" W	<i>Rhabdochona ictaluri</i> (171)	15	80	11.40 ± 11.93	14.25 ± 11.93
<b>Familia Poeciliidae</b>						
<i>Gambusia sexradiata</i> Hubbs						
Frontera, Tabasco	17° 48' 24" N, 93° 00' 58" W	No encontrados	3	0	0	0
<i>Poecilia mexicana</i> Steindachner						
Mitla, Oaxaca	16° 55' 18" N 96° 24' 22" W	No encontrados	11	0	0	0
<i>Poecilia</i> sp.						
Huaquechula, Puebla	18° 46' 13" N, 98° 32' 09" W	No encontrados	17	0	0	0
<i>Poeciliopsis gracilis</i> (Heckel)						
Mitla, Oaxaca	16° 55' 18" N 96° 24' 22" W	No encontrados	19	0	0	0
<b>Familia Rivulidae</b>						
<i>Kryptolebias marmoratus</i> (Poey)						
Frontera, Tabasco	17° 48' 24" N, 93° 00' 58" W	No encontrados	5	0	0	0

**Cuadro 2.** Especímenes de *Rhabdochona spp.* y *Spinitectus spp.* utilizados en el presente estudio. Se incluye la especie de huésped y la familia a la cual pertenece, así como la localidad y las coordenadas de captura. De igual forma se muestran los números de acceso de GenBank o la clave del identificador de la muestra asignado en el presente estudio, el número de secuencias obtenidas para *COX1* de cada especie de nematodo y la referencia.

Huésped	Familia	Localidad	Coordenadas	Genbank (clave)	Secuencias	Referencia
<b><i>Rhabdochona ahuehuellensis</i></b> Mejía-Madrid y Pérez-Ponce de León, 2003						
<i>Ilyodon whitei</i> Meek	Goodeidae	Huaquechula, Puebla	18° 46' 13" N 98° 32' 09" W	Pendiente (Om20-22)	3	Presente estudio
<b><i>Rhabdochona canadensis</i></b> Moravec & Arai 1971						
<i>Notropis boucardi</i> (Günther)	Cyprinidae	San Juan Teita, Oaxaca	17° 05' 37" N 97° 24' 56" W	Pendiente (Om7-9)	3	Presente estudio
<i>Gila conspersa</i> Garman	Cyprinidae	Sain Alto, Zacatecas	23° 34' 40" N 103° 20' 48" W	Pendiente (Om10-12)	3	Presente estudio
		Miñaca, Chihuahua	28° 13' 40" N 107° 24' 52" W	Pendiente (Om23)	1	Presente estudio
<b><i>Rhabdochona ictaluri</i></b>						
<i>Ictalurus pricei</i> (Rutter)	Ictaluridae	Nombre de Dios, Durango	23° 47' 22" N 104° 18' 09" W	Pendiente (Om25, 27-28, 31-32)	5	Presente estudio
<b><i>Rhabdochona kidderi</i></b>						
<i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)	Heptapteridae	Cenote Choo- ha, Quintana Roo.	20° 28' 09" N 87° 46' 03" W	Pendiente (131A)	1	Presente estudio
		Cenote Punta Laguna, Quintana Roo.	20° 38' 56" N 87° 38' 11" W	Pendiente (132-133A)	2	Presente estudio
<b><i>Rhabdochona lichtenfelsi</i></b> Sánchez-Alvarez, García-Prieto y Pérez-Ponce de León, 1998						
<i>Goodea atripinnis</i> Jordan	Goodeidae	Tocumbo, Michoacán	19° 42' 07" N 102° 30' 58" W	DQ990995	1	
		La Minzita, Michoacán	19° 38' 40" N 101° 16' 28" W	DQ990987	1	Mejía-Madrid et al., (2007)
		Pátzcuaro, Michoacán	19° 36' 05" N 101° 39' 13" W	DQ990983	1	
<b><i>Rhabdochona mexicana</i></b> Caspeta-Mandujano, Moravec y Salgado-Maldonado, 2000						
<i>Astyanax mexicanus</i> (De Filippi)	Characidae	Río Jalpan, Querétaro	21° 13' 25" N 99° 28' 21" W	Pendiente (14-15A)	2	Presente estudio
		Plan de Ayala, Tamaulipas	22° 34' 09" N 98° 44' 02" W	Pendiente (135A)	1	Presente estudio
<b><i>Rhabdochona xiphophori</i></b> Caspeta-Mandujano, Moravec y Salgado-Maldonado, 2001						
<i>Poeciliopsis gracilis</i> (Heckel)	Poeciliidae	Camino a Hierve el Agua, Oaxaca	16° 54' 23" N 96° 19' 55" W	Pendiente (Om5-6)	2	Presente estudio
<b><i>Spinitectus sp.1</i></b>						
<i>Agonostomus monticola</i> (Bancroft)	Mugilidae	Santa María Huatulco, Oaxaca	15° 50' 22" N 96° 19' 46" W	Pendiente (254A)	1	Presente estudio
<b><i>Spinitectus sp.2</i></b>						
<i>Heterandria bimaculata</i> (Heckel)	Poeciliidae	Axtla de Terrazas, San Luis Potosí	21° 26' 12" N 98° 52' 02" W	Pendiente (201A)	1	Presente estudio

## ***Alineamiento múltiple, concatenado, cladogramas y cálculo de distancias genéticas***

Las secuencias del género *Rhabdochona* obtenidas para el marcador molecular *cox1* se alinearon mediante el uso del programa de alineamiento múltiple de secuencias Clustal W (Thompson et al., 1997), implementado en la versión web del software en <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>. Las estrategias de búsqueda utilizadas fueron progresivas. Los *gaps* fueron incluidos en el análisis con penalizaciones. Para la apertura de *gaps* la penalización tuvo un *score* de 15 mientras que para la extensión del *gap* fue de 6.66. La matriz alineada fue visualizada en el programa Mesquite versión 3.05 (Maddison y Maddison, 2015), mismo donde se construyeron las matrices en los formatos Phylip y Nexus utilizadas para obtener distintos cladogramas mediante los métodos paramétricos de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). La búsqueda de cladogramas con IB se llevó a cabo empleando un modelo GTR + GAMMA + I como lo sugirió el programa jModelTest ver. 2 (Darriba et al., 2012). El análisis de máxima verosimilitud (ML) se llevó a cabo con el programa RaxML GUI 1.5 beta (Silvestro y Michalak, 2012) con 100 repeticiones y 1000 pseudoréplicas de bootstrap. El análisis de inferencia bayesiana (IB) se ejecutó en el programa MrBayes v3.2.5 x64 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) con dos corridas simultaneas de cuatro cadenas (una fría y tres calientes) y una temperatura de 0.2. Metropolis-coupling Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) se corrieron para 10 millones de generaciones con un muestreo cada 500

generaciones. El *burning* utilizado fue de 25%. Los árboles obtenidos fueron visualizados y editados en el programa FigTree 1.4.0 (Rambuat, 2012).

Finalmente, las distancias genéticas fueron estimadas con ayuda del programa Mega versión 7 (Kumar et al., 2016) bajo el modelo de distancias no corregidas “p-distance” con la opción de estimar ambigüedades y tomando en cuenta las primeras, segundas y terceras posiciones. El análisis involucró 28 secuencias de nucleótidos.

## **RESULTADOS**

En el presente estudio se revisaron 134 peces dulceacuícolas de 12 especies pertenecientes a ocho familias capturados en seis localidades en México (tres en la región neártica y tres en la región neotropical). Se recuperó un total de 230 nematodos pertenecientes al género *Rhabdochona*, de los cuales 33 fueron asignados a la morfoespecie *R. ahuehuellensis*, 24 a *R. canadensis*, 171 a *R. icaturi* y dos a *Rhabdochona* sp.

### **Datos morfológicos**

Con los organismos que fueron fijados para el estudio morfológico se realizaron 508 microfotografías (329 para *R. ictaluri* y 179 para *R. kidderi*). Con base en las microfotografías, se tomaron 825 medidas de los caracteres diagnósticos de cada una de las morfoespecies (cuadro 3). Un total de 80 individuos fueron medidos, 20 machos y 20 hembras de *R. ictaluri* y 20 ejemplares para cada sexo de *R. kidderi* (CNHE 2698). Dos machos y una hembra del material tipo de *R. ictaluri* fueron medidos (CNHE 6551). Adicionalmente, se realizó la revisión de dos machos y cinco hembras de la especie *R. kidderi* del huésped *Typhliasina pearsei* (Hubbs) de las cuevas Nohoch, Quintana Roo (CNHE 3286); dos machos y dos hembras recuperados de *Theraps irregularis* Günter (CNHE 8065) y de 49 larvas provenientes del huésped *Ictalurus furcatus* (CNHE 8071), ambas especies de peces fueron capturadas en el río Lacantún, Chiapas. Del material etiquetado con los números de catalogo CNHE 3286 y CNHE 8065 no se obtuvieron medidas porque en los organismos no fue posible observar las características diagnósticas mientras que el en material CNHE 8071 no había adultos.

**Cuadro 3.** Medidas de los caracteres diagnósticos obtenidas para cada sexo de cada una de las especies analizadas en el presente estudio. Las medidas se muestran como intervalos (con promedio y desviación estándar). El signo “?” indica datos faltantes.

Especie	<i>Rhabdochona kidderi kidderi</i>				<i>R. kidderi texensis</i>		<i>R. ictaluri</i>		
	Pearse, 1936		Moravec et al., 1995		Presente estudio		Moravec y Huffman, 1988		
Autor	Macho (n= ?)	Hembra (n= ?)	Macho (n= 10)	Hembra (n= 10)	Macho (n= 20)	Hembra (n= 20)	Macho (n= 10)	Hembra (n= 10)	
Sexo									
Longitud del cuerpo	7.4 (?±?)	7.4-10.8 (8.9±?)	5.64-8.70 (?±?)	6.42-9.26 (?±?)	5.74-7.66 (6.34±0.6)	3.22-7.83 (5.96±1.19)	5.88-8.19 (?±?)	9.0-15.83 (?±?)	5.75-18.49 (7.53 ± 4.35)
Anchura máxima del cuerpo	0.5 (?±?)	0.8 (?±?)	0.015-0.021 (?±?)	0.082-0.095 (?±?)	0.05-0.095 (0.07±0.01)	0.043-0.081 (0.06±0.011)	0.082-0.095 (?±?)	0.122-0.218 (?±?)	0.08-0.26 (0.14 ± 0.02)
Longitud del vestíbulo + prostoma	---	0.135 (?±?)	0.135-0.168 (?±?)	0.15-0.18 (?±?)	0.09-0.13 (0.016±0.01)	0.10-0.17 (0.11±0.0078)	0.126-0.144 (?±?)	0.135-0.159 (?±?)	0.08-0.10 (0.11±0.6)
Longitud del esófago muscular	---	---	0.3-0.36 (?±?)	0.3-0.36 (?±?)	0.19-0.32 (0.25±0.04)	0.17-0.38 (0.29±0.05)	0.258-0.360 (?±?)	0.330-0.405 (?±?)	0.17-0.38 (0.25 ± 0.04)
Longitud del esófago glandular	---	---	1.27-2.10 (?±?)	1.14-1.66 (?±?)	1.01-1.56 (1.27±0.05)	0.90-1.59 (1.28±0.25)	1.59-2.05 (?±?)	1.93-2.49 (?±?)	1.15-3.72 (6.34 ± 0.6)
Posición del anillo nervioso desde el extremo anterior	---	---	0.168-0.225 (?±?)	0.71-0.20 (?±?)	0.13-0.15 (0.14±0.008)	0.12-0.16 (0.14±0.01)	0.189-0.195 (?±?)	0.186-0.225 (?±?)	0.12-0.23 (0.2 ± 0.43)
Posición de los deiridios desde el extremo anterior	---	---	0.066-0.078 (?±?)	0.189-0.291 (?±?)	0.57-0.64 (0.12±0.008)	0.175-0.184 (0.35±0.006)	0.063-0.066 (?±?)	0.072-0.087 (?±?)	
Espícula izquierda (longitud total)	1.0 (?±?)	---	0.651-1.167(?±?)	---	0.29-0.53 (0.36 ± 0.07)	---	0.67-1.98 (?±?)	---	0.28-0.56 (0.5 ± 0.68)
Longitud del fuste	---	---	0.30-0.54 (?±?)	---	46.51-84.51 (57.94±1.68)	---	0.525-0.684 (?±?)	---	0.16-0.24 (0.22 ± 0.25)
Porcentaje del fuste	---	---	32-52%	---	37.83-57.69%	---	31-55% (?±?)	---	37.83-57.69 (45.33 ± 4.82)
Espícula derecha (longitud total)	0.08 (?±?)	---	0.075-0.087 (?±?)	---	0.09-0.12 (0.11±0.009)	---	0.084-0.102(?±?)	---	0.06-0.17 (0.14 ± 0.03)
Largo de la cauda	0.2 (?±?)	0.2(?±?)	0.15-0.22 (?±?)	0.11-0.17 (?±?)	0.005-0.013 (0.008±0.002)	0.0053-0.0142 (0.0114±0.0056)	0.252-0.264 (?±?)	0.147-0.225 (?±?)	0.007-0.039 (0.16 ± 0.017)
Posición de la vulva desde el extremo posterior	---	---	---	2.52-3.63 (?±?)	---	1.79-3.38 (2.47 ± 0.54)	---	3.32-6.39 (?±?)	---
Largo de los huevos	---	0.14(?±?)	---	0.045-0.051 (?±?)	---	0.031-0.035 (0.03±0.0013)	---	0.036-0.042 (?±?)	---
Ancho de los huevos	---	0.022(?±?)	---	0.021-0.024 (?±?)	---	0.019-0.022 (0.0195±0.0009)	---	0.021-0.024 (?±?)	---

### **Caracterización morfológica**

A continuación, se presenta una caracterización morfológica realizada a partir del análisis de las microfotografías y los datos morfométricos obtenidos mediante microscopia electrónica de barrido y fotónica para las especies *R. ictaulri* y *R. kidderi*:

**Phylum NEMATODA** Rudolphi, 1808

**Clase CHROMADOREA** Inglis, 1983

**Familia RHABDOCHONIDAE** Travassos, Artigas y Pereira, 1928

***Rhabdochona ictaulri*** Aguilar-Aguilar, Rosas-Valdez y Pérez-Ponce de León, 2010

**Huésped y localidad:** *Ictalurus pricei* (Río Tunal en Nombre de Dios, Durango; prevalencia= 80%, Abundancia promedio=  $11.40 \pm 11.93$  e intensidad promedio=  $14.25 \pm 11.93$ ).

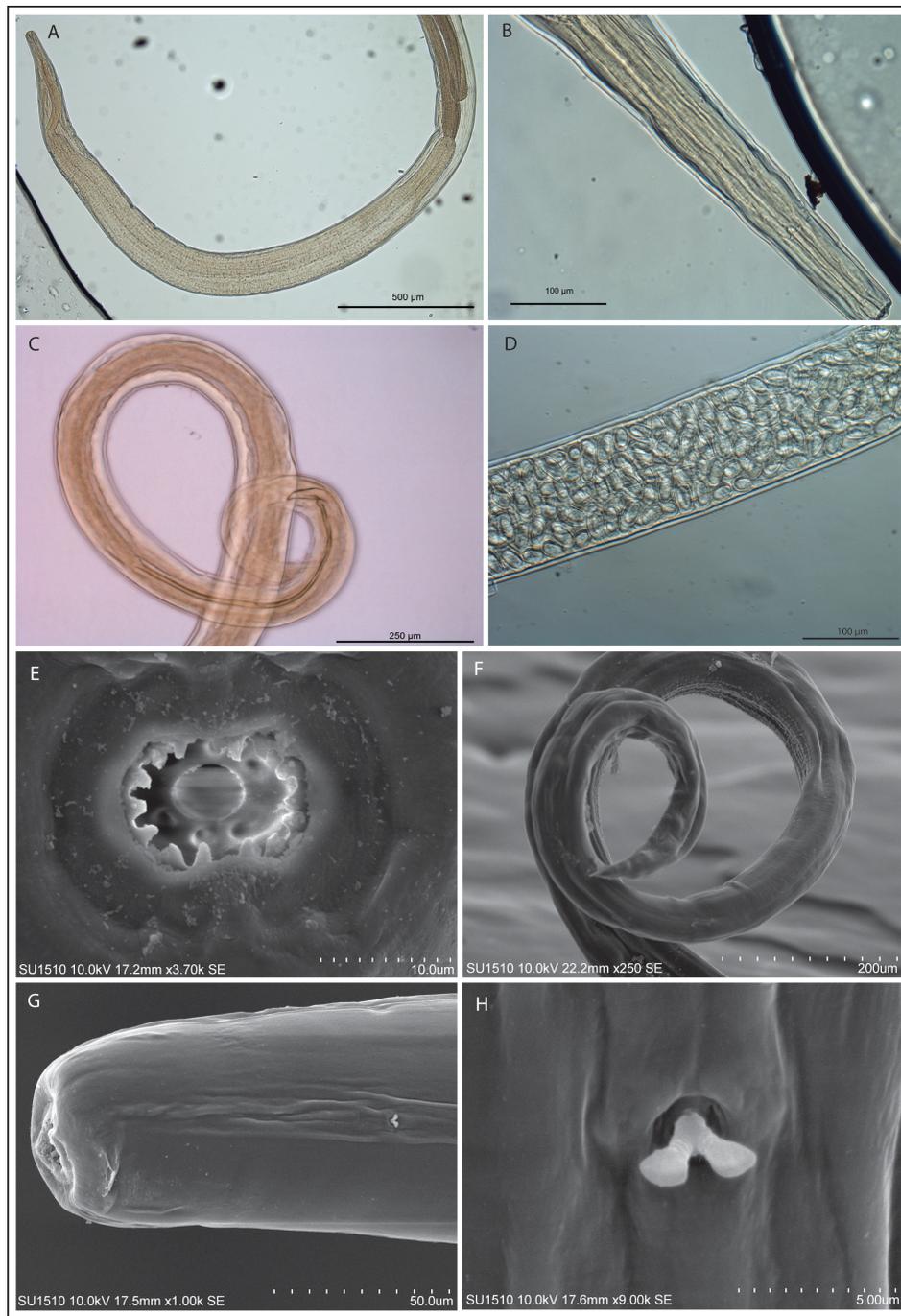
**Sitio de infección:** Intestino.

**Descripción:** Adultos de cutícula lisa y tamaño mediano. Con una abertura oral de forma oval rodeada de cuatro papilas cefálicas pequeñas y dos afidios laterales. Prostoma en forma de embudo, con seis dientes basales y armado en el margen interior con 14 dientes, tres ventrales, tres dorsales y cuatro laterales formando pares, dos a cada lado. Los deiridios son pequeños y bifurcados. En ambos sexos, la terminación caudal es cónica, con una terminación cuticular en punta (Figura 1).

**Machos:** Basado en 20 individuos (en el paréntesis se encuentran las medidas en milímetros obtenidas por Aguilar-Aguilar et al. 2010): Longitud del cuerpo de 5.75-10.18 (6.37-6.85) con un ancho máximo de 0.08-0.16 (0.1-0.12). Longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma de 0.08-0.10 (0.09-0.10); longitud del esófago muscular de 0.17-0.33 (0.18-0.21); longitud del esófago glandular de 1.15-2.81 (1.79-2.14). Anillo nervioso rodeando el esófago muscular, a 0.12-0.22 (0.14-0.15) desde el extremo anterior del cuerpo. Deiridios en el primer tercio del cuerpo a 0.066-0.085 (0.079–0.086) de la región anterior. Papilas preanales que ocurren en las siguientes combinaciones: 7+9, 8+7 (8+7, 8+9 y 9+9) (número de papilas en los lados derecho e izquierdo, respectivamente). Seis pares de papilas postanales presentes, con el segundo par lateral y el resto en posición subventral. Área rugosa presente. Largo de la espícula izquierda de 0.28-0.56 (0.44-0.54), longitud del fuste de 0.16-0.24 (0.19-0.20), representando 37.83-57.69% (37.8-42.7%) de la longitud del espícula. La espícula derecha es pequeña y esta cubierta por una membrana fina. Espícula derecha 0.06-0.17 (0.07-0.09) de largo, sin púa. Relación de longitudes de espículas 1: 5.6-1: 8.3 (1:5.5-1:7.2.). Largo de la cauda 0.007-0.016 (no incluida).

**Hembras:** Basado en 20 individuos adultos: Longitud corporal de 5.73-18.49 (9.78-13.56) con un ancho máximo de 0.12-0.26 (0.13-0.17). Longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma 0.09-0.14 (0.09-0.10), esófago muscular 0.23104-0.38006 (0.26-0.27), esófago glandular 1.48-3.72 (2.42-2.64). Anillo nervioso rodeando el esófago muscular, a 0.11-0.23 (0.16-0.18) desde el extremo anterior del cuerpo. Deiridios 0.068-0.082 (0.073-0.079) en el primer

tercio anterior del cuerpo. Vulva a 1.79-8.63 desde el extremo posterior del cuerpo. Vagina muscular dirigida anteriormente desde la vulva. Útero anfidelfico. Huevos ovalados, muy numerosos, sin filamentos; de tamaño relativamente pequeño con respecto al cuerpo de la hembra 0.0240-0.034 (0.011-0.012) de largo y 0.013-0.019 (0.07-0.08) de ancho. Cauda 0.007-0.03 de largo (no incluida).



**Figura 1.** Microfotografías de los adultos de *Rhabdochona ictaluri* capturadas con microscopía óptica (A-D) y microscopía electrónica de barrido (E-H). A) Porción anterior del macho a 10x; B) porción anterior de la hembra a 40x mostrando los dientes basales; C) espícula derecha e izquierda del macho a 20x; D) huevos sin filamentos de la hembra a 40x; E) detalle del prostoma mostrando seis dientes en la base del vestíbulo; F) detalle de la región posterior del macho mostrando el área rugosa; G); posición del deiridio en el primer tercio del cuerpo; H) detalle del deiridio.

***Rhabdochona kidderi*** Pearse, 1936

**Huésped y localidad:** *Ramdia quelen* (Cenote Xmucuy, Yucatán).

**Número de catalogo:** CNHE 2698

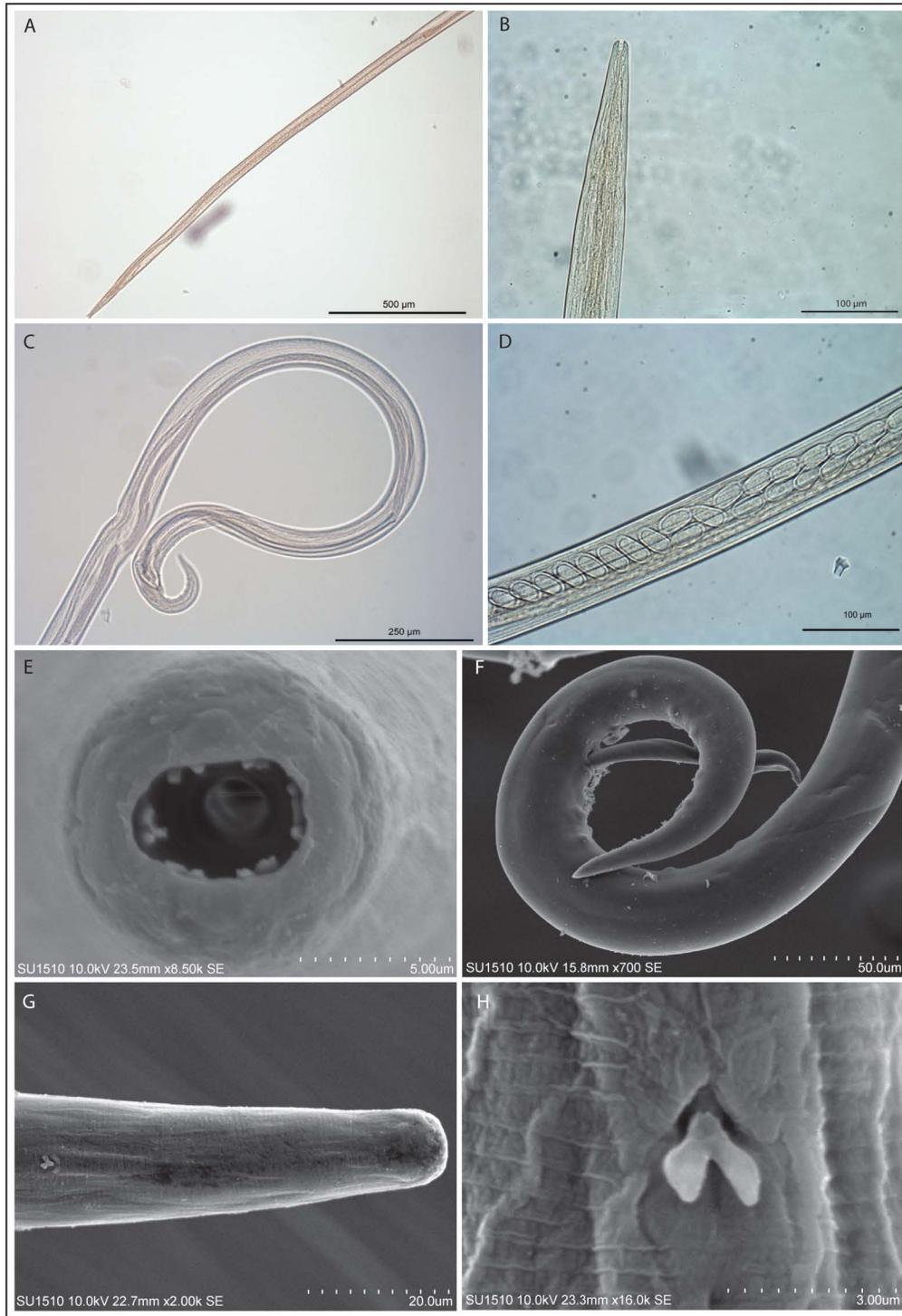
**Sitio de infección:** Intestino.

**Descripción:** Adultos de cutícula finamente estriada y tamaño pequeño. Con una abertura oral ovalada rodeada de cuatro papilas cefálicas pequeñas y un par de afidios laterales. Prostoma en forma de embudo, sin dientes basales y armado en el margen interior con 14 dientes, tres ventrales, tres dorsales y cuatro laterales formando pares, dos a cada lado. Deiridios pequeños y bifurcados. Cola de ambos sexos cónica, con terminación puntiaguda (Figura 2).

**Machos:** Basado en 20 individuos adultos (en el paréntesis se encuentran las medidas en milímetros obtenidas por Moravec et al. 1995): Longitud del cuerpo 5.74-7.66 (5.64-8.70) y 0.05-0.09 (0.015-0.021) de ancho máximo. Longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma 0.09-0.137 (0.135-0.168); longitud del esófago muscular 0.19-0.32 (0.3-0.36); longitud del esófago glandular 1.017-1.56 (1.27-2.10). Anillo nervioso a 0.13-0.15 (0.168-0.225) desde el extremo anterior del cuerpo. Deiridios en el primer tercio del cuerpo a 0.057-0.069 (0.066-0.078) de extremo anterior del cuerpo. Papilas preanales que ocurren en las siguientes combinaciones: 5+6 y 5+7 (5+5, 6+6 y 6+7) (número de papilas en los lados derecho e izquierdo, respectivamente). Seis pares de papilas postanales presentes, el segundo par lateral y el resto subventral. Área rugosa ausente. Largo de la espícula izquierda 0.57-0.64 (0.651-1.167), longitud del fuste 0.29-0.53 (0.30-0.54), representando 46.51-84.51% (32-52%) de la longitud del

espícula. Espícula derecha 0.09-0.12 (0.075-0.087) de largo, sin púa y cubierta por una membrana fina. Relación de longitudes de espículas 1: 4.86-1: 5.97. Largo de la cauda 0.005-0.013 (0.15-0.22).

**Hembras:** Basado en 20 individuos adultos: Longitud corporal 3.22-7.83 (6.42-9.26) con un ancho máximo de 0.043-0.081 (0.082-0.095). Longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma 0.10-0.12 (0.15-0.18), esófago muscular 0.17-0.38 (0.3-0.36), esófago glandular 0.9-1.59 (1.14-1.66). Anillo nervioso rodeando el esófago muscular, a 0.12-0.16 (0.71-0.20) desde el extremo anterior del cuerpo. Deiridios en el primer tercio anterior del cuerpo a 0.175-0.184 (0.189-0.291) del extremo anterior. Vulva a 1.79-3.38 (2.52-3.63) desde el extremo posterior del cuerpo. Vagina muscular dirigida anteriormente desde la vulva. Útero anfidelfico. Huevos maduros ovalados, poco numerosos, sin filamentos; de tamaño relativamente grande con respecto al cuerpo 0.031-0.035 (0.045-0.051) de largo y 0.019-0.022 (0.021-0.024) de ancho. Cauda 0.005-0.014 (0.11-0.17) de largo.



**Figura 2.** Microfotografías de los adultos de *Rhabdochona kidderi* capturadas con microscopía óptica (A-D) y microscopía electrónica de barrido (E-H). A) Porción anterior del macho a 10x; B) porción anterior de la hembra a 40x; C) espícula derecha e izquierda del macho a 20x; D) huevos sin filamentos de la hembra a 40x; E) detalle del prostoma sin dientes en la base del vestíbulo; F) detalle de la región posterior del macho; G); posición del deiridio en el primer tercio del cuerpo; H) detalle del deiridio.

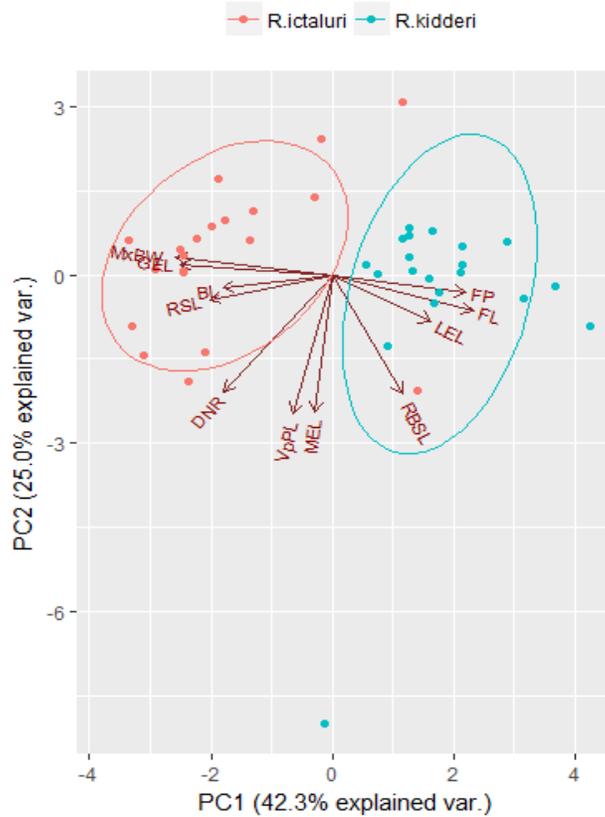
### **Análisis estadísticos**

El análisis de función discriminante de las medidas obtenidas mostraron una diferencia significativa entre las poblaciones comparadas pertenecientes al género *Rhabdochona*. Para los machos se obtuvo un valor de 5.967 para la distancia cuadrática de Mahalonobis, una Lambda de Wilks de 0.092 y el valor promedio de F de 25.19378. Para las hembras, el valor de la distancia cuadrática de Mahalonobis es de 5.897, el de la Lambda de Wilks de 0.098 y el promedio de F es igual a 41.83561. Las variables morfométricas que contribuyeron significativamente en la discriminación entre ambas especies son la longitud del esófago y de la espícula izquierda en los machos (Cuadro 4), y la longitud y anchura máxima del cuerpo en el caso de las hembras (Cuadro 5).

Tanto para machos (Figura 3) como para hembras (Figura 4), la diferencia entre los dos conjuntos de datos obtenidos en cada una de las poblaciones se puede visualizar mediante las elipses resultantes del PCA, construidas a partir de los centroides de cada elipse. En los machos, las variables morfométricas como la longitud máxima del cuerpo y la longitud del esófago glandular tuvieron mayor contribución a la componente 1 mientras que la longitud del vestíbulo mas el prostoma y la longitud del esófago muscular contribuyeron de mayor forma a la componente 2. En el caso de las hembras el largo del cuerpo, la anchura máxima y la posición de la vulva contribuyeron más a la componente 1 y la longitud del vestíbulo mas el prostoma y la longitud del esófago muscular a la componente 2 (Cuadro 6). Esta diferencia se evidencia con un valor de significancia de  $p < 0.00001$  para ambos casos.

**Cuadro 4.** Resumen del análisis de la función discriminante para 40 machos de *R. ictaluri* y *R. kidderi* con 11 variables morfométricas. En rojo se indican los valores que tienen un aporte mayor a la función discriminante.

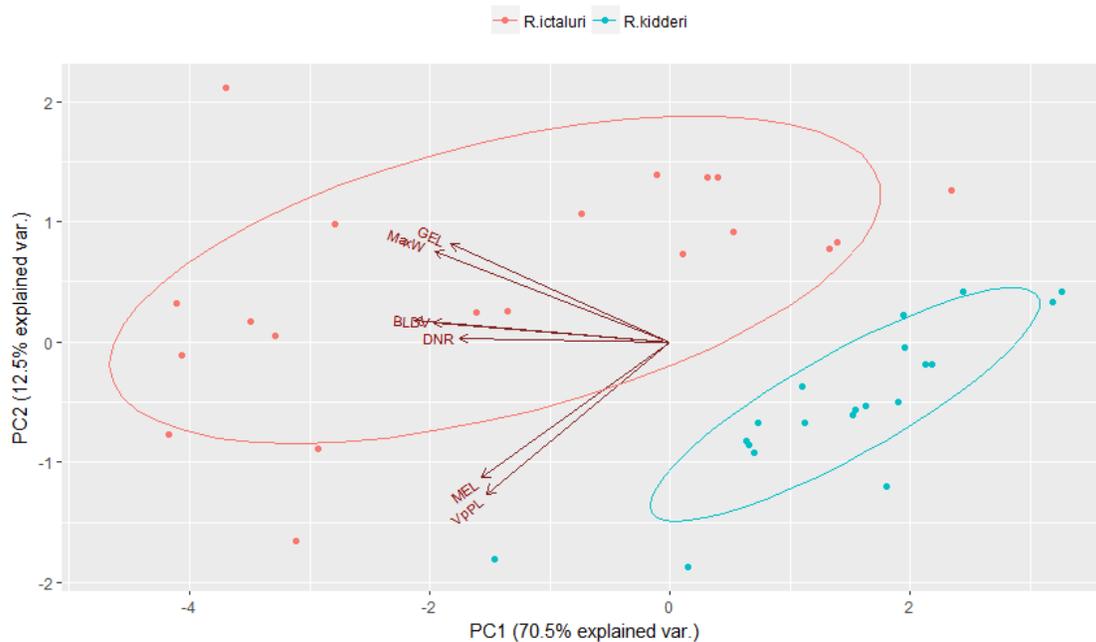
	<i>R. ictaluri</i> (n=20) <i>R. kidderi</i> (n=20)	Lambda de Wilks	Lambda parcial	F-remove (1, 28)	p-level	Tolerancia	1-Tolerancia (R-Sqr.)
Longitud del cuerpo		0.096	0.955	1.313	0.261	0.428	0.571
Anchura máxima del cuerpo		<b>0.143</b>	0.641	<b>15.670</b>	<b>0.000</b>	0.325	0.674
Longitud del vestíbulo mas el prostoma		0.094	0.970	0.865	0.360	0.117	0.882
Longitud del esófago muscular		0.096	0.954	1.323	0.259	0.307	0.692
Longitud del esófago glandular		0.095	0.961	1.133	0.296	0.476	0.523
Posición del anillo nervioso		0.091	0.999	0.016	0.898	0.078	0.921
Espícula izquierda (longitud total)		<b>0.110</b>	0.833	<b>5.597</b>	<b>0.025</b>	0.062	0.937
Longitud del fuste		0.096	0.954	1.335	0.257	0.023	0.976
Porcentaje del fuste		0.097	0.944	1.633	0.211	0.028	0.971
Espícula derecha (longitud total)		0.093	0.982	0.498	0.486	0.348	0.651
Largo de la cauda		0.100	0.910	2.741	0.108	0.256	0.743



**Figura 3.** Agrupamiento de los machos de *Rhabdochona ictaluri* y *R. kidderi* en el espacio morfométrico. Códigos de los vectores: BL= longitud del cuerpo, MxBW= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, LEL= longitud espícula izquierda, FL= longitud del fuste, FP= porcentaje que representa el fuste, RSL=longitud de la espícula derecha, RBSL=radio entre las espículas, CL= largo de la cauda.

**Cuadro 5.** Resumen del análisis de la función discriminante para 40 hembras de *R. ictaluri* y *R. kidderi* con siete variables morfométricas. En rojo se indican los valores que tienen un aporte mayor a la función discriminante.

	<i>R. ictaluri</i> (n=20) <i>R. kidderi</i> (n=20)	Lambda de Wilks	Lambda parcial	F-remove (1, 28)	p-level	Tolerancia	1-Tolerancia (R-Sqr.)
Longitud del cuerpo		0.131	0.750	10.617	0.002	0.040	0.959
Anchura máxima del cuerpo		0.330	0.298	75.234	0.000	0.121	0.878
Longitud del vestíbulo mas el prostoma		0.102	0.961	1.271	0.267	0.223	0.776
Longitud del esófago muscular		0.113	0.867	4.897	0.034	0.348	0.651
Longitud del esófago glandular		0.109	0.901	3.482	0.071	0.446	0.553
Posición del anillo nervioso		0.109	0.897	3.653	0.064	0.336	0.663
Posición de la vulva		0.098	0.999	0.001	0.965	0.187	0.812



**Figura 4.** Agrupamiento de las hembras de *Rhabdochona ictaluri* y *R. kidderi* en el espacio morfométrico. Códigos de los vectores: BL= longitud del cuerpo, MxBW= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, DV= posición de la vulva desde el extremo posterior del cuerpo, EL= largo de los huevos, EW= ancho de los huevos, CL= largo de la cauda.

**Cuadro 6.** Valores de la contribución de 11 variables morfométricas (machos) y siete (hembras) a las componentes del PCA de *R. ictaluri* y *R. kidderi*. Códigos de las variables: BL= longitud del cuerpo, MxWB= anchura máxima, VpPL= Longitud del vestíbulo + el prostoma, MEL=longitud del esófago muscular, GEL= longitud del esófago glandular, DNR= posición del anillo nervioso, LEL= longitud espícula izquierda, FL= longitud del fuste, FP= porcentaje que representa el fuste, RSL=longitud de la espícula derecha, RBSL=radio entre las espículas y DV= posición de la vulva desde el extremo posterior del cuerpo.

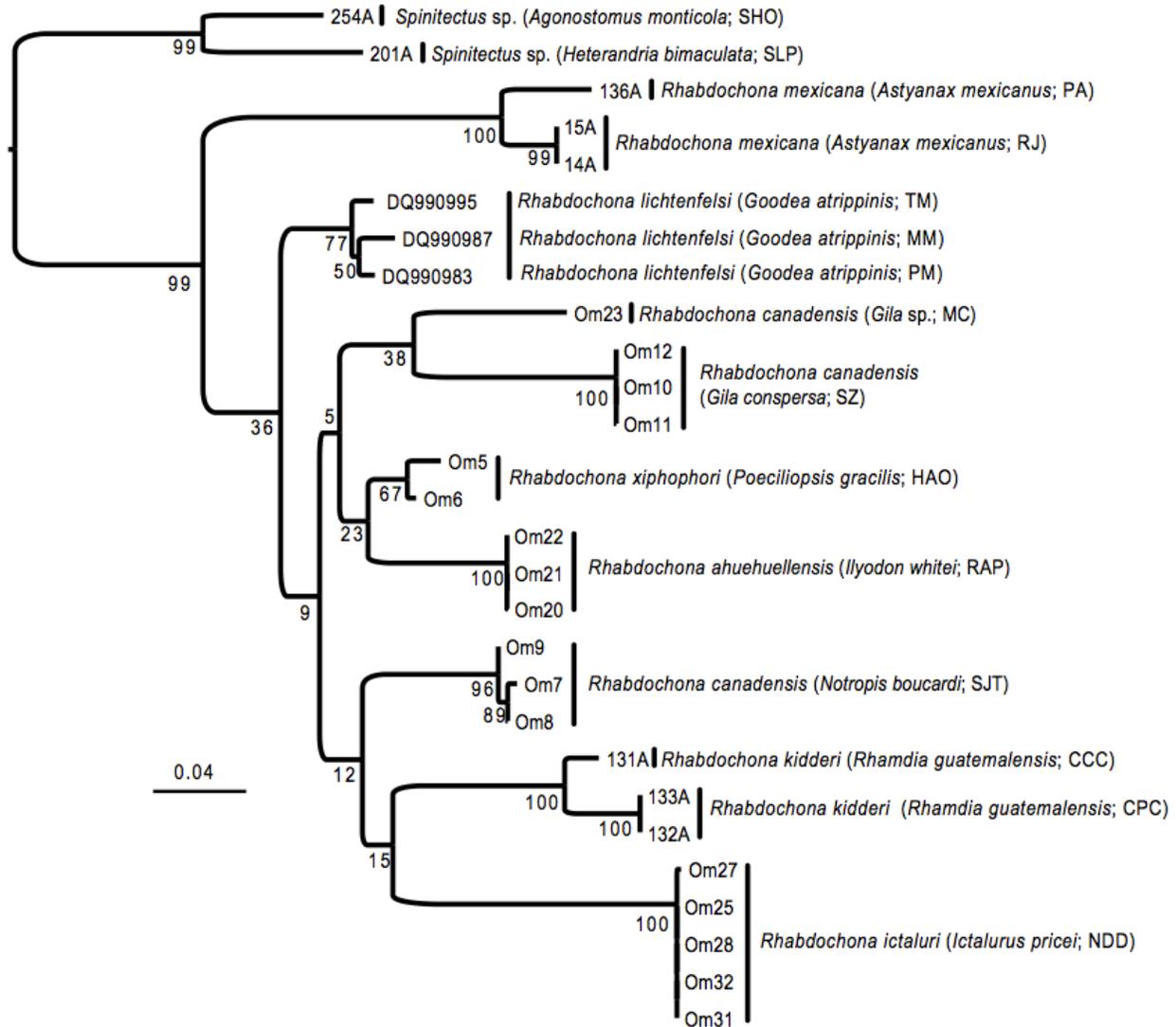
	Factor1	Factor2	Factor3	Factor4	Factor5	Factor6	Factor7	Factor8	Factor9	Factor10	Factor11
<b>Machos</b>											
BL	0.101	0.260	0.102	0.030	0.397	0.006	0.205	0.024	0.091	0.014	0.0002
MxWB	0.175	0.009	0.034	0.024	0.00008	0.006	0.00003	0.531	0.013	0.203	0.0005
VpPL	0.020	0.255	0.004	0.027	0.027	0.216	0.063	0.096	0.072	0.215	0.0000
MEL	0.004	0.242	0.012	0.002	0.258	0.090	0.353	0.005	0.006	0.023	0.0005
GEL	0.145	0.006	0.013	0.040	0.001	0.434	0.144	0.155	0.044	0.011	0.0010
DNR	0.099	0.163	0.006	0.020	0.001	0.0003	0.047	0.067	0.081	0.512	0.0006
LEL	0.063	0.043	0.240	0.375	0.018	0.007	0.003	0.022	0.071	0.0003	0.152
FL	0.132	0.033	0.208	0.019	0.0000	0.025	0.018	0.005	0.013	0.0000	0.545
FP	0.118	0.012	0.074	0.389	0.013	0.059	0.024	0.001	0.006	0.0005	0.298
RSL	0.109	0.003	0.198	0.014	0.236	0.081	0.045	0.015	0.291	0.003	0.0002
RBSL	0.028	0.203	0.105	0.055	0.045	0.071	0.094	0.073	0.306	0.015	0.0000
<b>Hembras</b>											
BL	0.193	0.007	0.019	0.032	0.003	0.0000	0.743	---	---	---	---
MxWB	0.163	0.136	0.038	0.0004	0.045	0.538	0.077	---	---	---	---
VpPL	0.099	0.384	0.107	0.269	0.077	0.002	0.058	---	---	---	---
MEL	0.105	0.306	0.078	0.464	0.001	0.038	0.006	---	---	---	---
GEL	0.142	0.158	0.020	0.014	0.607	0.038	0.017	---	---	---	---
DNR	0.130	0.0002	0.559	0.148	0.107	0.024	0.029	---	---	---	---
DV	0.165	0.006	0.176	0.069	0.157	0.357	0.067	---	---	---	---

### **Base de datos para COX1**

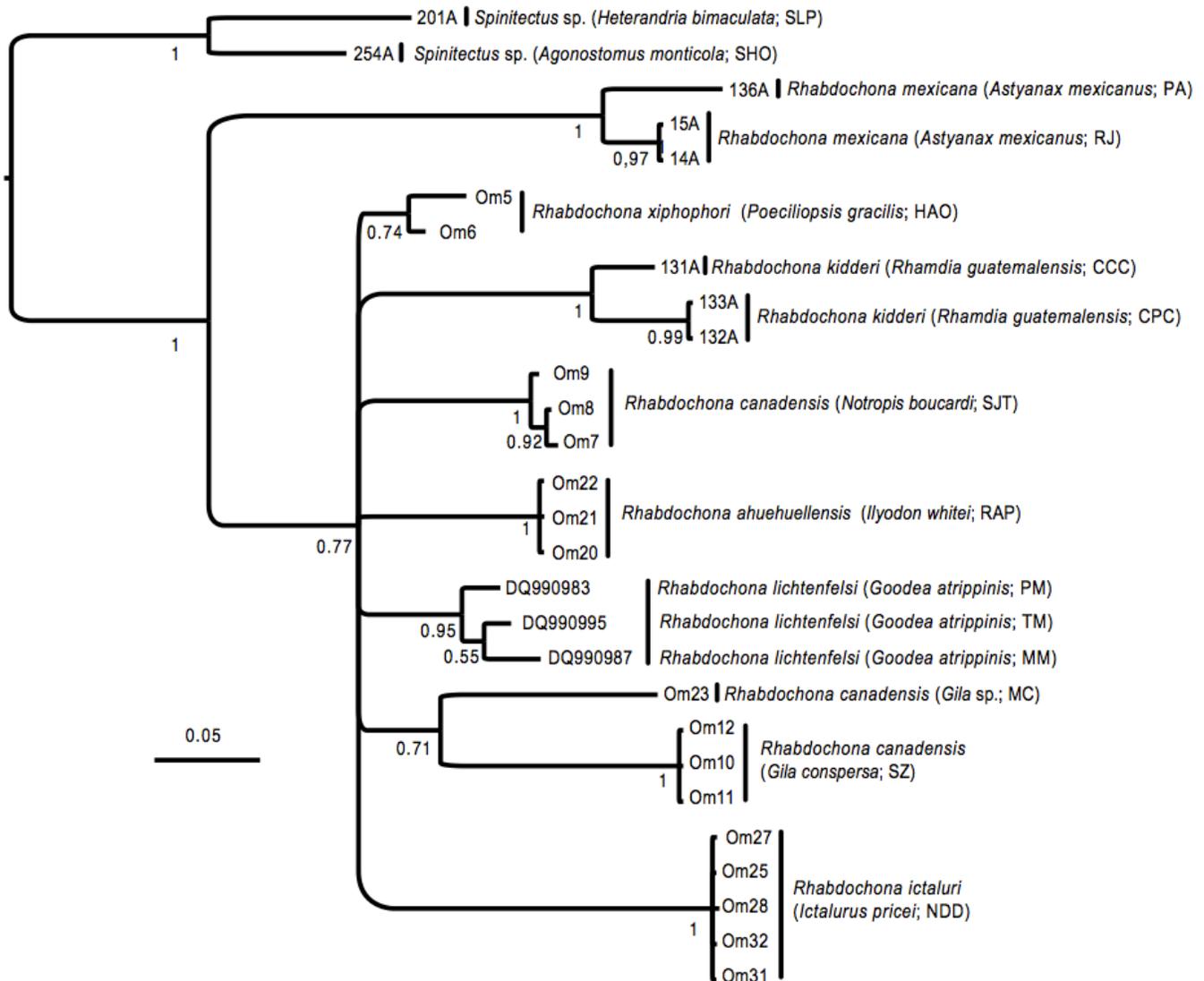
Las muestras que se destinaron para el análisis molecular, tres muestras de *R. canadensis* y cuatro de *R. xiphophori* se obtuvieron como parte de un estudio previo (Lagunas-Calvo et al. 2016). Adicionalmente, ocho muestras de las especies *R. mexicana* (tres), *R. kidderi* (tres), *Spinitectus* sp.1 (una) y *Spinitectus* sp.2 (una) fueron conseguidas mediante donaciones; mientras que tres secuencias de *R. lichtenfeldsi* se descargaron de GenBank. Se realizaron un total de 32 extracciones de DNA y se obtuvieron 28 secuencias para el marcador molecular COX1. Las secuencias obtenidas variaron de 640 pares de bases (pb) (*R. canadensis* de Zacatecas ) a 190 pb (*R. xiphophori* de Oaxaca). Las tres secuencias obtenidas de GenBank para la especie *R. lichtenfeldsi* tuvieron una extensión de 465 pb. La extensión final para todas las secuencias fue de 628 pb.

### **Cladogramas**

El método de máxima verosimilitud mostró un solo árbol con un valor  $-ln=$  2750.471585, con valores de bootstrap que oscilan entre el 8-100%. El análisis, con excepción de la morfoespecie *R. canadensis*, recuperó dos clados conformados por individuos de la misma morfoespecie (Figura 5). El árbol obtenido a través del método de inferencia bayesiana mostró un clado compuesto por la especie *R. mexicana* con un valor de probabilidad posterior de 1; y una politomía que contiene al resto de las especies del género *Rhabdochona* incluidas en el presente estudio (Figura 6).



**Figura 5.** Cladograma derivado de las secuencias del marcador mitocondrial *COX1* para *Rhabdochona* spp. utilizando el análisis de Máxima verosimilitud (lnL=-2750.471585). Los valores de soporte junto a los nodos corresponden al Bootstrap. La barra de escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las abreviaturas en la figura representan las siguientes localidades: CCC= Cenote Choo-ha, Quintana Roo; CPC= Cenote Punta Laguna, Quintana Roo; HAO= Camino a Hierve el Agua, Oaxaca; MC= Miñaca, Chihuahua; MM= La Minzita, Michoacán; NDD= Nombre de Dios, Durango; PA= Plan de Ayala, Tamaulipas; PM= Pátzcuaro, Michoacán; RAP= Río Ahuehuello, Puebla; RJ= Río Jalpan, Querétaro; SHO= Santa María Huatulco, Oaxaca; SJT= San Juan Teita, Oaxaca; SLP= Axtla de Terrazas, San Luis Potosí; SZ= Sain Alto, Zacatecas y TM= Tocumbo, Michoacán.



**Figura 6.** Cladograma derivado de las secuencias del marcador mitocondrial COX1 para *Rhabdochona* spp. utilizando el análisis de Inferencia Bayesiana (árbol de la regla de la mayoría del 50%). Los valores de soporte asociados a los nodos junto a las ramas corresponden a la probabilidad posterior (> 0.95). La barra de escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las abreviaturas en la figura representan las siguientes localidades: CCC= Cenote Choo-ha, Quintana Roo; CPC= Cenote Punta Laguna, Quintana Roo; HAO= Camino a Hierve el Agua, Oaxaca; MC= Miñaca, Chihuahua; MM= La Minzita, Michoacán; NDD= Nombre de Dios, Durango; PA= Plan de Ayala, Tamaulipas; PM= Pátzcuaro, Michoacán; RAP= Río Ahuehuello, Puebla; RJ= Río Jalpan, Querétaro; SHO= Santa María Huatulco, Oaxaca; SJT= San Juan Teita, Oaxaca; SLP= Axtla de Terrazas, San Luis Potosí; SZ= Sain Alto, Zacatecas y TM= Tocumbo, Michoacán.

### **Divergencias genéticas**

Las divergencias genéticas estimadas entre los miembros del género *Rhabdochona* con respecto al grupo externo varían entre 12.88-14.06% ( $13.59 \pm 0.41$ ) para *Spinitectus* sp.1 y de 14.59-16.07% ( $15.45 \pm 0.35$ ) en el caso de *Spinitectus* sp.2. Las divergencias genéticas promedio calculadas entre las secuencias que conforman cada uno de los clados obtenidos (intraespecíficas) fueron: 3.48% para *R. mexicana*, 2.59% para *R. kidderi*, 0.51% para *R. canadensis* de la región neotropical, 0.00% para *R. ahuehuellensis*, 2.04% para *R. lichtenfelsi*, 4.8% para *R. canadensis* de la región neártica, 0.07% para *R. ictaluri* y 1.6% en el caso de *R. xiphophori* (Cuadro 7).

Por otro lado, la divergencia promedio más baja entre cada uno de clados para el género *Rhabdochona* fue de 6.80% (*R. ahuehuellensis* con respecto a *R. lichtenfelsi*); mientras que la más alta se registró entre los clados de *R. canadensis* y *R. mexicana* con un valor de 13.91%. En general, *Rhabdochona mexicana* presenta las divergencias más altas con respecto a otros clados (11.82%-14.24%) (Cuadro 7).

En el caso particular de *R. ictaluri* con respecto a otras secuencias obtenidas de miembros de la misma población, las divergencias genéticas variaron entre 0.00% y 0.19% ( $0.07 \pm 0.09$ ); mientras que la variación fue de 0.00% a 3.91% ( $2.59 \pm 2.24$ ) entre miembros de distintas poblaciones de *R. kidderi*. Con respecto a la variación genética entre las especies *R. ictaluri* y *R. kidderi* los valores oscilaron entre 10.91%-12.48% con un promedio de  $11.93 \pm 0.54\%$  (Cuadro 8).

**Cuadro 7.** Divergencias genéticas entre las secuencias del marcador COX1 obtenidas entre los géneros *Rhabdochona* y *Spinitectus*. Los colores indican el huésped *Notropis boucardi* y *Gila conspersa*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>R. mexicana</i>								
2 <i>R. kidderi</i>	13.46%							
3 <i>R. canadensis</i>	12.87%	8.85%						
4 <i>R. ahuehuellensis</i>	10.96%	9.59%	8.11%					
5 <i>R. lichtenfelsi</i>	11.82%	10.31%	8.99%	6.80%				
6 <i>R. canadensis</i>	13.91%	11.76%	10.82%	10.33%	9.02%			
7 <i>R. ictaluri</i>	14.24%	11.97%	11.15%	11.93%	10.61%	12.42%		
8 <i>Spinitectus</i> spp.	15.40%	14.11%	13.13%	13.15%	13.05%	13.94%	14.76	
9 <i>R. xiphophori</i>	12.25%	9.13%	6.96%	5.69%	7.51%	8.59%	8.73%	12.98%

**Cuadro 8.** Divergencias genéticas entre las secuencias del marcador COX1 obtenidas entre poblaciones de las especies *Rhabdochona ictaluri* y *Rhabdochona kidderi*. Los colores indican la localidad *Cenote Choo-ha* y el *Cenote Punta Laguna*, Quintana Roo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>R. kidderi</i>									
2 <i>R. kidderi</i>	3.91%								
3 <i>R. kidderi</i>	0.00%	3.88%							
4 <i>R. ictaluri</i>	12.31%	12.31%	11.43%						
5 <i>R. ictaluri</i>	12.48%	12.30%	11.49%	0.00%					
6 <i>R. ictaluri</i>	12.30%	12.30%	10.91%	0.19%	0.18%				
7 <i>R. ictaluri</i>	12.14%	12.14%	11.09%	0.00%	0.00%	0.18%			
8 <i>R. ictaluri</i>	12.48%	12.30%	11.49%	0.00%	0.00%	0.18%	0.00%		
9 <i>Spinitectus</i> sp. 1	13.45%	13.42%	13.43%	12.88%	14.06%	13.73%	13.57%	14.06%	
10 <i>Spinitectus</i> sp. 2	14.59%	14.59%	15.18%	15.79%	15.79%	16.07%	15.87%	15.79%	8.37%

## Discusión

Las especies son las unidades básicas de la mayor parte de los estudios biológicos, sin embargo, la delimitación de especies es un tema sumamente complejo y controversial (Mayden, 1997; Sites y Marshall, 2004; de Queiroz, 2007; Mckay et al., 2013). Al respecto, se han realizado numerosas propuestas de lo que es una especie y la forma adecuada de delimitarlas (Templeton, 1989; de Queiroz, 2007). Sin embargo, dichas propuestas pueden presentar un escaso significado teórico, una complejidad teórica difícil de aplicar a la realidad o bien, puede estar influenciada por la preconcepción que tienen de los taxónomos sobre los sistemas biológicos que estudian (Hull, 1997; Hey, 2001).

Para tratar de reducir esta problemática, se ha propuesto que la taxonomía sea integrativa, es decir, que la delimitación de especies sea basada en distintas fuentes de evidencia como datos morfológicos, ecológicos, biogeográficos y moleculares (Dayrat, 2005). En este sentido, la problemática taxonómica derivada de la hipótesis de que las especie *Rhabdochona ictaluri* y *Rhabdochona kidderi* se tratan de una misma identidad biológica (Moravec et al., 2012), se aborda por primera vez bajo un contexto integrativo.

Esta hipótesis esta fundamentada en las observaciones realizadas por Moravec y sus colaboradores para algunos ejemplares de *R. kidderi*, es importante señalar que presenta algunas problemáticas. El problema principal reside en que la sinonimia no fue basada en una comparación con los ejemplares tipo de *R. ictaluri*, depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE-6550 y 6551) para establecer posibles similitudes entre los organismos

(Moravec et al., 2012). De acuerdo con estos autores, los caracteres diagnósticos utilizados por Aguilar-Aguilar et al. (2010) para la descripción de *R. ictaluri* (como la presencia de dientes basales en el prostoma, la ausencia de una barba dorsal en la espícula izquierda y la relación longitudinal entre las espículas) no son suficientes para considerarla una nueva especie, debido a que en algunas poblaciones, la especie *R. kidderi* presenta caracteres similares producto de su variabilidad morfológica (Moravec et al., 2012).

Los resultados de la caracterización morfológica realizada en el presente trabajo corroboran que la diferencia más evidente entre ambas especies es la presencia de dientes basales en el prostoma de *R. ictaluri* y la ausencia de estos en *R. kidderi*, como lo había registrado Aguilar-Aguilar et al. (2010). Otras características contrastantes observadas son el tamaño de los organismos, siendo *R. kidderi* más pequeña que *R. ictaluri*; la presencia de un área rugosa en la región subecuatorial del cuerpo de *R. ictaluri* (ausente en *R. kidderi*); así como en el número y tamaño de los huevos en las hembras (siendo numerosos y de menor tamaño respecto al cuerpo en *R. ictaluri* y poco numerosos y grandes en *R. kidderi*).

Para reducir el impacto que la subjetividad en la diferenciación morfológica pueda causar, se han utilizado distintos análisis estadísticos como los métodos multivariados que incluyen a los análisis de discriminantes, de componentes principales o el canónico de discriminantes, ya que permiten comparar entre conjuntos de datos y evidenciar las diferencias o similitudes a través de un valor de significancia (Albrecht, 1980; Cheng et al., 2005; Mazur et

al., 2010; Hernández-Mena et al., 2013; Sereno-Uribe et al., 2013; Egan, 2015). Los resultados obtenidos en el presente estudio del análisis de discriminante y de componentes principales permitieron reconocer que ambas especies son significativamente diferentes, con lo que se corrobora que *R. ictaluri* es morfológicamente diferenciable de *R. kidderi*, lo cual contradice la propuesta de Moravec et al. (2012).

A la par del análisis morfológico, se ha propuesto que el uso de marcadores moleculares es fundamental para la clasificación y el reconocimiento de especies en un contexto integrativo (Dayrat, 2005; Will et al., 2005; Schlick-Steiner et al., 2009; Pante et al., 2015). Esto se debe a que aportan información cuantificable que permite detectar las variaciones genéticas, entre poblaciones de organismos y entre especies, que posiblemente estén siendo ignoradas por una morfología relativamente constante (Avice, 2004; Dayrat, 2005; Hey, 2006; Nadler y Pérez-Ponce de León, 2011) o por una evaluación equívoca o ambigua al comparar entre los organismos (León-Règagnon et al., 1999; Hawkins, 2000; Wiens y Servedio, 2000; McKay et al., 2013). Actualmente existen numerosos trabajos que apoyan esta idea (ver Pante et al., 2015 y las referencias que ahí se citan).

A pesar de que para la diferenciación molecular de especies se prefiere el uso de distintos tipos de marcadores moleculares como mitocondriales, nucleares y ribosomales (Huang et al., 2008; Moura et al., 2008; Eberhardt, 2010; Satler et al., 2013), el uso de marcadores mitocondriales como *COX1* ha demostrado ser útil para distinguir de manera confiable entre especies

estrechamente relacionadas debido a que presenta una tasa de sustitución elevada (Hebert et al., 2003; Ocegüera-Figueroa et al., 2005; Steinauer et al., 2007; Luo et al., 2011; Alcantar-Escalera et al., 2013). En el caso de los nematodos, se ha propuesto que el uso de este marcador se prefiere sobre otros más conservados como los nucleares (Blouin, 2002; Singh et al., 2015).

Si bien no existe un valor establecido de diversidad genética que permita establecer hasta qué punto una especie es diferenciable de otra, diversos trabajos han encontrado un umbral de valores diverso para el porcentaje de divergencia de *COX1*, que va desde el 2% en el caso de aves y lepidópteros (Hebert et al., 2004; Janzen et al., 2005) hasta el 10% en holotúridos (Uthicke et al., 2010). En el caso de los nematodos parásitos, el porcentaje de divergencia del marcador *COX1* encontrado en estudios que abordan la diferenciación molecular de especies es mayor al 6% (Blouin, 1998; Nakano et al., 2006; Solórzano-García et al., 2016; Singh et al., 2015; Chaudhary et al., 2017). En este sentido, los bajos valores de divergencia encontrados entre secuencias pertenecientes a la misma morfoespecie (de 0 a 4.8%) y altos entre secuencias de distintas morfoespecies (de 6.8 a 14.24%) indican que se tiene una identidad, tanto morfológica como genética, para cada una de las especies incluidas en el presente estudio (con excepción de *R. canadensis*). En el caso particular de *R. kidderi*, el porcentaje de divergencia obtenido con respecto a especies cuya diferenciación morfológica no representa ninguna problemática taxonómica como *R. ahuehuellensis* (9.59%) y *R. xiphophori* (9.13%) es incluso menor al resultante de la comparación con *R. ictaluri* (11.97%). Estos resultados dan

mayor apoyo al hecho de que *R. ictaluri* es una especie válida ya que presenta una divergencia mayor al 10% con respecto a *R. kidderi*.

Además de los datos de divergencia genética, los árboles filogenéticos inferidos con máxima verosimilitud e inferencia bayesiana mostraron clados independientes para las secuencias de distintas poblaciones del género *Rhabdochona* utilizadas en el presente estudio. Aunque en el árbol de máxima verosimilitud las especies *R. ictaluri* y *R. kidderi* se agrupan dentro del mismo clado, las secuencias individuales para cada una de estas especies se mantienen separadas, es decir, que tienen una identidad que permite diferenciarlas como especies independientes. Es importante mencionar que la politomía presente en el cladograma obtenido a través de inferencia bayesiana puede atribuirse al efecto de un pobre muestreo de las poblaciones del género *Rhabdochona* en nuestro país. Aún así, a pesar de la politomía basal, cada grupo de secuencias mantiene cohesión de acuerdo con las morfoespecies a las que fueron asignadas.

La cohesión fenotípica y genética encontrada entre las especies comparadas en el presente estudio, parece responder al aislamiento genético producto de barreras ecológicas y biogeográficas (Templeton, 1989). En el caso de helmintos asociados a peces dulceacuícolas, la diversificación de los parásitos ha sido relacionada con el aislamiento geográfico y ecológico de los huéspedes (Pérez-Ponce de León y Choudhury, 2005; 2010; Mejía-Madrid et al., 2007a, b; Alcantar-Escalera et al., 2013; Martínez-Aquino et al., 2013; 2014; Sereno-Uribe et al., 2013; Pérez-Ponce de León et al., 2016). En este sentido, el

hecho de que la especie *R. ictaluri* ha sido registrada únicamente en huéspedes con afinidad neártica como lo son los miembros de la familia Ictaluridae (Mayden et al., 1992; Pérez-Ponce de León y Choudhury, 2002; Helfman et al., 2009; Miller, 2010), mientras que *R. kidderi* ha sido registrada predominantemente en huéspedes con una marcada afinidad neotropical como miembros de las familias Cichlidae y Heptapteridae (Mayden, 1992; Helfman et al., 2009; Miller et al., 2010), sugiere que las barreras biogeográficas y ecológicas podrían estar relacionadas con las diferencias encontradas entre *R. kidderi* y *R. ictaluri*; sin embargo, se requieren más estudios para esclarecerlo.

## CONCLUSIONES

- \* El análisis integrativo de poblaciones de *Rhabdochona kidderi* y *Rhabdochona ictaluri* distribuidas en la región neotropical y la región neártica muestra un alto porcentaje de divergencia genética que permitió diferenciarlas delimitar ambas especies.
- \* Los caracteres morfológicos empleados por Aguilar-Aguilar et al. (2010) para la descripción de *R. ictaluri* son informativos para reconocer esta especie como válida.
- \* Se requieren más estudios para esclarecer el origen, evolución y diversificación del género *Rhabdochona* en ambas regiones biogeográficas.
- \* La inclusión de evidencia derivada de diferentes fuentes de información es muy útil para delimitar especies y reducir el impacto de evaluaciones equívocas basadas en caracteres morfológicos.

## REFERENCIAS

Aguilar-Aguilar, R., Rosas-Valdez, R. and Pérez-Ponce de León. (2010). *Rhabdochona ictaluri* sp. nov. (Nematoda: Rhabdochonidae) from ictalurid catfishes in Mexico. *Acta Parasitologica*, 55, 276–280.

Aguilar-Aguilar, R., Lagunas-Calvo, O. and Rivas, G. (2016). Endohelminths of *Gila conspersa* (Actinopterygii: Cyprinidae) from the Aguanaval River Basin, state of Zacatecas, Central Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 61, 269–273.

Agustí, C. F., Aznar, J. and Raga, A. (2005). *Tetraphyllidean plerocercoids* from western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: a comprehensive morphological analysis. *Journal of Parasitology*, 91, 83–92.

Alcántar-Escalera, F. J., García-Varela, M., Vázquez-Domínguez, E. and Pérez-Ponce de León, G. (2013). Using DNA barcoding to link cystacanths and adults of the acanthocephalan *Polymorphus brevis* in central Mexico. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1116–1124.

Albrecht, G. H. (1980). Multivariate analysis and the study of form, with special reference to canonical variate analysis. *American Zoologist*, 20, 679–693.

Avise, J. C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution, 2nd ed.

Sinauer Associates, Sunderland, EUA, 684 pp.

Blouin, M. (1998). Mitochondrial DNA, diversity in nematodes. *Journal of Helminthology*, 72, 285–289.

Blouin, M. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal of Parasitology*, 32, 527–531.

Casiraghi, M., Anderson, T. J. C., Bandi, C., Bazzocchi, C. and Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, *122*, 93–103.

Caspeta-Mandujano, J. M. 2005. Nematodes parasites of freshwater fish in Mexico: Key to species, descriptions and distribution. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico, 175 pp.

Chaudhary, A., Kansal, G., Singh, N., Shobhna, K., Verma, M., and Singh, H. S. (2017). Molecular identification of *Thelandros scleratus* and *Thelastoma icemi* (Nematoda: Oxyruida) using mitochondrial cox 1 sequences. *Acta Parasitologica*, *62*, 382–385.

Cheng, Q. Q., Li, D. and Ma, L. (2005). Morphological differences between close populations discernible by multivariate analysis: a case study of genus *Coilia* (Teleostei: Clupeiformes).. *Aquatic Living Resources*, *18*, 187–192.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*, 772.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, *85*, 407–415.

Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. and Wilson, A. (2010). Geneious, version 5.0.4. [http:// www.geneious.com](http://www.geneious.com).

Eberhardt, U. A. (2010). Constructive step towards selecting a DNA barcode for Fungi. *New Phytologist*, *187*, 265–268.

Egan, A. N. (2015). Species delimitation and recognition in the *Pedionelum*

*megalanthum* complex (Fabaceae) via multivariate morphometrics. *PhytoKeys*, 44, 65–87.

Falcón-Ordaz, J., Monks, S., Pulido-Flores, G., Bautista-Hernández, C. E. and Hernández-Hernández, S. (2015). Nuevos registros y redescrición de *Rhabdochona xiphophori* Caspeta-Mandujano, Moravec y Salgado- Maldonado, 2001 (Nematoda: Rhabdochonidae) en el Estado de Hidalgo, México. (2015). In: G. Pulido-Flores, S. Monks and M. López-Herrera (Eds.), *Estudios en Biodiversidad, Volumen I* (pp. 38–43) Lincoln: Zea Books.

Garrido-Olvera, L., García-Prieto, L. and Pérez-Ponce de León, G. (2006). Checklist of the adult nematode parasites of fishes in freshwater localities from Mexico. *Zootaxa*, 120, 1–45.

Hawkins, J.A. (2000). A survey of primary homology assessment: different botanists perceive and define characters in different ways. In: R. W. Scotland y R. T. Pennington (Eds.), *Homology & Systematics: coding characters for phylogenetic analysis* (pp. 22–53). London: Taylor & Francis.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. and Dewaard, J. (2003). Barcode of Life: Identifying species with DNA barcoding biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270, 313–321.

Hebert, P. D. N, Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. and Francis C. M. (2004). Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2, e312.

Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E. and Bowen, B. (2009). *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology*, 2nd ed. John Wiley and Sons, London, UK, 720 pp.

- Hernández-Mena, D. I., García-Prieto, L. and García-Varela, M. (2014). Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. *Parasitology International*, 63, 315–323.
- Hey, J. (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 447–450.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. and Chou, L. M. (2008). Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, 66, 167–174.
- Janzen D. H., Hajibabaei, M., Burns, J. M., Hallwachs, W., Remigio, E. and Hebert, P. D. N. (2005). Wedding Biodiversity Inventory of a large and complex *Lepidoptera* fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360, 1835–1845.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
- Lagunas-Calvo, O., Aguilar-Aguilar, R., Islas-Ortega, A. G. and Martínez-Aquino, A. (2016). Parásitos de peces dulceacuícolas de la porción oaxaqueña de la provincia biogeográfica Sierra Madre del Sur. In: I. Luna-Vega, D. Espinosa, R. Contreras-Medina (Eds.), *Biodiversidad de la Sierra Madre del Sur: Una síntesis preliminar*, (pp. 313–323), Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Lamothe-Argumedo, R. (1997). Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. México, D. F: AGT.

León-Règagnon, V., Brooks, D. R. and Pérez-Ponce De León, G. (1999). Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* loos, 1899 (Digenea: Plagiorchiformes): molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology*, 85, 935–946.

Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., Cameron, S. L. and Zhu, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *Bmc genomics*, 12, 84.

Maddison, W. P. and Maddison, D. R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04 <http://mesquiteproject.org>.

Martínez-Aquino, A., Ceccarelli, F.S. and Pérez-Ponce de León, G. (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 London*, 168, 1–16.

Martínez-Aquino, A., Ceccarelli, F.S., Eguiarte, L. E. and Pérez-Ponce de León, G. (2014). Do the Historical Biogeography and Evolutionary History of the Digenean *Margotrema* spp. across Central Mexico Mirror Those of Their Freshwater Fish Hosts (Goodeinae)?. *PLoS ONE*, 9, e101700.

Mayden, R. M., Burr, B. M., Page, L. M. and Miller, R. R. (1992). The native freshwater fishes of North America. In: R. L. Mayden, (Ed), *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes* (pp. 827–863),

California: Stanford University Press.

Mayden, R.L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Claridge, M. F., Dawah, H. A. y Wilson, M. R. (eds.), *Species: The Units of Biodiversity* (pp. 381–424). London: Chapman & Hall Ltd.

Mayr, E. (1966). *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University of Chicago Press, Massachusetts, 797 pp.

Mazur, M., Klajbor, K., Kielich, M., Sowińska, M., Romo, A., Montserrat, J. M. and Boratyński, A. (2010). Intra-specific differentiation of *Juniperus phoenicea* in the western Mediterranean region revealed in morphological multivariate analysis. *Dendrobiology*, 63, 21–31.

McKay, B.D., Mays Jr, H.L., Wu, Y., Li, H., Yao, C-te., Nishiumi, I. and Zou, F. (2013). An empirical comparison of character-based and coalescent-based approaches to species delimitation in a young avian complex. *Molecular Ecology*, 22, 4943–4957.

Mejia-Madrid, H. H., Choudhury, A. and Perez-Ponce de Leon, G. (2007a). Phylogeny and biogeography of *Rhabdochona* Railliet, 1916 (Nematoda: Rhabdochonidae) species from the Americas. *Systematic Parasitology*, 67, 1-18.

Mejia-Madrid, H. H., Vazquez-Dominguez, E. and Perez-Ponce de Leon, G. (2007b). Phylogeography and freshwater basins in Central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography*, 34, 787–801.

Miller, R. R., Minckley, W. L., and Norris, S. M. (2005). *Freshwater fishes of*

Mexico. The University of Chicago Press, Chicago, 652 pp.

Moravec, F., and Huffman, D. G. (1988). Observations on the genus *Rhabdochona* Railliet, 1916 (Nematoda: Rhabdochonidae) from fishes of central Texas, with descriptions of two new subspecies. *Folia Parasitologica*, 35, 341–351.

Moravec, F., Vivas-Rodríguez, C., Scholz, T., Vargas-Vázquez, J., Mendoza-Franco, E., and González-Solís, D. (1995). Nematodes parasitic in fishes of cenotes (= sinkholes) of the Peninsula of Yucatan, Mexico. Part 1. Adults. *Folia Parasitologica*, 42, 115–129.

Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., González-Solís, G. and Caspeta-Mandujano, J. M. (2012). Host-parasite relationships of *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936 (Nematoda: Rhabdochonidae) in fishes of the Lacantún River in the Lacandon rain forest of Chiapas State, southern Mexico, with a key to Mexican species of *Rhabdochona* Railliet, 1916. *Systematic Parasitology*, 82, 1–12.

Nadler, S. A. and Pérez-Ponce de León, G. (2011). Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, 138, 1688–1709.

Nakano, T., Okamoto, M., Ikeda, Y. and Hasegawa, H. (2006). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene and nuclear rDNA regions of *Enterobius vermicularis* parasitic in captive chimpanzees with special reference to its relationship with pinworms in humans. *Parasitology Research*, 100, 51–57.

Oceguera-Figueroa, A., León-Règagnon, V. and Siddall, M. E. (2005). Phylogeny

and revision of Erpobdelliformes (Annelida, Arhynchobdellida) from Mexico based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 72, 191–198.

Page, R. D. M. (2003). *Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution*. Chicago: University of Chicago Press.

Pante, E., Schoelinck, C., and Puillandre, N. (2015). From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology*, 64, 152–160.

Pearse, A. S. (1936). Parasites from Yucatan. *Carnegie institute of Washington Publications*, 457, 45–59.

Pérez-Ponce de León, G. and Choudhury, A. (2002). Adult endohelminth parasites of ictalurid fishes (Osteichthyes: Ictaluridae) in México: empirical evidence for biogeographical patterns. *Comparative Parasitology*, 69, 10–19.

Pérez-Ponce de Leon, G. and Choudhury, A. (2005). Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and processes. *Journal of Biogeography*, 32, 645–659.

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

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

Pérez-Ponce de Leon, G., García-Varela, M., Pinacho-Pinacho, C. and Poulin, R.

(2016). Species delimitation in trematodes using DNA sequences: Middle-American *Clinostomum* as a case study. *Parasitology*, *15*, 1–17.

de Queiroz K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, *56*, 879–886.

Rambaut, A. & Drummond, A. FigTree v1. 3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh (2010). <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.

Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *12*, 1572–1574.

Satler, J. D., Carstens, B. C. and Hedin, M. (2013). Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Systematic Biology*, *62*, 805–823.

Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian E. and Crozier, R. H. (2009). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, *55*, 421–438.

Silvestro, D. and Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity Evolution*, *12*, 335–337.

Singh, N., Chaudhary, A. and Singh, H. S. (2015). Molecular phylogeny of nematodes (Oxyurida: Travassosinematidae) from orthoptera (Gryllotalpidae) inferred by mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Bioinformation*, *11*, 343–347.

Sites Jr., J. W., and Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*, 462–470.

Sereno-Uribe, A. L., Pinacho-Pinacho, C. D., García-Varela, M. and Pérez-Ponce

de León, G. (2013). 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. *Parasitology Research*, 112, 2855–2870.

Solórzano-García, B., Nadler, S. A. and Pérez-Ponce de León, G. (2016). Pinworm diversity in free-ranging howler monkeys (*Alouatta* spp.) in Mexico: morphological and molecular evidence for two new *Trypanoxyuris* species (Nematoda: Oxyuridae). *Parasitology International*, 65, 401–411.

StatSoft Inc. (2005) STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

Steinauer, M. L., Nickol, B. B., and Orti, G. (2007). Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology*, 16, 4097–4109.

Templeton, A. R. (1989). The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: Otte, D. and Endler, J. (eds.), *A Speciation and Its Consequences* (pp. 3–27). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882.

Uthicke, S., Byrne, M. and Conand, C. (2010). Genetic barcoding of commercial Bêche-de-mer species (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Ecology*, 10, 634–646.

Wiens, J. J. and Servedio, R. M. (2000). Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society*, 267, 631–636.

Will, K. P., Mishler, B. D. and Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 844–851.