



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Taxonomía y sistemática molecular de algunas especies del género  
*Phyllodistomum* Braun 1899, endoparásitos de peces  
dulceacuícolas de México y Centroamérica**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**LESLIE YADIRA OCHOA MOLINA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA**

**2017**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.**





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.

## ÍNDICE

I.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
	I.I. Familia Gorgoderidae Looss, 1899.....	2
	I.II. Género <i>Phyllodistomum</i> Braun, 1899.....	4
	I.III. Ciclo de vida general del género <i>Phyllodistomum</i> Braun, 1899.....	6
	I. IV. Registros del género <i>Phyllodistomum</i> Braun, 1899 en América.....	8
	I.V. Marcadores moleculares.....	9
II.	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	12
III.	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
	III.I. Objetivo general.....	13
	III.II. Objetivos particulares.....	13
IV.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	13
	IV.I. Colecta de huéspedes.....	13
	IV.II. Examen helmintológico.....	14
	IV.III. Caracterización morfométrica.....	14
	IV.IV. Caracterización molecular.....	15
	IV.V. Alineamiento y análisis filogenético.....	17
V.	<b>RESULTADOS</b> .....	24
	V.I. Caracterización morfológica.....	25
	V.II. Análisis filogenético (28S).....	51
	V.III. Análisis filogenético ( <i>cox 1</i> ).....	54
VI.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	56
VII.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	59



<p>1. Datos del alumno  Apellido paterno  Apellido materno  Nombre  Teléfono  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Carrera  Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno  Ochoa  Molina  Leslie Yadira  55 46 97 90 81  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  308289358</p>
<p>2. Datos del tutor  Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor  Dr.  José Martín  García  Varela</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1  Dr.  Gerardo  Pérez  Ponce de León</p>
<p>4. Datos del sinodal 2  Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2  M. en C.  Luis  García  Prieto</p>
<p>5. Datos del sinodal 3  Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3  M. en C.  María Berenit  Mendoza  Garfias</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4  M. en C.  David Iván Guadalupe  Hernández  Mena</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito  Título</p>	<p>8. Datos del trabajo escrito  Taxonomía y sistemática molecular de algunas especies del género <i>Phyllodistomum</i> Braun 1899, endoparásitos de peces dulceacuícolas de México y Centroamérica</p>

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por todo su apoyo a lo largo de todos estos años, sus sacrificios, valentía, y sobre todo su infinito amor incondicional, esto es por y para ti ¡Muchas gracias, ma!

A mis abues, mis papás, quienes han sido siempre un ejemplo a seguir, por su humildad, sus innumerables muestras de amor, sus anécdotas y consejos. Siempre van conmigo...y “¡Adelante!”

A mis tías: Bertha, Eujenia, Oliday y Susana por ser una mezcla rara y maravillosa de mamás, hermanas y amigas, por apoyarme desde siempre, porque sin ustedes esto no sería posible, por llenar mi vida de alegría y buenos momentos y porque gracias a ustedes nunca me siento sola.

A Bárbara, una pequeña estrella que me ilumina e inspira desde que llegó a mi vida.

A Machina y Matola, por procurarme, por todas sus enseñanzas y su amor, están en mi corazón.

A mi tía Irene y Jorge, por tanto cariño y apoyo a lo largo de estos años.

A mi familia, por su calidez, unión y buenos momentos, me siento afortunada de formar parte de ella.

A mi segunda familia, mis amigos: Daniel, Sandy, Dalia, Isamar, Irais, Jacobo, Carlos y Chang, por ser las personas más constantes, por quererme tanto, por conservarme en sus vidas a pesar de los años y por alentarme a seguir adelante siempre.

A David Hernández, por su gran apoyo y amistad, son invaluable. ¡Muchas gracias!

A Pol, Ale y Lalito, por ser los mejores compañeros de laboratorio, por tanto apoyo y risas a lo largo del proyecto, ¡Muchas gracias!

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Martín García Varela, mi tutor, por haberme aceptado en su laboratorio, sus enseñanzas y confianza para realizar este proyecto.

Al Programa de Apoyo y Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo económico concedido en el proyecto IN206716.

Al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, la profesora Berenit Mendoza Garfias y el profesor Luis García Prieto, por haber aceptado ser parte de mi jurado, por tomarse el tiempo para revisar este proyecto y enriquecerlo con sus comentarios.

A La Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por tanto aprendizaje, buenas amistades, momentos y viajes que me han formado.

## I. INTRODUCCIÓN.

El Phylum Platyhelminthes, comúnmente referido como gusanos planos se caracterizan por ser organismos acelomados, aplanados dorsoventralmente, de simetría bilateral y hermafroditas (con algunas excepciones) (Gibson *et al.*, 2002; García-Prieto *et al.*, 2014). El grupo está compuesto por organismos de vida libre (como los turbelarios) y parásitos. Particularmente los parásitos pertenecen a tres clases: Monogonoidea, Cestoda, y Trematoda. Los monogéneos presentan un cuerpo elongado con tegumento sincicial dividido en 5 regiones: 1) región cefálica (anterior a la faringe), un órgano adhesivo anterior (prohaptor) que consiste en una o dos ventosas asociadas a órganos sensoriales compuestos y de alimentación 3) tronco (el cuerpo propiamente), 4) pedúnculo (porción del cuerpo cónico posteriormente) y 5) un órgano adhesivo posteriormente (haptor) (Roberts & Janovy, 2005), el cual es muscular armado con ganchos, pinzas y/o ventosas (García-Prieto *et al.*, 2014); generalmente ectoparásitos de peces (branquias) e invertebrados (moluscos, crustáceos y calamares) (Roberts & Janovy, 2005). Los cestodos presentan un cuerpo alargado dividido en 3 regiones: 1) escólex, provisto de estructuras de fijación (ventosas, ganchos, botridios, rostelo); 2) cuello, región poco diferenciada, situado inmediatamente después del escólex, contiene células germinales que dan lugar de manera constante a los proglótidos, proceso conocido como estrobilación y 3) estróbilo, estructura que contiene los proglótidos, los cuales, según su estado de desarrollo, se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos; endoparásitos del tracto digestivo de vertebrados, utilizando como huéspedes intermediarios



a vertebrados e invertebrados (Quiroz, 2005). La clase Trematoda se divide en dos subclases: Aspidogastrea y Digenea. Particularmente los digeneos son un grupo diverso, ya que cuentan con aproximadamente 18, 000 especies descritas, distribuidas en todo el mundo; son hermafroditas, presentan un cuerpo elongado, ovalado, tubular y usualmente presentan dos ventosas musculares. Tienen alternancia de generaciones, presentan un ciclo de vida complejo en el que involucran varias fases larvarias de vida libre o parásitas de invertebrados y una etapa adulta, donde parasitan intestino y otros órganos o tejidos de los huéspedes definitivos (Gibson *et al.*, 2002). En México hasta la fecha, se han descrito 269 especies de monogéneos, 202 de céstodos y 544 de tremátodos (García-Prieto *et al.*, 2014).

#### **I.I. Familia Gorgoderidae Looss, 1899.**

Los miembros de la familia Gorgoderidae Looss, 1899 (Trematoda) son endoparásitos que se encuentran en la vejiga urinaria, uréteres y vejiga natatoria de peces elasmobranquios, teleósteos, anfibios y reptiles distribuidos en todo el mundo. La familia Gorgoderidae Looss, 1899 contiene 2 subfamilias: Gorgoderinae Looss, 1899 y Anaporrhutinae Looss 1901 (Campbell, 2008). La subfamilia Gorgoderinae contiene 12 géneros: *Phyllodistomoides* Brooks, 1977; *Neophyllodistomum* Moravec & Nie, 2002; *Dendrorchis* Travassos, 1926; *Cetiotrema* Manter, 1970; *Xystretrum* Linton, 1910; *Amazonadistoma* Thatcher, 1979; *Pseudophyllodistomum* Cribb, 1987; *Gorgoderina* Looss, 1902; *Phyllodistomum* Braun, 1899; *Gorgotrema* Dayal, 1938; *Progorgodera* Brooks & Buckner, 1976; *Gorgodera* Looss, 1899.

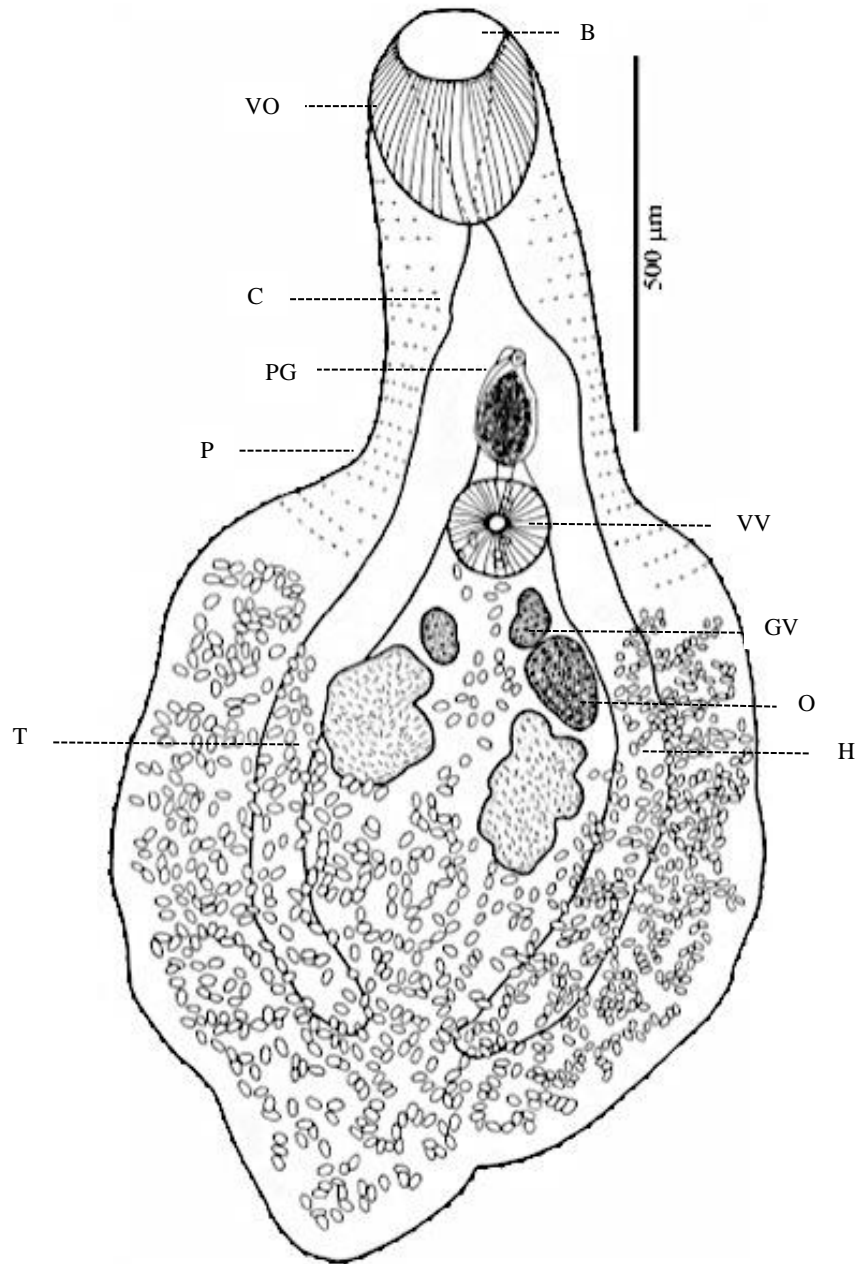
La subfamilia Anaporrhutinae contiene cinco géneros: *Degeneria* Campbell, 1977; *Bicornuata* Pearse, 1949; *Probolitrema* Looss, 1902; *Plesiochorus* Looss, 1901; *Anaporrhutum* Brandes en Ofenheim, 1900 y tres subgéneros: (*Anaporrhutum*) Brandes en Ofenheim, 1900; (*Staphylorchis*) Travassos, 1922 y *Petalodistomum* Johnston, 1913 (Campbell, 2008).

Los miembros de esta familia presentan un cuerpo aplanado, ovalado, estrecho y uniforme, puede estar dividido en una parte anterior distintivamente estrecha y una parte posterior ensanchada. Tegumento liso, raramente con espinas dispersas, algunas especies presentan papilas. Ventosas desarrolladas. La ventosa oral redondeada, subterminal. Ventosa ventral usualmente proyectada prominentemente. Prefaringe presente o ausente. Faringe presente o ausente. Esófago usualmente visible. Bifurcación intestinal en el cuerpo anterior. Ciegos simples, raramente diverticulados, en algunos casos sinuosos, alcanzando casi el extremo posterior, pueden unirse en la parte posterior. Dos o más testículos en la región posterior del cuerpo, inter o extracecales, o sobrepuestos a los ciegos, simétricos o asimétricos. Saco del cirro o saco-pseudosinuoso raramente presente. Vesícula seminal y pars prostática usualmente poco desarrollada. Poro genital medial, entre la bifurcación intestinal y la ventosa ventral. Ovario submedial o medial, intercecal, pretesticular, paratesticular u ocasionalmente post-testicular. Receptáculo seminal y canal de Laurer presente o ausente. Útero en el cuerpo posterior; desciende al cuerpo posterior y asciende al poro genital. Huevos pequeños no operculados. Dos glándulas vitelógenas, a menudo lobuladas o compactas, anteriores al ovario en el cuerpo posterior, intercecales,

ocasionalmente extracecales y pretesticulares. Vesícula excretora en forma de “I”, “Y” y en algunos casos en forma de “H”; poro terminal o subterminal (Campbell, 2008).

## **I.II Género *Phyllodistomum* Braun, 1899.**

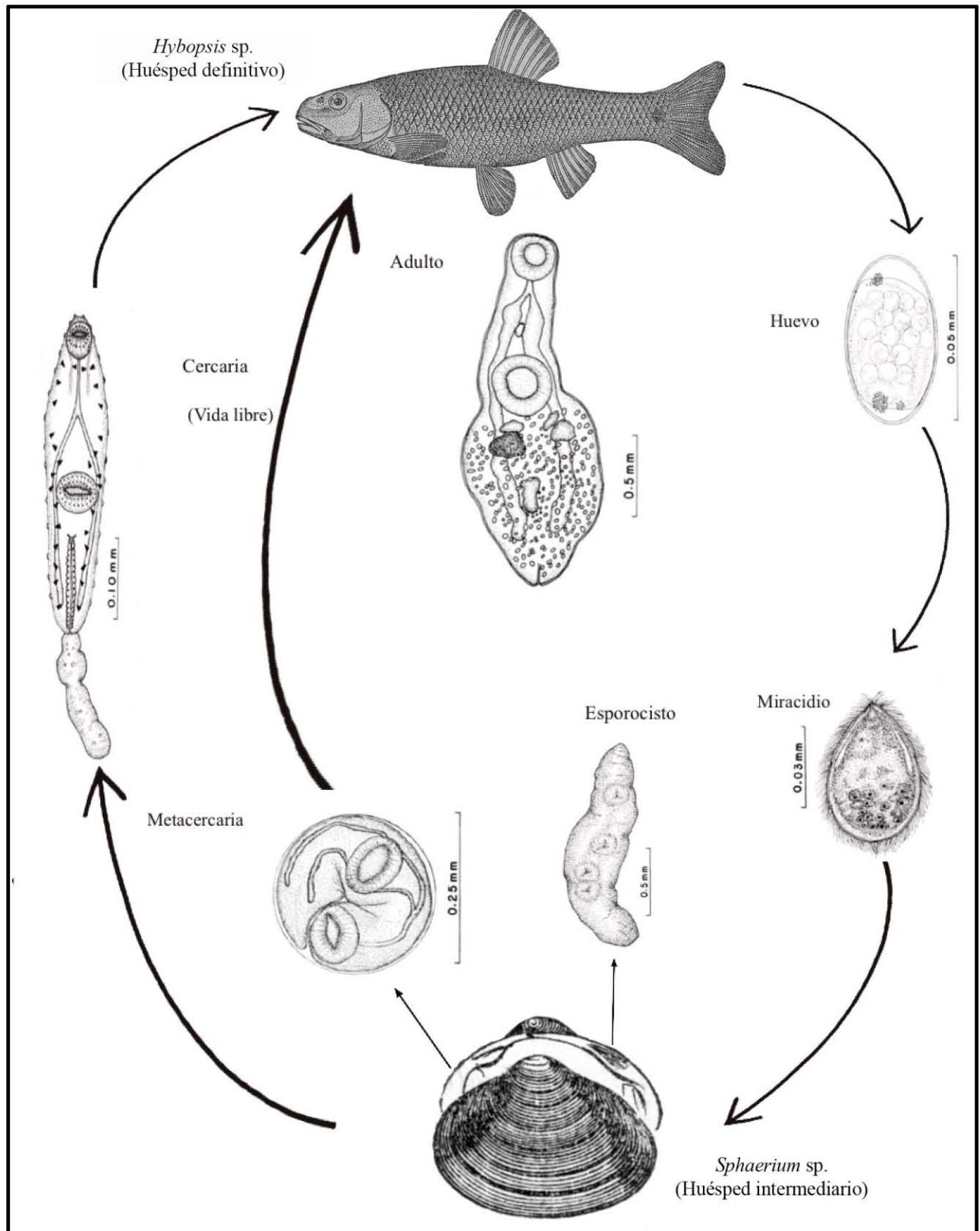
El género *Phyllodistomum*, contiene 120 especies y es considerado como uno de los grupos más diversos entre los digéneos (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015; Stunžėnas *et al.*, 2017). Su distribución es cosmopolita y se encuentran parasitando la vejiga urinaria, ocasionalmente la vejiga natatoria de peces marinos y dulceacuícolas, así como el ovario de anfibios y reptiles (Campbell, 2008; Ho *et al.*, 2014). En la descripción del género *Phyllodistomum*, Campbell (2008), señaló que estos parásitos presentan una forma espatulada, foliada, ensanchada en la parte posterior del cuerpo, con más o menos márgenes crenulados. Ventosa oral terminal. Ventosa ventral pre-ecuatorial. Faringe ausente. Ciegos simples, sinuosos que terminan cerca de la extremidad posterior. Poro genital medial. Dos testículos lobulados, intercecales, diagonales o simétricos, en la parte más ancha del cuerpo posterior. Saco del cirro ausente. Ovario posterior a la ventosa ventral, submedial, pretesticular. Receptáculo seminal ausente. Vesícula seminal submedial. El útero ocupa casi toda la parte posterior del cuerpo, se extiende hasta el área extracecal. Dos glándulas vitelógenas, algunas lobuladas. Una vesícula excretoras, en forma de “I”, poro excretor terminal o subterminal (Figura 1).



**Figura 1.** Anatomía de *Phyllodistomum spinopapillatum*. Vista ventral. Abreviatura: Ventosa oral (VO), Boca (B), Ciegos (C), Poro genital (PG), Papilas (P), Ventosa ventral (VV), Glándulas vitelógenas (GV) Ovario (O), Testículos (T), Huevos (H). (Esquema tomado de Pérez-Ponce de León et al., 2015b).

### **I.III. Ciclo de vida general del género *Phyllodistomum* Braun, 1899.**

El adulto libera sus huevos a través de la orina del pez (huésped definitivo) en el medio acuático donde eclosiona y se libera un miracidio ciliado (larva libre nadadora) que penetra el hemocele de un bivalvo o crustáceo (huésped intermediario) con ayuda de glándulas de penetración (Yamaguti, 1975) y alcanzan las gónadas (Cribb, 1987a; Cutmore, *et al.*, 2013) o las branquias (Cribb, 1987a; Petkevičiūtė, *et al.*, 2015) en donde se reproduce asexualmente y se desarrolla en un esporocisto (madre e hijo). El esporocisto hijo da lugar a las cercarias en aproximadamente 60 días (Yamaguti, 1975) y éstas emergen del esporocisto hijo a través del poro de nacimiento y se enquistan en el mismo huésped alcanzando la fase infectiva llamada metacercaria (Cribb, 1987b). Una vez que el pez ingiere al invertebrado con las metacercarias se completa el ciclo de vida. Una vía alterna es cuando la cercaria se libera a través del sifón del bivalvo y penetra directamente al pez, alcanzando la vejiga urinaria en donde se desarrolla el adulto (Yamaguti, 1975) (ver Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Phyllodistomum nocomis* (Esquemas de los estadios en desarrollo tomados de Wanson & Larson, 1972).

#### **I.IV. Registros del género *Phyllodistomum* Braun, 1899 en América.**

En el Continente Americano, se han descrito al menos 42 especies del género *Phyllodistomum* en peces marinos, estuarinos y dulceacuícolas. Hasta la fecha, en México, se han descrito 5 especies: *P. centropomi* Mendoza-Garfias & Pérez-Ponce de León, 2005; *P. inecoli*, Razo-Mendivil *et al.*, 2013; *P. spinopapillatum* Pérez Ponce de León *et al.*, 2015a; *P. wallacei* Pérez Ponce de León *et al.*, 2015b; (Rosas-Valdez *et al.*, 2011; Razo-Mendivil *et al.*, 2013; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015 a,b); *P. cribbi* Pérez Ponce de León *et al.*, 2015b; además se han registrado otras 4 especies en México: *P. lacustri* Lowen, 1929; *P. carangis* Manter, 1947; *P. marinae* Bravo-Hollis & Manter, 1957 y *P. mirandai* Lamothe, 1969. La taxonomía de este género es controversial y su sistemática ha sido abordada empleando distintos marcadores moleculares, Rosas-Valdez *et al.*, (2011), propusieron, mediante el gen nuclear de la subunidad mayor del 28S del ADN ribosomal nuclear y el gen Citocromo C Oxidasa subunidad I (*cox 1*) la presencia de tres especies crípticas de *Phyllodistomum lacustri* a lo largo de su distribución geográfica en Norteamérica; adicionalmente, Cutmore *et al.*, (2013), demostraron mediante genes ribosomales tales como los Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) y el gen nuclear 28S, que el género *Phyllodistomum* es parafilético (con respecto al género *Pseudophyllodistomum* y *Xystretrum*) y por lo tanto su taxonomía debe ser abordada empleando taxonomía integrativa (fuentes de información ecológica, morfológica y molecular).

## **I.V. Marcadores moleculares.**

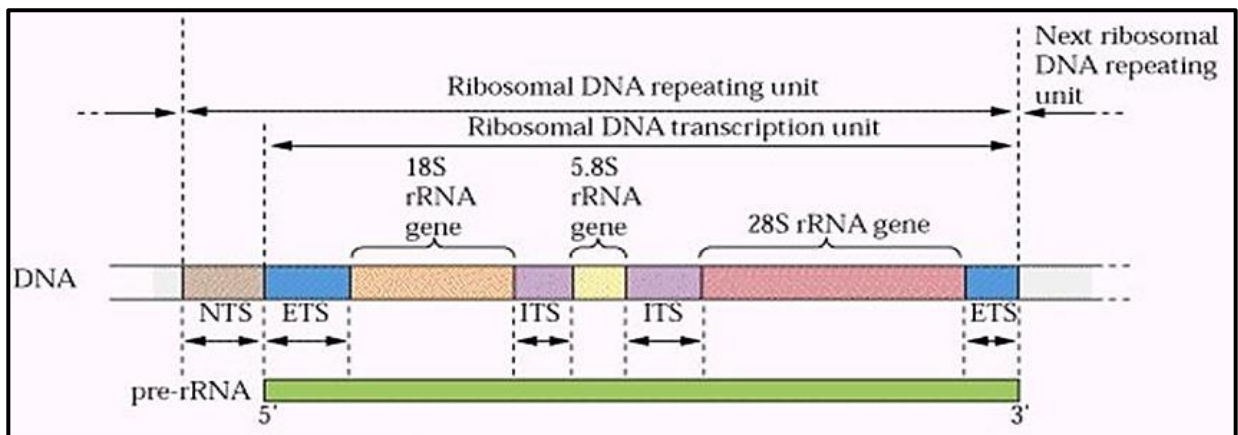
La identificación de las especies en digeneos se basa en características morfológicas de los adultos, fases larvarias y en características ecológicas (tipo de huésped definitivo y ciclo de vida *ex situ*). Sin embargo, la incertidumbre sobre la validez de algunos caracteres morfológicos diagnósticos y la plasticidad fenotípica son factores que han impedido la correcta determinación taxonómica de las especies (León- Règagnon *et al.*, 1999; Nolan & Cribb, 2005). Estos problemas han motivado la utilización de herramientas alternas como las secuencias de ADN. Las secuencias del ADN ofrecen varias ventajas que se enumeran a continuación: 1) La generación de los datos moleculares es relativamente rápida 2) Diferentes regiones del genoma pueden ser usadas para identificar poblaciones, especies, géneros, etc. 3) El número de caracteres moleculares que se analizan es mucho mayor que el de los caracteres morfológicos 4) La variación en las secuencias de ADN no son influenciadas por el fenotipo (McManus & Bowles, 1996).

### **ADN Ribosomal.**

En el genoma de los eucariontes, los genes ribosomales se encuentran en un gran número de copias, en *tándem*, las cuales sufren un fenómeno de recombinación que homogeniza sus secuencias nucleotídicas (evolución concertada). La unidad de transcripción de los genes ribosomales se conforma de tres genes (18S, 5.8S y 28S) y de dos Espaciadores Transcritos Internos (ITS1, ITS2) (Fig. 3). Las regiones que separan a estas unidades son conocidas como Espaciadores No Transcritos (NTS). Los genes ribosomales y sus regiones



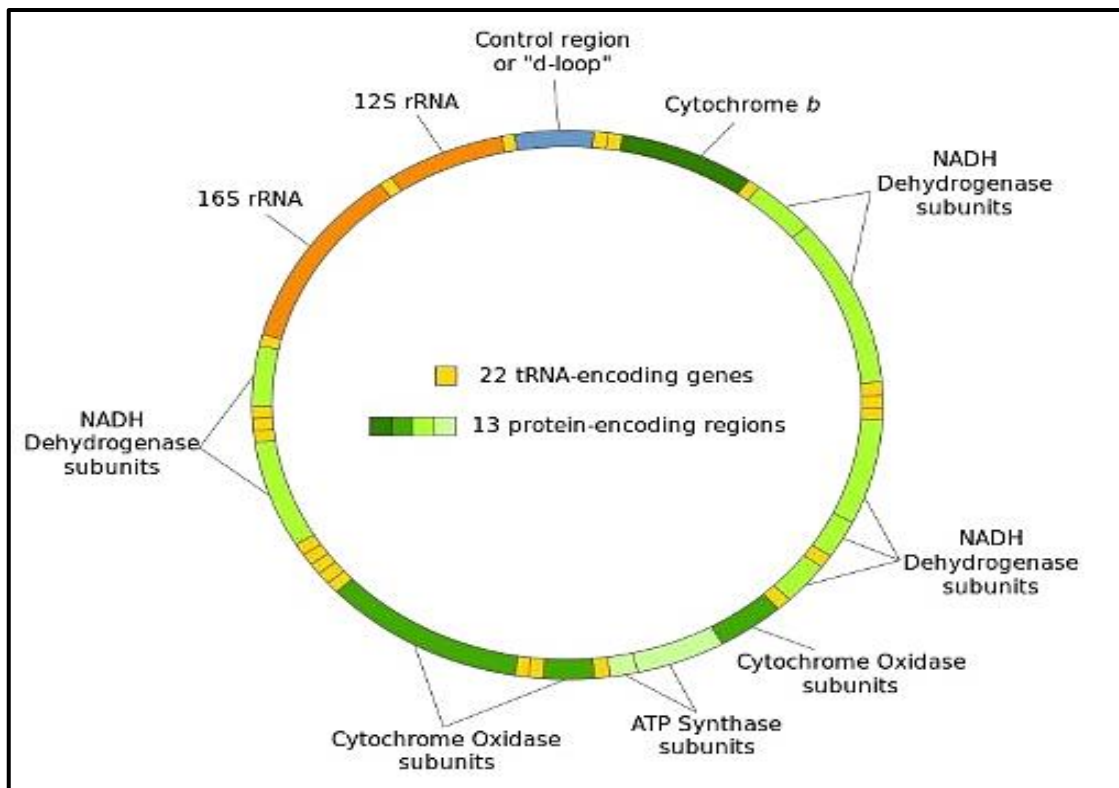
espaciadoras (transcritas y no transcritas) son llamadas colectivamente ADN ribosomal (rADN). El rADN ha sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos a distintos niveles taxonómicos, debido a que presenta regiones conservadas (genes) y variables (espaciadores) que pueden ser usadas para separar a los taxones (Hillis & Dixon, 1991). Particularmente los ITS son regiones pequeñas de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) que tienen una alta tasa de mutación, esta característica los convierte en perfectos marcadores moleculares, para separar poblaciones, especies y géneros, así como para definir complejos de especies crípticas (Luton *et al.*, 1992; Adlard *et al.*, 1993; Deprés *et al.*, 1995; Jousson *et al.*, 1998; Bell & Sommerville, 2002; León-Régagnon & Brooks, 2003; Razo-Mendivil, *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Organización de la unidad de transcripción del ADN ribosomal en eucariontes. Se muestran las regiones de los Espaciadores no Transcritos (NTS), Espaciadores Transcritos Externos (ETS), Espaciadores Transcritos Internos (ITS) y los genes 18S, 5.8S y 28S. Tomado de <http://slideplayer.es/slide/150624/>.

## **ADN Mitocondrial.**

Una de las moléculas más ampliamente utilizada en análisis filogenéticos es el ADN mitocondrial. Esta es una molécula circular de aproximadamente 16-20 kilobases (Fig. 4). El genoma contiene un total de 37 genes (13 RNA mensajeros, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia) (Avice *et al.*, 1987). Una de las propiedades más importantes de estos genes es su alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, su nula recombinación, variación intraespecífica y su herencia materna (con escasas excepciones); estas características permiten describir la historia matrilineal de organismos coespecíficos y con ello el poder aplicar estimaciones de reloj molecular y hacer análisis de coalescencia (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). En helmintos parásitos se han utilizado algunos genes mitocondriales para inferir la evolución de los grupos y separar especies hermanas (Macnish *et al.*, 2002; Bensch *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2005; Grillo *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunos helmintos se ha reportado la presencia de pseudogenes mitocondriales, los cuales están asociados al uso de primers universales (Benesh *et al.*, 2006; García-Varela *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Molécula de ADN mitocondrial (mtADN) en metazoarios que contiene las subunidades del gen Citocromo Oxidasa. Tomado de <http://www.mdalert.com/ms/adc/article/mitochondrial-dna-methylation--the-next-diabetes-biomarker>).

## II. JUSTIFICACIÓN.

El género *Phyllodistomum* es uno de los más diversos entre los digeneos, sus especies parasitan varias familias de peces dulceacuícolas de Norte y Centroamérica. Particularmente en países como México, Honduras, Nicaragua y Costa Rica, los miembros del género *Phyllodistomum* presentan gran variación morfológica intraespecífica y su genética ha sido poco estudiada, por lo cual son un grupo de interés para la fauna helmintológica de México y Centroamérica que es necesario esclarecer sus relaciones filogenéticas a partir de datos

moleculares, ecológicos y morfológicos, lo cual permitirá delimitar a las especies con mayor precisión.

### **III. OBJETIVO.**

Delimitar algunas especies del género *Phyllodistomum* distribuidas en México y Centroamérica, empleando taxonomía integrativa (fuentes de información ecológica, morfológica y molecular).

#### **III.I. Objetivos particulares.**

1. Reconocer linajes independientes empleando caracteres moleculares.
2. Proponer una hipótesis filogenética para las especies del género *Phyllodistomum* que fueron colectadas en el presente estudio.

### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **IV.I. Colecta de los huéspedes.**

Los peces fueron colectados por medio de redes de enmalle y con la ayuda de un equipo de electropesca, en cuencas hidrológicas del Golfo de México y Océano Pacífico, en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca y Chiapas, así como en una localidad en Honduras, dos en Nicaragua y una en Costa Rica (ver Tabla 1 y Fig. 5).

#### **IV.II. Examen helmintológico.**

Los peces colectados, se transportaron al laboratorio para su revisión bajo el microscopio estereoscópico con el objetivo de extraer la vejiga urinaria, la cual fue examinada con detenimiento ya que es el hábitat principal donde se encuentran los miembros del género *Phyllodistomum*. Una vez localizados los parásitos, algunos ejemplares se fijaron en formol caliente al 4% para los estudios morfológicos y otros organismos se preservaron en etanol absoluto, método que permite la fijación del material genético.

#### **IV.III. Caracterización morfométrica.**

Los ejemplares fijados en formol al 4% se tiñeron con la técnica de paracarmín de Mayer (ver Anexo 1) y tricrómica de Gomori (Ver Anexo 2). Los ejemplares se montaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos con bálsamo de Canadá realizando preparaciones permanentes, las cuales se emplearon para tomar fotografías con un microscopio óptico y una cámara (*Leica MC 170 HD*) y posteriormente los datos merísticos, con la ayuda del programa de cómputo (*Leica Application Suite 4.5*). Otros ejemplares fueron procesados para realizar observaciones en el microscopio electrónico de barrido (MEB) para ello, los ejemplares fueron deshidratados, secados a punto crítico, montados en portamuestras de aluminio sobre cinta de carbón, para posteriormente ser cubiertos con oro. Los ejemplares se examinaron en un MEB Hitachi, *modelo SU1510*, con presión variable a 10 Kv. Los

ejemplares analizados en este trabajo se depositarán en la Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, UNAM.

#### **IV.IV. Caracterización molecular.**

Los parásitos preservados en etanol absoluto, se colocaron individualmente en un tubo de 0.5 ml que contenían 100 µl de la solución de digestión (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 200mM NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 10% Sarkosil, 0.1 mg/ml de proteinasa K y agua ultrapura) y se incubaron por 12 horas a 56°C. Posteriormente los tubos se incubaron a 95°C durante 15 minutos, para desactivar la proteinasa K. El ADN genómico se aisló del sobrenadante usando el reactivo DNAzol (Invitrogene, CA, USA). La amplificación de los genes nucleares y mitocondriales se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers Forward 391 (5'- AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') (Carreno & Nadler *et al.*, 2003) y Reverse 536 (5'-CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3') (García-Varela & Nadler, 2005) en el caso del gen 28S del ADN Ribosomal. Para el gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad I (*cox 1*) se emplearon los primers Forward JB3 (5'- TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') y Reverse JB4.5 (5'- TAAAGAAAGAACATAATGAAATG-3') (Bowles *et al.*, 1992). El contenido final de la mezcla de reacción fue de 25 µl que incluía, 2.5 µl de Buffer Platinum 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de dNTPs, 1 µl de cada primer, 0.125 µl de Taq polimerasa Platinum (Invitrogene, CA, USA), 16.375 µl de agua destilada y 2 µl del ADN genómico. Las muestras se incubaron en un termociclador. El programa de amplificación consistió en los siguientes pasos:

1) 94°C 5 minutos: Desnaturalización; 2) 94°C 1 minuto: Desnaturalización; 3) 50°C 1 minuto: Alineación de los primers; 4) 72°C 1 minuto: Elongación; 5) Repetir 35 veces a partir del paso número dos; 6) 72°C 5 minutos: Extensión de la Taq polimerasa; 7) 8°C 12 horas. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con Red Gel en un buffer de Tris-Boratos-EDTA.

Los productos amplificados se marcaron a través de una reacción de PCR con el método de Sanger (Sanger, 1977) el cual se basa en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3'. El método comienza cuando la doble hélice de ADN es desnaturalizada, posteriormente se le agrega un nucleótido que tiene un grupo libre 3'-OH en su desoxirribosa en donde se añaden los nucleótidos. La muestra se divide en cuatro submuestras, en cada una se le añade uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). La secuencia de ADN es extendida por la ADN polimerasa usando la cadena simple como templado, cuando uno de estos dideoxinucleótidos se incorpora a una cadena en crecimiento, esta cadena no puede continuar con el proceso de elongación debido a que los dideoxinucleótidos carecen del grupo hidroxilo del carbono.

Los electroferogramas derivados de la reacción de secuenciación se exportaron al programa de cómputo Codoncode (versión 5.0.2) en donde se revisó cada pico correspondiente a un nucleótido. Finalmente se ensamblaron las dos cadenas del ADN en una secuencia consenso.

Además, se obtuvieron 77 secuencias de genes nucleares y mitocondriales (de los genes 28S y *cox 1*) del GenBank con la finalidad de compararlas con las secuencias generadas en el presente estudio (Ver Fig. 11 y 12).

#### **IV.V. Alineamiento y análisis filogenético.**

Se construyeron dos matrices de datos en las cuales se incluyeron las secuencias generadas en el presente trabajo de tesis más otras secuencias de la familia Gorgoderidae disponibles en la base de datos del GenBank. Las bases de datos del gen 28S y del *cox 1*, fueron alineadas a través del programa de cómputo ClustalW (Thompson *et al.*, 1997). Los análisis filogenéticos se realizaron a través de los métodos de Máxima Verosimilitud (MV) y de Inferencia Bayesiana (IB). El mejor modelo de evolución que se ajustó fue GTR+G+I a cada base de datos fue estimado utilizando el criterio Akaike Information Criterion (AIC) con el programa de cómputo jModelTest v.2 (Darriba *et al.*, 2012). Para la obtención del árbol de Máxima Verosimilitud se utilizó el modelo de sustitución GTR+GAMMA+I con el programa de cómputo RAxML v. 7.0.4 (Stamatakis, 2006). El soporte de los nodos fue evaluado con búsquedas de 1000 réplicas de bootstrap. Para la obtención del árbol de Inferencia Bayesiana, se empleó el programa MrBayes v. 3.2. (Ronquist *et al.*, 2012), en donde se corrieron dos cadenas de Markov (MCMC) de 10 millones de generaciones cada una y se muestrearon árboles cada 1000 generaciones. Para el burn-in se descartaron las primeras 1500 generaciones. Se construyó un árbol consenso de mayoría del 50% del conjunto de árboles muestreados y los soportes de los nodos fueron estimados a partir de las



probabilidades posteriores (PP). Los árboles obtenidos fueron editados con el programa FigTree v. 1.4.2. Las distancias genéticas entre las especies fue estimada con el método de distancias no corregidas “*p*” en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.5 (Tamura *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Localidades de México y Centroamérica donde fueron colectados los huéspedes y sus respectivas especies del género *Phyllodistomum*.

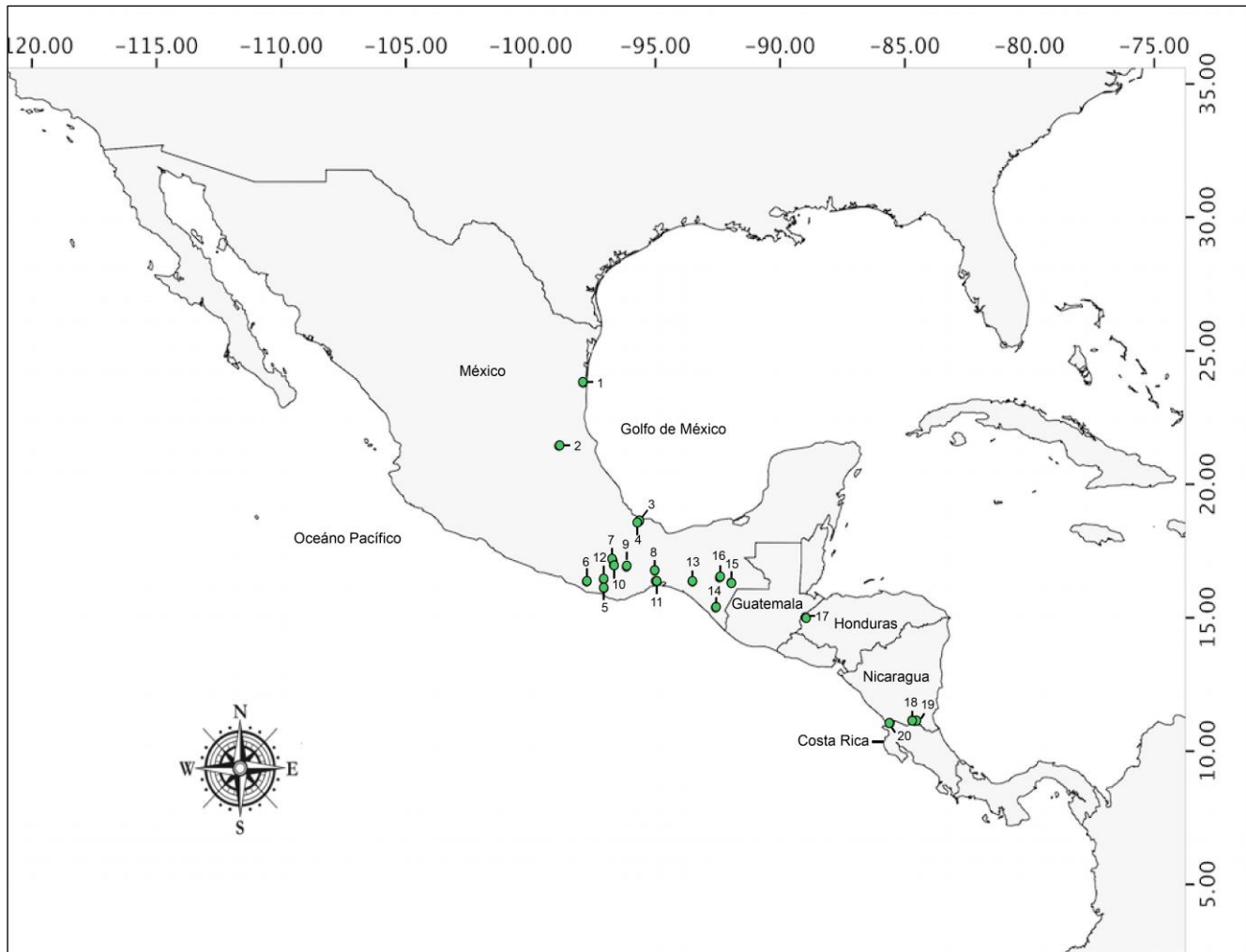
Especie	Huésped	Localidad	Coordenadas		No. DNA	
			N	W	28S	cox-1
<b>MÉXICO</b>						
<b>Tamaulipas</b>						
<i>Phyllodistomum</i> sp. 2	<i>Gobiomorus</i> <i>dormitor</i>	1) Puente 12 Km Sur, Soto La Marina	23°48'3"	97°54'0"	3203	3203
<b>San Luis Potosí</b>						
<i>P. spinopapillatum</i>	<i>Pseudoxiphophorus</i> <i>bimaculatus</i>	2) Axtla de Terrazas	21°26'3.17"	98°52'24.36"	3204, 3212	3204, 3212 Pseudogenes
<b>Veracruz</b>						
<i>Phyllodistomum</i> sp. 3	<i>Eleotris</i> sp.	3) Río La Palma	18°36'40.50"	95°39'43.96"	2180	2180
<i>Phyllodistomum</i> sp. 3	<i>Gobiomorus</i> <i>dormitor</i>	3) Río La Palma	18°36'40.50"	95°39'43.96"	2181, 2186	2181, 2186
<i>P. centropomi</i>	<i>Centropomus</i> <i>parallelus</i>	4) Tlacotalpan	18°36'0"	95°39'0"	1135	1135

**Oaxaca**

<i>P. spinopapillatum</i>	<i>Profundulus balsanus</i>	5) San Gabriel Mixtepec	16°6'20.47"	97°3'46.54"	1986, 1987, 1988	1986, 1987, 1988
<i>P. spinopapillatum</i>	<i>Profundulus balsanus</i>	6) Flores Magón	16°21'6.1"	97° 45' 38. 3"	2205	2205
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus oaxacae</i>	7) Río Cuilapam	17° 7' 30.152"	96° 41' 36. 313"	3211	3211 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus oaxacae</i>	7) Río Cuilapam	17° 7' 30.152"	96° 41' 36. 313"	3202	—
<i>Phyllodistomum</i> sp. 4	Cichlidae	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	2178	2178
<i>Phyllodistomum</i> sp. 4	<i>Vieja regani</i>	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	2485, 2486	2485, 2486
<i>Phyllodistomum</i> sp. 4	<i>Thorychthis ellioti</i>	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	2628	2628
<i>P. inecoli</i>	<i>Xiphophorus helleri</i>	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	2630	—
<i>P. inecoli</i>	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	3208	—
<i>P. inecoli</i>	<i>Pseudoxiphophorus bimaculatus</i>	8) Vistahermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	3209	—

<i>P. inecoli</i>	<i>Pseudoxiphophorus bimaculatus</i>	8) Vista Hermosa, Río Grande, Matías Romero	16°45'46.25"	95°1'27.95"	3210	—
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus</i> sp.	9) San Juan del Río	16°53'57.50"	96°09'57.67"	2206	2206 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Poecilia sphenops</i>	10) Santa María Coyotepec	16°58'38"	96°40'49"	1999, 2000	1999, 2000 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus punctatus</i>	11) Río Los Perros, Santa María	16°22'27.89"	16°22'27.89"	2629	—
<i>P. inecoli</i>	<i>Pseudoxiphophorus bimaculatus</i>	11) Río Los Perros, Santa María	16°22'27.89"	16°22'27.89"	2631	—
<i>P. inecoli</i>	<i>Poecilia sphenops</i>	11) Río Los Perros, Santa María	16°22'27.89"	16°22'27.89"	2632	2632 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	11) Río Los Perros, Santa María	16°22'27.89"	16°22'27.89"	2633	2633 Pseudogenes
<i>P. spinopapillatum</i>	<i>Profundulus oaxacae</i>	12) Río Los Sabinos	16°25'39.9"	97°4'28.9"	2634	2634
<b>Chiapas</b>						
<i>P. inecoli</i>	<i>Poecilia sphenops</i>	13) Río San Juan, Cristóbal Obregón	16°21'00"	93°30'54"	2191	2191 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	13) Río San Juan, Cristóbal Obregón	16°21'00"	93°30'54"	2192	2192 Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus</i>	14) Nueva Francia	15°22'7.58"	92°35'20.20"	2200	2200

	<i>punctatus</i>					Pseudogenes
<i>P. inecoli</i>	<i>Profundulus candalarius</i>	15) La Margarita, Río San Carlos	16°19'10"	91°58'06"	—	2480
<i>P. spinopapillatum/ P.inecoli</i>	<i>Profundulus candalarius</i>	16) La Gloria	16° 30'01"	92° 26'01"	2481, 2482	2481, 2482
<b>HONDURAS</b>						
<i>P. spinopapillatum</i>	<i>Poecilia</i> sp.	17) Quebrada El Paraíso	15°01'26"	88°59'32"	2470	2470 Pseudogenes
<b>NICARAGUA</b>						
<i>Phyllodistomum</i> sp. 1	<i>Archocentrus centrarchus</i>	18) Finca El Espavel, San Carlos	11°08'53.78"	84°42'49.55"	3205, 3213	3205, 3213
<i>Phyllodistomum</i> sp. 5	<i>Rhamdia</i> sp.	18) Finca El Espavel, San Carlos	11°08'53.78"	84°42'49.55"	3206	3206
<i>Phyllodistomum</i> sp. 5	<i>Rhamdia</i> sp.	19) Palo de Arquito	11° 7' 12"	84° 36' 5"	3207	3207
<b>COSTA RICA</b>						
<i>Phyllodistomum</i> sp. 1	<i>Astatheros alfari</i>	20) Río Las Animas	11°02'58"	85°35'12"	2534, 2535, 2536	2534, 2535, 2536



**Figura 5.** Mapa de las localidades muestreadas en México y Centroamérica para este estudio, correspondientes con la Tabla 1.

## V. RESULTADOS

En el presente proyecto de investigación se reconocieron morfológicamente a tres especies del género *Phyllodistomum* (*P. inecoli*, *P. spinopapillatum* y *P. centropomi*) por presentar las siguientes características morfológicas: 1) Forma del cuerpo foliada y espatulada con márgenes crenulados, 2) Ventosa oral terminal, 3) Ventosa ventral pre-ecuatorial, 4) Faringe ausente, 5) Ciegos simples, sinuosos que terminan cerca de la extremidad posterior, 6) Dos testículos lobulados, intercecales, diagonales o simétricos, 7) Saco del cirro ausente, 8) Ovario posterior a la ventosa ventral, submedial, pretesticular, 9) Vesícula seminal submedial, 10) Útero ocupa la parte posterior del cuerpo. Los ejemplares de *P. inecoli* exhibieron una amplia variación morfológica intraespecífica por lo que fueron separados en tres morfotipos. Adicionalmente los análisis filogenéticos inferidos con los dos marcadores moleculares detectaron cinco linajes independientes, reconociendo a cinco especies, las cuales se describen brevemente en esta tesis. Los linajes de *Phyllodistomum* sp. 2 y 5 no se describen ya que no contamos con material para el estudio morfológico.

## V.I. Caracterización morfológica.

Phylum: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Clase: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclase: Digenea Carus, 1863

Orden: Plagiorchiida LaRue, 1957

Superfamilia: Gorgoderoidea Looss, 1899

Familia: Gorgoderidae Looss, 1899

Subfamilia: Gorgoderinae Looss, 1899

Género: *Phyllodistomum* Braun, 1899

Especie: *Phyllodistomum inecoli*

*Phyllodistomum inecoli* Razo-Mendivil, Pérez Ponce de León & Rubio-Godoy, 2013.

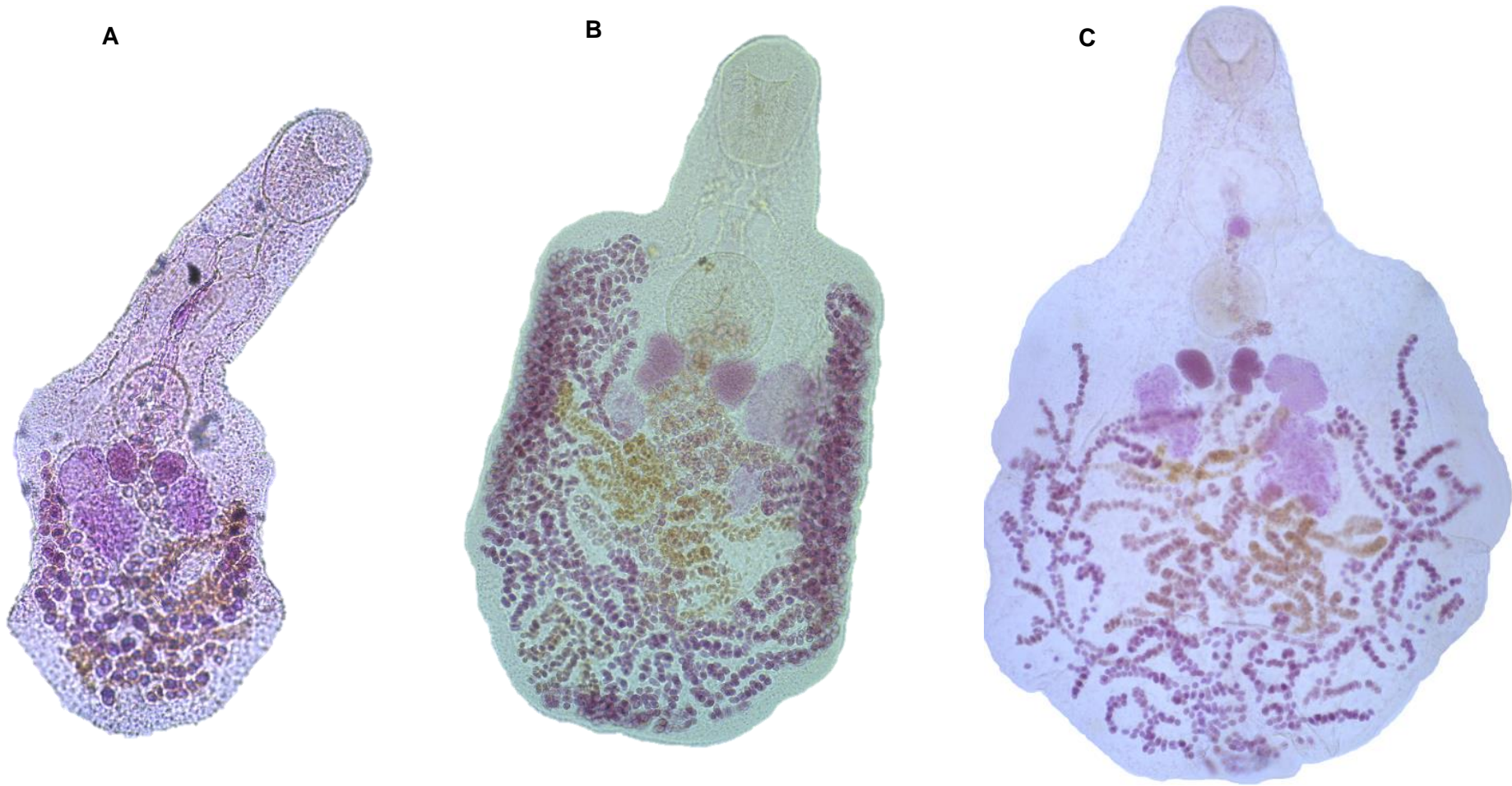
Redescripción: Basada en ocho individuos adultos. Cuatro provenientes de la vejiga urinaria de poecilidos (*Pseudoxiphophorus bimaculatus*) de Santa María Guienagati, Oaxaca, uno de un poecilido (*Poecilia* sp.) de Quebrada El paraíso, Honduras y tres profundulidos (*Profundulus candalarius*) de La Gloria, Chiapas. Los ejemplares de *Pseudoxiphophorus bimaculatus* corresponden al denominado morfotipo 1, el cual es reconocido por presentar un cuerpo espatulado 748-1503 (1066)  $\mu\text{m}$  largo por 385-816 (493)  $\mu\text{m}$  ancho, tegumento papilado, con un pliegue marginal marcadamente cóncavo, crenulado por ambos lados. Parte anterior del cuerpo subcilíndrica alargada 276-454 (391)  $\mu\text{m}$ , 173-306 (216)  $\mu\text{m}$  ancho, casi del mismo tamaño que la parte posterior. Parte posterior del cuerpo presenta un pliegue



marginal pronunciado por cada lado, 481-1114 (670)  $\mu\text{m}$  largo por 327-777 (487)  $\mu\text{m}$  ancho. El tegumento presenta numerosas papilas que sobresalen en la parte anterior del cuerpo y los márgenes laterales. Ventosa oral terminal, ligeramente ovalada, 169-263 (198)  $\mu\text{m}$  largo por 133-214 (161)  $\mu\text{m}$  ancho, mayor que la ventosa ventral 117-467 (218)  $\mu\text{m}$  largo por 102-426 (200)  $\mu\text{m}$  ancho. Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho 94-226 (133)  $\mu\text{m}$  largo. Ciegos largos y estrechos que corren desde la mitad de la parte anterior y terminan después de la mitad de la parte posterior del cuerpo. Glándulas vitelógenas ligeramente ovaladas, anteriores al ovario, glándula vitelógena derecha 38-134 (70)  $\mu\text{m}$  largo por 45-90 (56)  $\mu\text{m}$  ancho, glándula vitelógena izquierda 46-107 (61)  $\mu\text{m}$  largo por 40-101 (56)  $\mu\text{m}$  ancho. Ovario ligeramente lobulado, anfítipico, anterior a los testículos, 73-190 (103)  $\mu\text{m}$  largo por 56-167 (91)  $\mu\text{m}$  ancho. Dos testículos lobulados, asimétricos, en la región media del cuerpo, testículo anterior 110-150 (123)  $\mu\text{m}$  largo por 70-103 (85)  $\mu\text{m}$  ancho, testículo posterior 95-154 (126)  $\mu\text{m}$  largo por 75-85 (80)  $\mu\text{m}$  ancho. El útero está ampliamente plegado en la parte posterior del cuerpo y asciende ventralmente hasta alcanzar el poro genital, por encima de la bifurcación cecal. Huevos ovalados, no operculados, 23-29 (26)  $\mu\text{m}$  largo por 15-20 (18)  $\mu\text{m}$  ancho. Vesícula excretora no visible.

Adicionalmente del morfotipo 1, otros dos morfotipos denominados 2 y 3, fueron reconocidos morfológicamente debido a que muestran una variación en los siguientes caracteres: 1) forma del cuerpo y tamaño, 2) tamaño del cuerpo anterior, 3) número de

pliegues marginales, 4) tamaño de la ventosa oral y ventral y 5) disposición y tamaño de las glándulas vitelógenas, el ovario y los testículos (ver Figura 6; Tabla 2).



**Figura 6.** *Phyllodistomum inecoli*, morfo 1 (A), morfo 2 (B), morfo 3 (C). Endoparásitos de la vejiga urinaria de *Pseudoxiphophorus bimaculatus* de Santa María Guienagati, Oaxaca (A), *Poecilia* sp. de Quebrada El Paraíso, Honduras (B), *Profundulus candalarius* de La Gloria, Chiapas (C). Vista ventral. 10x.

**Tabla 2.** Medidas de los morfos de *Phyllodistomum inecoli* Razo-Mendivil, Pérez Ponce de León & Rubio-Godoy, 2013 reconocidos en esta tesis (Las medidas están dadas en  $\mu\text{m}$ ), los valores entre paréntesis representan la media.

	<i>Phyllodistomum inecoli</i> (Razo-Mendivil et al., 2013)	Morfo 1 Fig. 6 (n=4)	Morfo 2 Fig. 6 (n=1)	Morfo 3 Fig. 6 (n=3)
<b>Huésped</b>	<i>Pseudoxiphophorus bimaculatus</i>	<i>Pseudoxiphophorus bimaculatus</i>	<i>Poecilia</i> sp.	<i>Profundulus candalarius</i>
<b>Localidad</b>	Río La Antigua, Veracruz	Santa María Guienagati, Oaxaca	Quebrada El Paraíso, Honduras	La Gloria, Chiapas
<b>Total del cuerpo</b>				
Longitud	1,156-2089 (1600)	748-1503 (1066)	1504	2034-2597 (2246)
Ancho	492-1132	385-816 (493)	816	1258-1493 (1387)
<b>Pliegues marginales</b>	Sin pliegues	1 por ambos lados	1 pliegue por ambos lados, poco visible, en el extremo posterior	4 por ambos lados
<b>Ventosa oral</b>				
Largo	168-300 (235)	169-263 (176)	263	244-316 (278)
Ancho	149-258 (210)	133-214 (161)	214	243-270 (252)
<b>Ventosa ventral</b>				
Largo	147-273 (200)	117-467 (218)	250	201-248 (220)

	<i>Phyllodistomum inecoli</i> (Razo-Mendivil et al., 2013)	Morfo 1 Fig. 6 (n=4)	Morfo 2 Fig. 6 (n=1)	Morfo 3 Fig. 6 (n=3)
Ancho	141-270 (191)	102-426 (200)	225	193-230 (210)
<b>Prefaringe</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Faringe</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Esófago</b>	103-208 (150)	94-226 (133)	122	125-164 (139)
<b>Bifurcación de los ciegos</b>	A la altura del poro genital	Anterior al poro genital	Posterior al poro genital	Posterior al poro genital
<b>Extensión de los ciegos</b>	Post-testicular	Post-testicular	Post-testicular	Post-testicular
<b>Posición del poro genital</b>	Por debajo de la ventosa oral	Por debajo de la ventosa oral	Por debajo de la ventosa oral	Por debajo de la ventosa oral
<b>Testículos</b>				
<b>Anterior</b>				
Largo	107-391 (233)	110-150 (123)	117	184-371 (271)
Ancho	66-214 (133)	70-103 (85)	86	157-227 (191)
<b>Posterior</b>				
Largo	86-399 (232)	95-154 (126)	154	248-343 (296)
Ancho	66-216 (141)	75-85 (80)	78	207-270 (244)

	<b><i>Phyllodistomum inecoli</i> (Razo-Mendivil et al., 2013)</b>	<b>Morfo 1 Fig. 6 (n=4)</b>	<b>Morfo 2 Fig. 6 (n=1)</b>	<b>Morfo 3 Fig. 6 (n=3)</b>
<b>Ovario</b>				
Largo	59-201 (132)	73-190 (103)	190	156-220 (189)
Ancho	64-174 (112)	56-167 (91)	167	127-151 (139)
<b>Útero</b>				
	Ampliamente plegado. Se distribuye desde la zona acetabular hasta el extremo posterior	Ampliamente plegado. Se distribuye desde la zona acetabular hasta el extremo posterior	Ampliamente plegado. Se distribuye lateral y ventralmente en todo el cuerpo posterior	Ampliamente plegado. Se distribuye a nivel de las glándulas vitelógenas hasta el extremo posterior
<b>Huevos</b>				
Largo	23-28 (26)	23-29 (26)	26-29 (28)	28-33 (31)
Ancho	14-18 (16)	15-20 (18)	17-19 (18)	18-24 (21)
<b>Glándulas vitelógenas</b>				
	Ovoides, raramente bilobadas, por debajo del acetábulo	Ovoides, simétricas. Por debajo del acetábulo, anteriores al ovario	Lobuladas, simétricas. Justo debajo del acetábulo, a la altura del ovario	Ovoides y arriñonadas, a la altura del ovario
<b>Vesícula excretora</b>				
	"I"	No visible	No visible	No visible

### ***Phyllodistomum spinopapillatum***

*Phyllodistomum spinopapillatum* Pérez-Ponce de León, Pinacho-Pinacho, Mendoza-Garfias & García Varela, 2015.

Caracteres diagnósticos: Se encuentra parasitando la vejiga urinaria de un pez del género *Profundulus* (*P. balsanus*) de San Gabriel Mixtepec, Oaxaca. En este trabajo de tesis, se colectaron 5 ejemplares adultos, los cuales se utilizaron para realizar el análisis filogenético, por lo que el ejemplar que se presenta a continuación es parte de la Colección Nacional de Helminthos (CNHE) (Fig. 7). De acuerdo con la descripción de *P. spinopapillatum*, se caracteriza por presentar cuerpo espatulado, tegumento cubierto con numerosas papilas. Sin pliegues marginales. Cuerpo anterior corto, ocupando cerca de 1/3 del total del cuerpo. Cuerpo anterior con 10 papilas distribuidas en cuatro pares longitudinales en la superficie ventral y algunas dispersas. Papilas tipo “domo” espinuladas. Ventosa oral subterminal ligeramente ovalada, porta 4 pares de papilas tipo “domo” simétricas en la superficie interior, 2 pares en la parte superior de la ventosa oral, 1 en el medio y 1 en la parte inferior. Ventosa ventral redondeada, ligeramente más larga y ancha que la ventosa oral; porta 18 pares de papilas tipo “domo”, 6 en la superficie exterior, 2 pares de papilas grandes y 4 pares de papilas pequeñas en la superficie interior. Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho. Bifurcación cecal desde el extremo anterior. Los ciegos corren lateralmente en el cuerpo posterior y terminan en el espacio post-testicular. Dos testículos, lobulados simétricos a ligeramente oblicuos en algunos especímenes, ecuatoriales, se superponen a los ciegos

ligeramente. Poro genital medial, a nivel de la bifurcación cecal, desde el margen anterior de la ventosa ventral. Ovario irregular, moderadamente lobulado (2-3 lóbulos), ecuatorial, lateral o posterior a las glándulas vitelógenas. Dos glándulas vitelógenas compactas, ovoides, lobuladas, entre el ovario y la ventosa ventral. Útero extensamente plegado, ocupando todo el cuerpo posterior. Huevos ovalados a ligeramente redondeados. Vesícula excretora en forma de "I". Poro excretor subterminal.





**Figura 7.** *Phyllodistomum spinopapillatum*. Paratipo 9667 (CNHE). Endoparásito de la vejiga urinaria de *P. balsanus* de San Gabriel, Mixtepec, Oaxaca. Vista ventral. 10x.

### ***Phyllodistomum centropomi***

*Phyllodistomum centropomi* Mendoza-Garfias & Pérez-Ponce de León, 2005.

Caracteres diagnósticos: Se encuentra parasitando al pez *Centropomus parallelus* de Papaloapan, Veracruz. En este trabajo de tesis se colectó un ejemplar adulto, el cual fue utilizado para realizar el análisis filogenético, por lo que se ejemplifica con un individuo adulto de la Colección Nacional de Helminths (CNHE) (Paratipo 4505) (Fig. 8). De acuerdo con la descripción de *P. centropomi*, esta especie se caracteriza por presentar un cuerpo elongado, con ondulaciones en los márgenes laterales. Parte anterior del cuerpo subcilíndrica, representa 1/3 de la longitud total del cuerpo. Parte posterior del cuerpo discoide, con 3 o 4 ondulaciones, con pliegues musculares en los bordes a nivel de los testículos hasta el extremo posterior. Tegumento con numerosas papilas. Ventosa oral subterminal. Ventosa ventral en el segundo cuarto del cuerpo. Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho. Ciegos largos y estrechos, corren desde el cuerpo anterior y terminan en el extremo posterior. Dos testículos ligeramente lobulados, simétricos, en la región media del cuerpo. Poro genital medio-ventral, entre la ventosa ventral y la bifurcación intestinal. Ovario completo, ovoide. El útero se extiende y llena el espacio extra e intercecal.



**Figura 8.** *Phyllodistomum centropomi* (A). Paratipo 4505 (CNHE). Endoparásito de la vejiga urinaria de *C. parallelus* de Tlacotalpan, Veracruz. Vista ventral. 10x.

### ***Phyllodistomum* sp. 1**

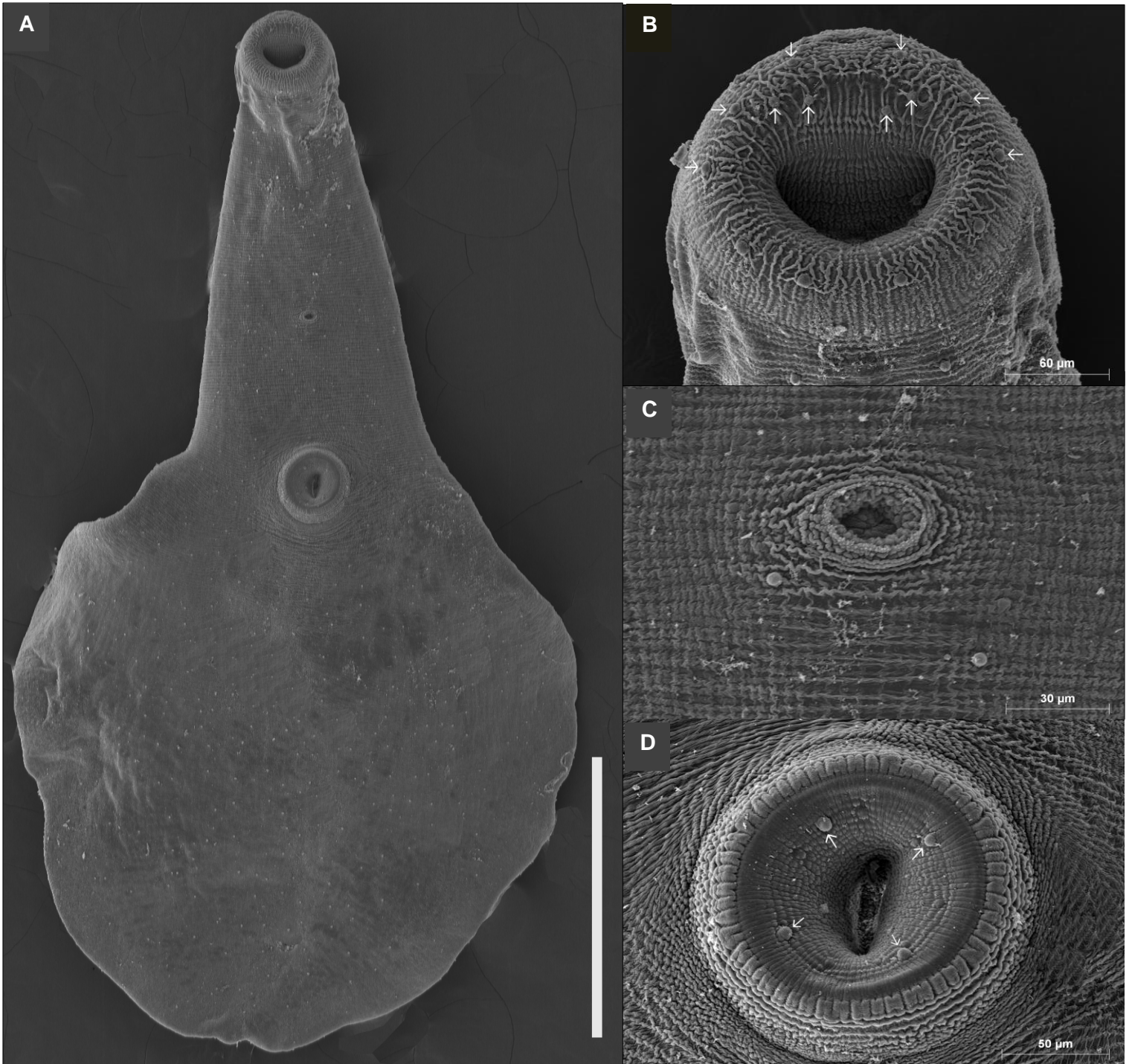
Descripción: Basada en 5 individuos adultos, esta especie se encuentra parasitando la vejiga urinaria de unos cíclidos (*Astatheros alfarí*) de Río Las Animas, Costa Rica y se caracteriza por presentar un cuerpo espatulado, 3371-4001 (3758)  $\mu\text{m}$  largo por 1640-2274 (2047)  $\mu\text{m}$  ancho, papilado, con 2 márgenes laterales poco crenulados. Parte anterior del cuerpo subcilíndrica con numerosas papilas (Fig. 9), 1415-1756 (1634)  $\mu\text{m}$  largo por 624-1133 (916)  $\mu\text{m}$  ancho, ocupando casi  $\frac{1}{2}$  de la parte posterior del cuerpo. Parte posterior del cuerpo discoidal con 2 o 3 ligeras ondulaciones, 1966-2437 (2147)  $\mu\text{m}$  largo por 1546-2128 (1892)  $\mu\text{m}$  ancho. Tegumento con numerosas papilas distribuidas aleatoriamente en todo el cuerpo (Figs. 9 y 9.1 A). Ventosa oral terminal, ligeramente ovalada, 396-516 (454)  $\mu\text{m}$  largo por 288-429 (350)  $\mu\text{m}$  ancho; con 4 papilas internas y 10 externas tipo “domo” (Fig. 9.1 B); ventosa ventral 287-374 (329)  $\mu\text{m}$  largo por 270-369 (323)  $\mu\text{m}$  ancho; con 4 papilas internas simétricas tipo “domo” sobresaliendo (Fig. 9.1 D). Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho, 150-290 (217)  $\mu\text{m}$  largo. Ciegos largos, ligeramente ensanchados en la parte anterior, después de la bifurcación cecal, estrechos en la parte media y ensanchados en al terminar, casi hasta el extremo posterior del cuerpo. El poro genital se encuentra por debajo de la bifurcación cecal, entre la ventosa oral y la ventosa ventral (Figura 9.1 C). Glándulas vitelógenas lobuladas, simétricas generalmente por debajo del ovario, glándula vitelógena derecha 113-204 (164)  $\mu\text{m}$  largo por 80-122 (100)  $\mu\text{m}$  ancho, glándula vitelógena izquierda 159-233 (180)  $\mu\text{m}$  largo por 70-101 (92)  $\mu\text{m}$  ancho. Ovario circular, anfitípico (2

dextrales, 2 sinistrales y 1 indefinido), anterior a los testículos, 205-279 (236)  $\mu\text{m}$  largo por 179-217 (197)  $\mu\text{m}$  ancho. Dos testículos ligeramente ovalados, de menor tamaño con respecto al ovario, simétricos, en la región media del cuerpo, testículo anterior 130-304 (182)  $\mu\text{m}$  largo por 99-226 (131)  $\mu\text{m}$  ancho, testículo posterior 131-303 (176)  $\mu\text{m}$  largo por 121-187 (144)  $\mu\text{m}$  ancho. El útero ampliamente plegado en la parte posterior del cuerpo y asciende ventralmente hasta alcanzar el poro genital, por encima de la bifurcación cecal. Huevos circulares, no operculados, 20-28 (24)  $\mu\text{m}$  largo por 17-25 (21)  $\mu\text{m}$  ancho. Vesícula excretora en forma de "I".



**Figura 9.** *Phyllodistomum* sp. 1. Endoparásito de la vejiga urinaria de *A. alfari* de Río Las Animas, Costa Rica. Vista ventral. 10x.





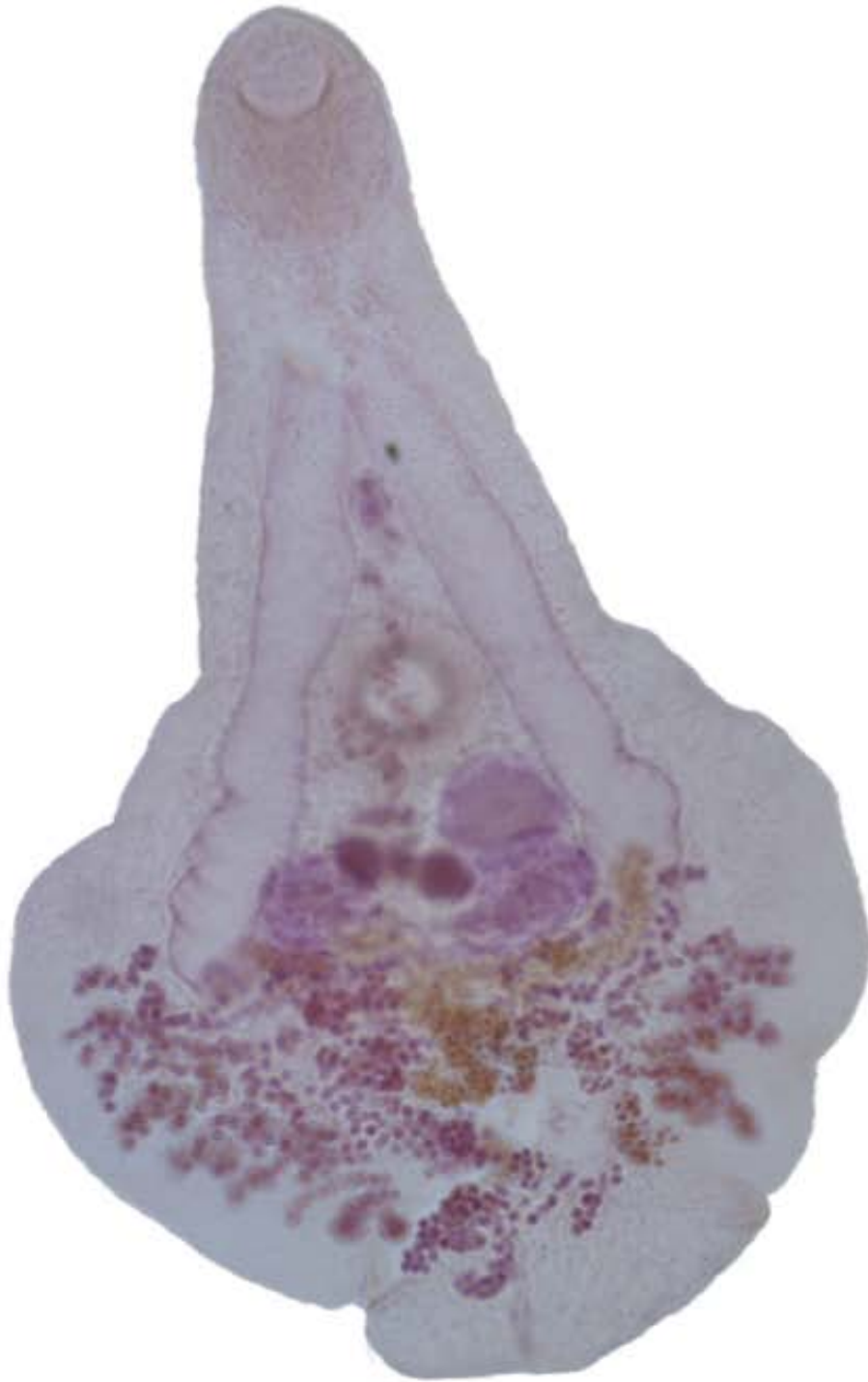
**Figura 9.1.** *Phyllodistomum* sp. 1 (A). Endoparásito de la vejiga urinaria de *A. alfari* de Río Las Animas, Costa Rica. Vista ventral. MEB. La barra representa 600 µm. Ventosa oral mostrando 4 papilas tipo “domo” internas y 10 externas (B). Poro genital con 2 papilas tipo “domo” distribuidas aleatoriamente (C). Ventosa ventral con 4 papilas sobresalientes tipo “domo” internas, simétricas (D).

### ***Phyllodistomum* sp. 3**

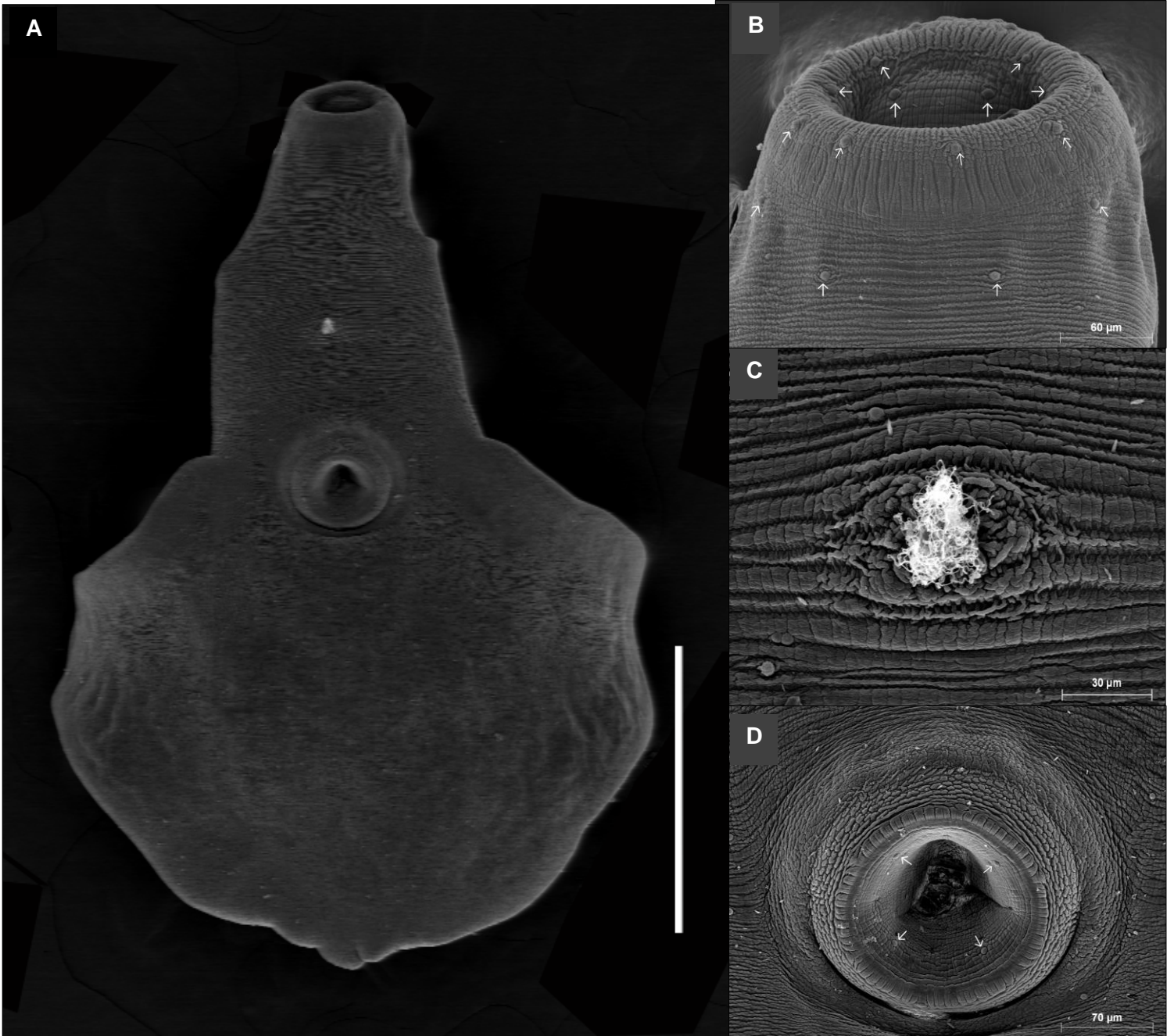
Descripción: Basada en 10 individuos adultos, esta especie se encuentra parasitando a eleotridos (*Gobiomorus dormitor* y *Eleotris* sp.) de Río La Palma, Veracruz. Presenta un cuerpo espatulado 1887-3482 (2434)  $\mu\text{m}$  largo por 1097-2182 (1519)  $\mu\text{m}$  ancho, papilado, con 2 a 3 márgenes laterales ligeramente crenulados (Figs. 10 y 10.1 A). Parte anterior del cuerpo subcilíndrica con algunas papilas distribuidas aleatoriamente, 725-1367 (1011)  $\mu\text{m}$  largo por 436-836 (603)  $\mu\text{m}$  ancho, ocupando 1/3 del total del cuerpo. Parte posterior del cuerpo discoidal con 1 o 2 ligeras ondulaciones, 911-2133 (1419)  $\mu\text{m}$  largo por 1086-2087 (1470)  $\mu\text{m}$  ancho. Tegumento presenta algunas papilas distribuidas aleatoriamente en todo el cuerpo (Fig. 10.1 A). Ventosa oral terminal, ligeramente ovalada, 332-512 (411)  $\mu\text{m}$  largo por 220-415 (318)  $\mu\text{m}$  ancho con 6 papilas tipo “domo” internas, simétricas, 10 externas, simétricas y 4 simétricas por debajo de éstas (Figura 10.1 B); ventosa ventral, 215-382 (276)  $\mu\text{m}$  largo por 180-334 (269)  $\mu\text{m}$  ancho con 4 papilas tipo “domo” internas, simétricas (Figura 10.1 D). Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho, 60-160 (105)  $\mu\text{m}$  largo. Ciegos largos mucho más anchos que en las otras especies de *Phyllodistomum* colectadas en este estudio, siendo una de las características más sobresalientes, comienzan casi inmediatamente al terminar la ventosa oral y culminando casi al término de la parte posterior del cuerpo. El poro genital se encuentra a la mitad del cuerpo anterior, entre la ventosa oral y ventral (Fig. 10.1 C). Glándulas vitelógenas ovaladas a ligeramente lobuladas, simétricas, entre el ovario y los testículos, en la parte media del cuerpo, glándula vitelógena derecha 67-



185 (123)  $\mu\text{m}$  largo por 88-114 (101)  $\mu\text{m}$  ancho, glándula vitelógena izquierda 72-187 (128)  $\mu\text{m}$  largo por 59-127 (100)  $\mu\text{m}$  ancho. Ovario circular, ligeramente lobulado, por debajo de la ventosa ventral, anterior a los testículos, anfitípico (generalmente dextral), 160-286 (214)  $\mu\text{m}$  largo por 170-281 (234)  $\mu\text{m}$  ancho. Dos testículos, ovalados ligeramente lobulados, simétricos, que se sobreponen al útero, en la parte media del cuerpo, testículo anterior 127-262 (193)  $\mu\text{m}$  largo por 137-301 (208)  $\mu\text{m}$  ancho, testículo posterior 114-285 (202)  $\mu\text{m}$  largo por 163-288 (211)  $\mu\text{m}$  ancho. El útero ampliamente plegado en la parte posterior del cuerpo y asciende ventralmente hasta alcanzar el poro genital. Huevos ligeramente ovalados, no operculados, 20-29 (25)  $\mu\text{m}$  largo por 15-20 (18)  $\mu\text{m}$  ancho. Vesícula excretora en forma de "1".



**Figura 10.** *Phyllodistomum* sp. 3. Endoparásito de la vejiga urinaria de *G. dormitor* de Río La Palma, Veracruz. Vista ventral. 10x.



**Figura 10.1.** *Phyllodistomum* sp. 3 (A). Endoparásito de la vejiga urinaria de *G. dormitor* de Río La Palma, Veracruz. Vista ventral. MEB. La barra representa 600 µm. Ventosa oral mostrando 6 papilas tipo “domo” internas, simétricas, 10 externas, simétricas y 4 simétricas debajo (B). Poro genital (C). Ventosa ventral mostrando 4 papilas internas, simétricas tipo “domo” (D).

#### ***Phyllodistomum* sp. 4**

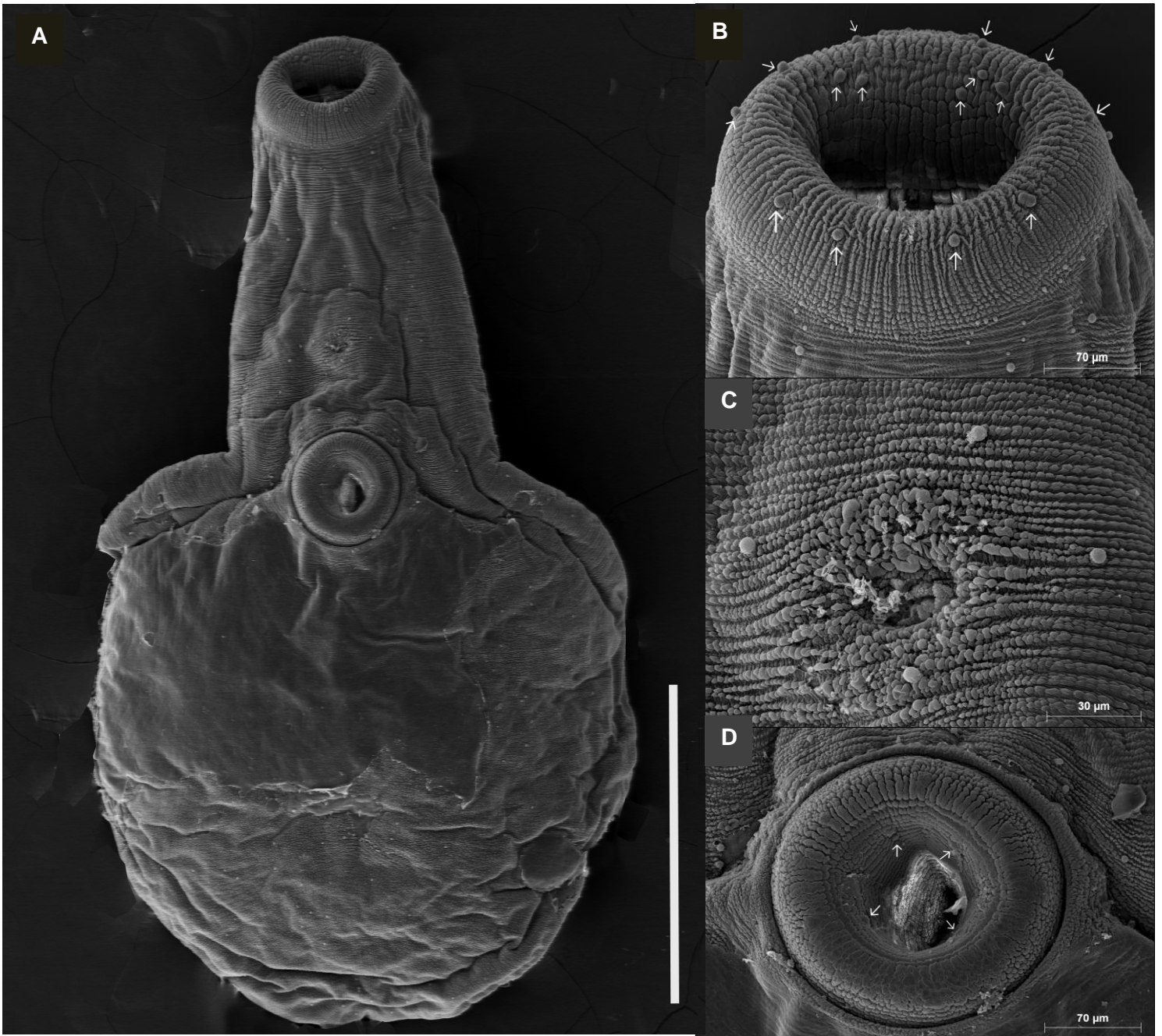
Descripción: Basada en 8 individuos adultos, esta especie parasita la vejiga urinaria de cíclidos (*Vieja* sp., *Vieja regani* y *Thorichthys ellioti*) de Matías Romero, Oaxaca y se caracteriza por presentar un cuerpo espatulado, 2011-2449 (2245)  $\mu\text{m}$  largo por 1169-1526 (1306)  $\mu\text{m}$  ancho, con papilas, con 3-4 márgenes laterales ligeramente crenulados. Parte anterior del cuerpo subcilíndrica con algunas papilas distribuidas aleatoriamente, 929-1088 (991)  $\mu\text{m}$  largo por 441-872 (641)  $\mu\text{m}$  ancho, ocupando 1/3 del total del cuerpo. Parte posterior del cuerpo discoidal con 2 ligeras ondulaciones (Figs. 11 y 11.1 A), 1063-1529 (1255)  $\mu\text{m}$  largo por 1054-1537 (1264)  $\mu\text{m}$  ancho. Tegumento presenta varias papilas distribuidas aleatoriamente en todo el cuerpo (Fig. 11.1 A). Ventosa oral terminal, ligeramente ovalada, 147-545 (421)  $\mu\text{m}$  largo por 279-404 (330)  $\mu\text{m}$  ancho con 5 papilas tipo “domo” internas y 10 externas (Fig. 11.1 B); la ventosa oral es mayor que la ventosa ventral, 275-365 (305)  $\mu\text{m}$  largo por 242-357 (284)  $\mu\text{m}$  ancho con 4 papilas tipo “domo” internas, simétricas (Fig. 11.1 D). Prefaringe y faringe ausente. Esófago estrecho, derecho, 92-123 (108)  $\mu\text{m}$  largo. Ciegos largos y ensanchados, comienzan por debajo de la ventosa oral y culminan en el extremo posterior. El poro genital se ubica a la mitad del cuerpo anterior, entre la ventosa oral y la ventosa ventral (Fig. 11.1 C). Glándulas vitelógenas circulares, simétricas, por debajo del ovario, a la altura de los testículos, en el cuerpo medio, glándula vitelógena derecha 94-160 (128)  $\mu\text{m}$  largo por 71-125 (99)  $\mu\text{m}$  ancho, glándula vitelógena izquierda 116-181 (132)  $\mu\text{m}$  largo por 81-111 (93)  $\mu\text{m}$  ancho. Ovario circular, anfitípico (4 dextrales y 4 sinistral)

156-223 (183)  $\mu\text{m}$  largo por 151-217 (189)  $\mu\text{m}$  ancho. Dos testículos simétricos, ligeramente ovalados, en la parte media del cuerpo, testículo anterior 136-293 (228)  $\mu\text{m}$  largo por 179-260 (216)  $\mu\text{m}$  ancho, testículo posterior 178-303 (232)  $\mu\text{m}$  largo por 100-234 (192)  $\mu\text{m}$  ancho. El útero es plegado en la parte posterior del cuerpo y asciende ventralmente hasta alcanzar el poro genital, por encima de la la ventosa ventral. Huevos ligeramente ovalados, no operculados, 13-26 (20)  $\mu\text{m}$  largo por  $\mu\text{m}$  ancho. Vesícula excretora en forma de "1".



**Figura 11.** *Phyllodistomum* sp. 4. Endoparásito de la vejiga urinaria de *Vieja* sp. de Matías Romero, Oaxaca. Vista ventral. 40x.





**Figura 11.1.** *Phyllodistomum* sp. 4 (A). Endoparásito de la vejiga urinaria de *Vieja* sp. de Matías Romero, Oaxaca. Vista ventral. MEB. La barra representa 600 µm. Ventosa oral mostrando 5 papilas tipo “domo” internas y 10 externas (B). Poro genital mostrando 4 papilas tipo “domo” alrededor (C). Ventosa ventral con 4 papilas tipo “domo” internas, simétricas (D).

**Tabla 3.** Medidas comparativas de *Phyllodistomum* sp. 1, 3 y 4 (Las medidas están dadas en  $\mu\text{m}$ ). Las medidas entre paréntesis representan la media.

	<i>Phyllodistomum</i> sp. 1 Fig. 9, 9.1 (n=5)	<i>Phyllodistomum</i> sp. 3 Fig. 10, 10.1 (n=10)	<i>Phyllodistomum</i> sp. 4 Fig. 11, 11.1 (n=8)
<b>Huésped (es)</b>	<i>Asthatheros alfari</i>	<i>Gobiomorus dormitor</i> <i>Eleotris</i> sp.	<i>Vieja</i> sp. <i>Vieja regani</i> <i>Thorichthys ellioti</i>
<b>Localidad</b>	Río Las Animas, Costa Rica	Río La Palma, Veracruz	Matías Romero, Oaxaca
<b>Total del cuerpo</b>			
Longitud	3371-4001 (3758)	1887-3482 (2434)	2011-2449 (2245)
Ancho	1640-2274 (2047)	1097-2182 (1519)	1169-1526 (1306)
<b>Pliegues marginales</b>	2, poco crenulados	2-3, ligeramente crenulados	3-4, ligeramente crenulados
<b>Ventosa oral</b>			
Largo	396-516 (454)	332-512 (411)	147-545 (421)
Ancho	288-429 (350)	220-415 (318)	279-404 (330)
<b>Ventosa ventral</b>			
Largo	287-374 (329)	215-382 (276)	275-365 (305)
Ancho	270-369 (323)	180-334 (269)	242-357 (284)
<b>Prefaringe</b>	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Faringe</b>	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Esófago</b>	150-290 (217)	60-160 (105)	92-123 (108)
<b>Bifurcación de los ciegos</b>	Anterior al poro genital	Posterior al poro genital	Posterior al poro genital
<b>Extensión de los ciegos</b>	Post-testicular, cercano al extremo posterior	Post-testicular, cercano al extremo posterior	Post-testicular, cercano al extremo posterior
<b>Posición del poro genital</b>	A mitad del cuerpo anterior, entre la bifurcación cecal y la ventosa ventral	Debajo de la ventosa oral y anterior a la bifurcación cecal	Debajo de la ventosa oral y anterior a la bifurcación cecal



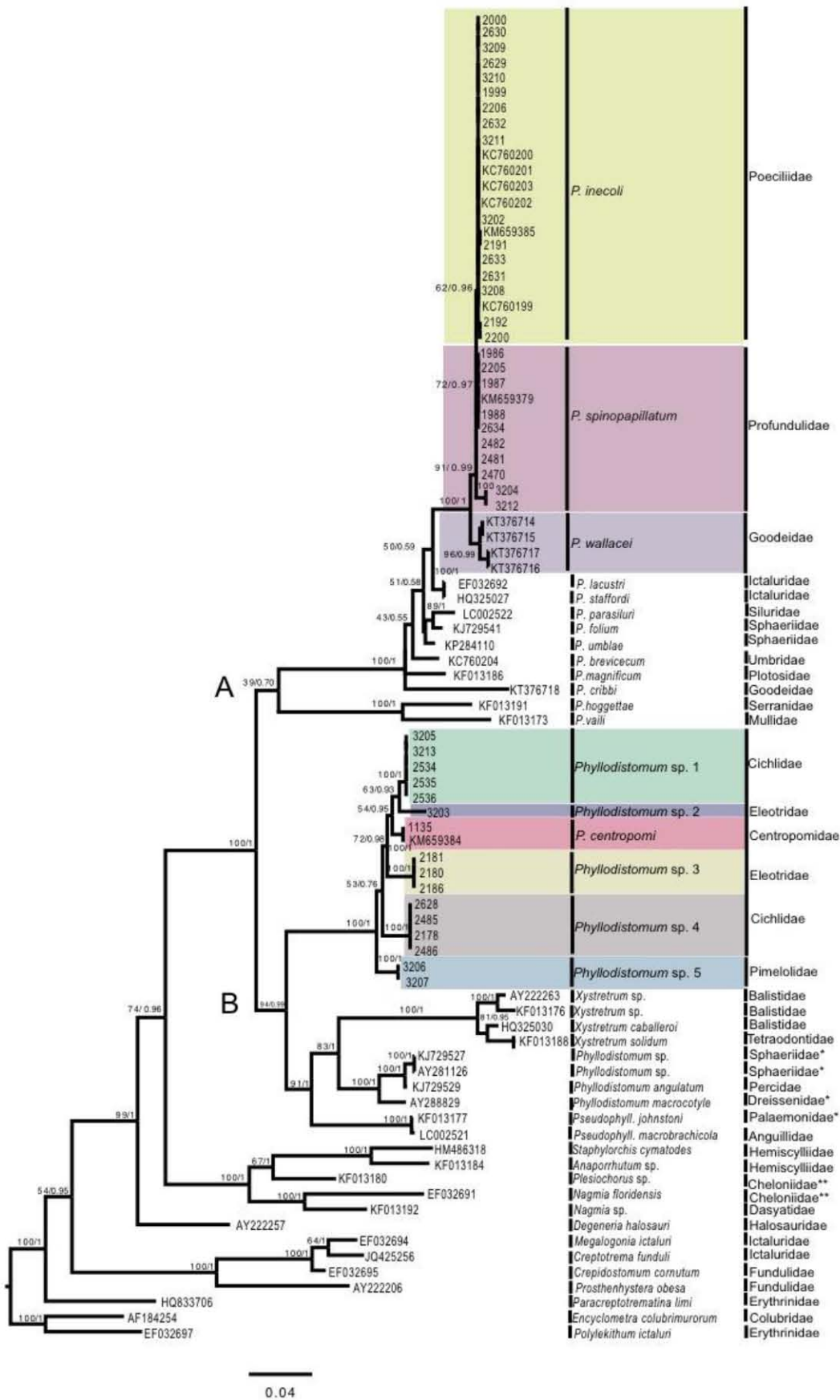
	<i>Phyllodistomum</i> sp. 1 Fig. 9, 9.1 (n=5)	<i>Phyllodistomum</i> sp. 3 Fig. 10, 10.1 (n=10)	<i>Phyllodistomum</i> sp. 4 Fig. 11, 11.1 (n=8)
<b>Testículos</b>			
<b>Anterior</b>			
Largo	130-304 (182)	127-262 (193)	136-293 (228)
Ancho	99-226 (131)	137-301 (208)	179-260 (216)
<b>Posterior</b>			
Largo	131-303 (176)	114-285 (202)	178-303 (232)
Ancho	121-187 (144)	163-288 (211)	100-234 (192)
<b>Ovario</b>			
Largo	205-279 (236)	160-286 (214)	156-223 (183)
Ancho	179-217 (197)	170-281 (234)	151-217 (189)
<b>Útero</b>	Ampliamente plegado, prácticamente restringido al cuerpo posterior, excepto en la parte ventral, al ascender al poro genital	Ampliamente plegado, prácticamente restringido al cuerpo posterior, excepto en la parte ventral, al ascender al poro genital	Ampliamente plegado, prácticamente restringido al cuerpo posterior, excepto en la parte ventral, al ascender al poro genital
<b>Huevos</b>			
Largo	20-28 (24)	20-29 (25)	13-26 (20)
Ancho	17-25 (21)	15-20 (18)	11-21 (16)
<b>Glándulas vitelógenas</b>	Lobuladas, simétricas, usualmente por debajo del ovario	Ovaladas-ligeramente lobuladas, simétricas, entre el ovario y los testículos	Circulares- ligeramente ovaladas, simétricas, por debajo del ovario, a la altura de los testículos
<b>Vesícula excretora</b>	En forma de "I"	En forma de "I"	En forma de "I"

## V.I. Análisis filogenético del gen ribosomal 28S.

En el presente estudio se obtuvieron 42 nuevas secuencias de la subunidad mayor del gen ribosomal 28S que incluye a los dominios D2-D3. La matriz del 28S consistió de 87 terminales y tuvo una longitud de 845 pares de bases. El modelo de evolución que se ajustó a la base de datos fue: TVM+I+G. El análisis filogenético con ML generó un solo árbol con un valor de  $-\ln = 8292.74$ . El árbol filogenético obtenido del análisis de IB presentó la misma topología que el obtenido del análisis de ML (Fig. 12). Los análisis filogenéticos soportan que el género *Phyllodistomum* es parafilético con respecto a los géneros *Xystretrum* y *Pseudophyllodistomum*. Los árboles filogenéticos claramente muestran dos clados marcados como A y B en este estudio (Fig. 12). El clado denominado A, contiene 16 muestras identificadas como *P. inecoli* colectadas en peces poecilidos en los estados de Veracruz, Oaxaca y Chiapas en México. Además se incluyeron otras 10 muestras colectadas de peces de la familias Poeciliidae y Profundulidae distribuidos en San Luis Potosí, Oaxaca y Chiapas en México y en Honduras, los cuales fueron identificados como *P. spinopapillatum* (Fig. 12). Finalmente en este clado se anidaron otras 11 especies del género *Phyllodistomum* obtenidas del GenBank.

Por otro lado, dentro del clado denominado B, se encuentran anidadas 5 especies aún no descritas del género *Phyllodistomum*, sin embargo este clado también incluyó especies del género *Xystretrum* y *Pseudophyllodistomum* obtenidas del GenBank. Las muestras colectadas en este trabajo conformaron 5 clados independientes y se reconocen como

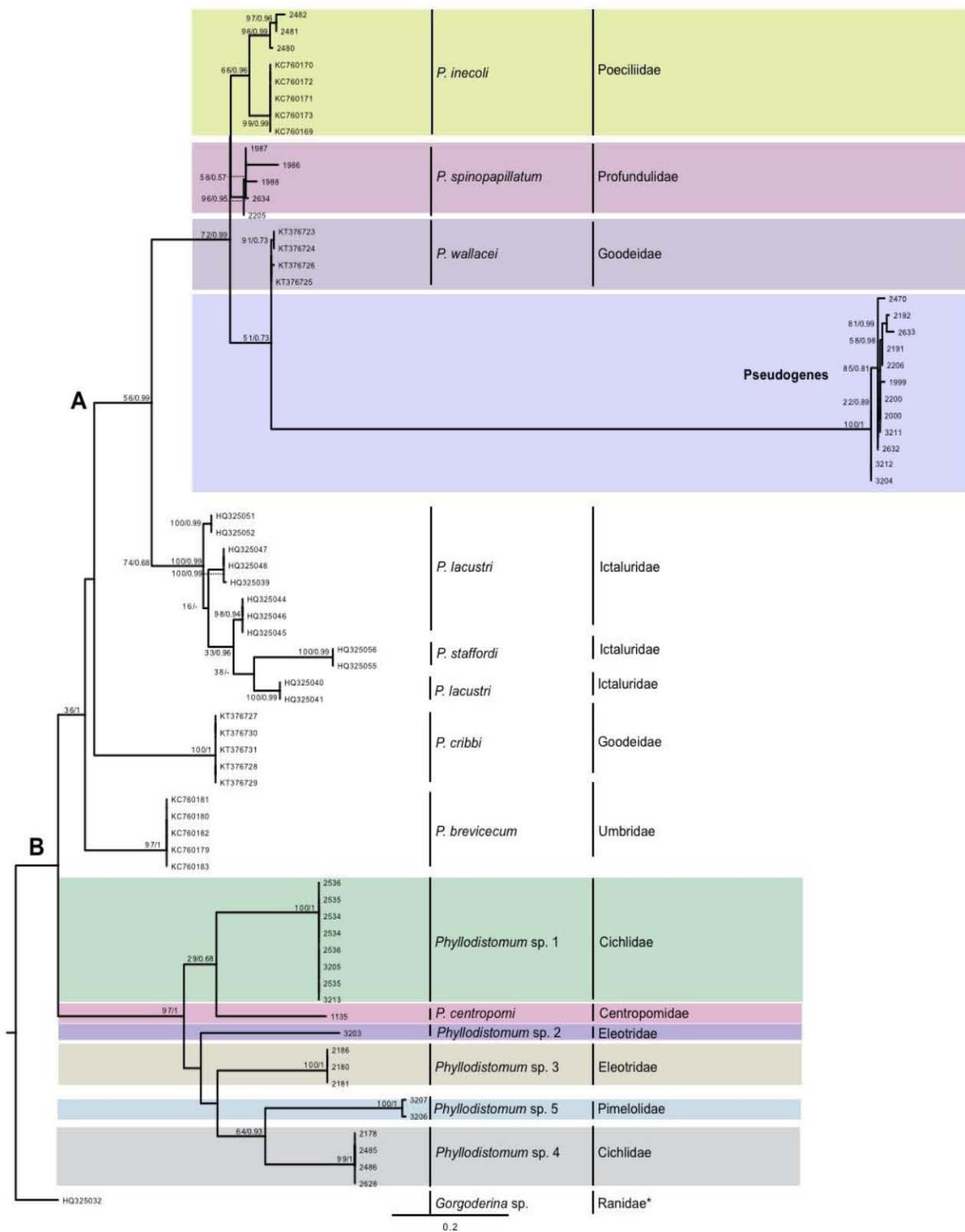
especies sin describir que muestran un patrón ecológico con sus huéspedes definitivos. Las especies fueron denominadas como *Phyllodistomum* sp. 1- 5, de las cuales se contó con ejemplares adultos.



**Figura 12.** Análisis filogenético obtenido del gen 28S con el método de ML. Los números cercanos a los nodos muestran los valores de ML (Maximum Likelihood) bootstrap y probabilidades posteriores (PP). Los asteriscos (\*) denotan familias de huéspedes intermediarios (bivalvos y crustáceos) y (\*\*) otros huéspedes definitivos (tortugas).

## V.I. Análisis filogenético del gen mitocondrial *cox 1*.

Por otra parte, se obtuvieron 40 nuevas secuencias del gen mitocondrial *cox 1* pertenecientes a distintas especies del género *Phyllodistomum*. La matriz del *cox 1* consistió de 72 terminales y tuvo una longitud de 337 pares de bases. El modelo de evolución que se ajustó a la base de datos es: TPM+G. El análisis filogenético con ML generó un solo árbol de  $-\ln = -2884.58$ . El árbol filogenético obtenido del análisis de IB presentó la misma topología que el obtenido del análisis de ML (Fig. 13). Los árboles filogenéticos mostraron también dos clados marcados como A y B. El clado denominado A, incluyó tres especies: las muestras identificadas como *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*, quienes se relacionaron con las secuencias obtenidas del GenBank de la especie *P. wallacei* una especie asociada a peces goodeidos del centro de México. Además, otras muestras se separaron de los clados A y B, las cuales fueron identificadas como pseudogenes por la presencia de inserciones, deleciones y prematuros codones de término (Fig. 13). En el clado denominado B, como en el árbol inferido con el gen 28S, se recuperaron los 5 linajes que representan especies independientes (Fig. 14).



**Figura 13.** Análisis filogenético obtenido del gen *cox 1* con el método de MV. Los números cercanos a los nodos muestran los valores de ML (Maximum Likelihood) bootstrap y probabilidades posteriores (PP). El asterisco (\*) denota la familia de huésped definitivo del grupo externo.

## VI. DISCUSIÓN.

Los árboles filogenéticos derivados de los análisis de IB y MV con los genes del 28S y *cox 1* (Figs. 12 y 13), reconocieron dos subclados denominados A y B. El clado A, incluyó a las especies *P. inecoli*, *P. spinopapillatum*, *P. wallacei*, *P. lacustri*, *P. staffordi*, *P. parasiluri*, *P. folium*, *P. umblae*, *P. brevicecum*, *P. magnificum*, *P. cribbi*, *P. hoggettae* y *P. vaili*. Algunas especies del clado A analizadas en el presente trabajo como *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*, representan dos especies cercanamente relacionadas asociadas a peces poecilidos y profundulidos (ambos pertenecientes al orden Cyprinodontiformes) que se distribuyen simpátricamente en los estados de Oaxaca y Chiapas. Aunque *P. spinopapillatum* se distribuye en países de Centroamérica como Guatemala y Honduras (ver Pinacho-Pinacho *et al.*, 2015). Adicionalmente, *P. wallacei*, quien también se anidó dentro del clado A (secuencias obtenidas de GenBank) es un parásito asociado a goodeidos del estado de Jalisco (ver Pérez-Ponce de León, *et al.*, 2015a).

En el análisis filogenético inferido con el gen nuclear 28S (Fig. 12), mostró que las secuencias numeradas como 2481\*-2482\*, de La Gloria, Chiapas (Tabla 1, Fig. 12), identificadas morfológicamente como *P. spinopapillatum* y corroboradas con datos moleculares con un marcador nuclear, se mezclaron dentro del clado de *P. inecoli*, cuando se analizaron con el gen mitocondrial *cox 1* (Fig. 13). Esto sugiere que en zonas simpátricas en donde se distribuyen (estado de Chiapas) *P. inecoli* y *P. spinopapillatum* podrían existir híbridos entre ambas especies. El fenómeno de hibridación entre dos especies cercanamente

relacionadas ha sido también descrito en otras especies de digeneos del género *Clinostomum* (Caffara *et al.*, 2011).

En el árbol filogenético inferido con el gen mitocondrial *cox 1* (Fig. 13) detectó la presencia de secuencias con anomalías como inserciones, deleciones y prematuros codones de término, que consecuentemente se reconocieron como pseudogenes, los cuales están presentes en individuos de las especies *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*. Los pseudogenes encontrados fueron co-amplificados con los primers universales, empleados en este estudio. Los pseudogenes han sido detectados en varios metazoarios incluyendo helmintos (Obwaller *et al.* 2004; Derycke *et al.*, 2010; López *et al.*, 1994; Song, *et al.*, 2008). La presencia de pseudogenes denominados *numts* (copias de genes mitocondriales que se encuentran en el núcleo), podría deberse a una continua transferencia horizontal de la mitocondria al núcleo o a la duplicación del genoma mitocondrial después del evento de transferencia (Hazkani-Covo, *et al.*, 2002; Bensasson, *et al.*, 2003).

Con los dos marcadores moleculares analizados en este estudio, se reconocieron dos clados A y B. En el clado B (Fig. 12 y 13), se reconocieron cinco linajes independientes de los ejemplares colectados en el presente trabajo denominados *Phyllodistomum* sp. 1-5, los cuales están asociados a peces de las familias Cichlidae, Eleotridae y Pimelolidae distribuidos en tres países (México, Nicaragua y Costa Rica) de la región neotropical. Además, un ejemplar colectado en Tlacotalpan, Veracruz, del huésped tipo (*Centropomus parallelus*) fue reconocido como *P. centropomi* (Figs. 8, 12, 13). Por otro lado, Cutmore, *et a.*,



(2013), utilizando el gen nuclear 28S y el ITS2, mencionaron que el género *Phyllodistomum* es parafilético ya que incluye a los géneros *Pseudophyllodistomum* y *Xystretrum*, Sin embargo, en nuestro estudio, los análisis filogenéticos mostraron que el género *Xystretrum* (*Xystretrum* sp., *Xystretrum* sp., *Xystretrum caballeroi* y *Xystretrum solidum*) más dos especies del género *Pseudophyllodistomum* (*Pseudophyllodistomum johnstoni* y *Pseudophyllodistomum macrobachichola*) (ver Fig. 12) se anidaron en un clado (ver clado B) con otras tres especies del género *Phyllodistomum* (*Phyllodistomum* sp., *Phyllodistomum angulatum* y *Phyllodistomum macrocotyle*), por lo tanto nuestros análisis sugieren que dichas especies del género *Xystretrum* y *Pseudophyllodistomum* deben ser reevaluadas con ayuda de la taxonomía integrativa para definir sus relaciones filogenéticas con el género *Phyllodistomum*.

Finalmente los rangos de divergencia genética entre las especies del clado A que incluyen a las especies *P. inecoli*, *P. spinopapillatum* y *P. wallacei*, con el gen 28S, oscilan entre 0.12% a 2.16% y para el clado B que incluye a los linajes nuevos *Phyllodistomum* sp. 1, *Phyllodistomum* sp. 2, *Phyllodistomum centropomi*, *Phyllodistomum* sp. 3, *Phyllodistomum* sp. 4 y *Phyllodistomum* sp. 5, oscilan entre 1.4% a 3.69%. En el caso del gen *cox 1*, dentro del clado A, que incluye a las especies *P. inecoli*, *P. spinopapillatum* y *P. wallacei*, el rango oscila entre 5.8% a 10.7% y para el clado B que incluye a los linajes nuevos *Phyllodistomum* sp. 1, *Phyllodistomum centropomi*, *Phyllodistomum* sp. 2, *Phyllodistomum* sp. 3, *Phyllodistomum* sp. 5 y *Phyllodistomum* sp. 4 oscilan entre 13.75% a 19.35%. Estos rangos

de divergencia genética son similares a los encontrados con otras especies de digeneos como *Haematoloechus* spp. (León-Règagnon *et al.*, 1999) *Clinostomum* spp. (Caffara *et al.*, 2011), Fasciolidae (Adlard *et al.*, 1993).

## VII. CONCLUSIONES.

- 1) Los tremátodos colectados en la vejiga urinaria de peces de las familias Cichlidae, Poeciliidae, Profundilidae, Eleotridae, Centropomidae y Pimelolidae, distribuidos en México y en tres países de Centroamérica como Honduras, Nicaragua y Costa Rica, fueron identificados como miembros del género *Phyllodistomum*.
- 2) Con base en la taxonomía alfa se reconocieron tres especies de *Phyllodistomum*, previamente descritas como: *P. inecoli*, *P. spinopapillatum* y *P. centropomi*.
- 3) *Phyllodistomum inecoli*, muestra una amplia variación morfológica y se reconocieron tres morfotipos, genéticamente similares.
- 4) Los análisis filogenéticos inferidos con ambos marcadores moleculares (28S y *cox 1*) reconocieron cinco linajes independientes los cuales son considerados como especies nuevas para la ciencia del género *Phyllodistomum*, las cuales están distribuidas en tres países: México, Nicaragua y Costa Rica.
- 5) Los análisis filogenéticos derivados de este proyecto ratificaron la cercana relación entre *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*, las cuales se distribuyen simpátricamente en los estados de Oaxaca y Chiapas.

- 6) La posición sistemática de algunos ejemplares de las especies *P. inecoli* y *P. spinopapillatum* en los análisis filogenéticos difiere con los marcadores mitocondriales y nucleares, lo que sugiere un proceso de hibridación entre *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*.
- 7) Los análisis filogenéticos inferidos con el gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad 1, reveló la presencia de pseudogenes en las especies *P. inecoli* y *P. spinopapillatum*. Los pseudogenes formaron un clado independiente; se reconocieron por la presencia de inserciones, deleciones y prematuros codones de término.
- 8) Los miembros del género *Xystretrum* y *Pseudophyllodistomum* se anidaron dentro del género *Phyllodistomum*, en el análisis filogenético inferido con el gen 28S, lo que sugiere que las especies analizadas de estos dos géneros deben ser re evaluadas empleando fuentes de información morfológica y datos moleculares de genes mitocondriales.

## VIII. LITERATURA CITADA.

Adlard R.D., Barker S.C., Blair D. & Cribb T.H. 1993. Comparison of the second international transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*, 23, 423-425.

Awise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel E., Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 18, 489-522.

Bell A. & Sommerville, C. 2002. Molecular evidence for the synonymy of two species of *Apatemom* Szidat, 1928, *A. gracilis* (Rudolphi, 1819) and *A. annuligerium* (von Nordmann, 1932) (Digenea: Strigeidae) parasitic as metacercariae in British fishes. *Journal of Helminthology*, 76, 193-198.

Benesh P. D., Hasu T., Suomalainen L.R., Valtonen E.T. & Tirola, M. 2006. Reliability of mitochondrial DNA in an acantocephalan: The problem of pseudogenes. *International Journal for Parasitology*, 36, 247-254.

Bensasson D., Feldman M.W. & Petrov, D. A. 2003. Rates of DNA duplication and mitochondrial DNA insertion in the human genome. *Journal of Molecular Evolution*, 57, 343-354.

Bensch S., Perez-Tris J., Waldenstrom J. & O. Hellgreen. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution*, 58, 1617-1621.

Bowles J., Blair D. & McManus, D.P. 1992. Genetics variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54, 165-174.

Caffara M., Locke S.A., Gustinelli A., Marcogliese D.J. & Fioravanti M.L. 2011. Morphological and molecular differentiation of *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) metacercariae and adults. *Journal of Parasitology*, 97, 884-891.

Campbell R.A. 2008. Family Gorgoderidae Looss, 1899. En: Bray R.A. Gibson D.I. & Jones, A. (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol. 3. Centre for Agricultural Bioscience International & The Natural History Museum, Wallingford. pp. 191-213.

Carreno R.A. & Nadler, S.A. 2003. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 89, 965-973.

Cribb T.H. 1987 (a). Studies on gorgoderid digeneans from Australian and Assian Freshwater fishes. *Journal of Natural History*, 21, 1129-1153.

Cribb T.H. 1987 (b). A new species of *Phyllodistomum* (Digenea: Gorgoderidae) from Australian and New Zeland freshwater fishes with notes on the taxonomy of *Phyllodistomun* Braun, 1899. *Journal of Natural History*, 21, 1525-1538.

Cutmore S.C., Miller T.L., Curran S.S., Bennett M.B. & Cribb T.H. 2013. Phylogenetic relationships of the Gorgoderidae (Platyhelminthes: Trematoda), including the proposal of a new subfamily (Degeneriinae n. subfam.). *Parasitology Research*, 112, 3063–3074.

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

Deprés L., Kruger F.J., Imbert-Establet D. & Adamson M.L. 1995. ITS2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *International Journal for Parasitology*, 25, 1509-1514.

Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A., Backeljau T. & Moens, T. 2010. Exploring the use of Cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *Public Library of Science ONE*, 5, e13716.

García-Prieto L., Mendoza-Garfias B. & Pérez-Ponce de León G. Biodiversidad de Platyhelminthes parásitos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 164-170.

García-Varela M., Hernández-Orts J.S. & Pinacho-Pinacho C.D. 2016. A morphological and molecular study of *Pseudocorynosoma* Aznar, Pérez Ponce de León and Raga 2006 (Acantocephala: polymorphidae) from Mexico with the description of a new species and the presence of *cox 1* pseudogenes. *Parasitology International*, 66, 27-36.

Gibson D.I. 2002. Class Trematoda Rudolphi, 1808. Subclass Digenea Carus, 1863. En: Bray R.A. Gibson D.I. & Jones, A. (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol. 1. Centre for Agricultural Bioscience International & The Natural History Museum, Wallingford. pp. 1-18.

Grillo V., Jackson F., Cabaret J. & Gilleard J.S. 2007. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta* and evidence for a cryptic species. *International Journal for Parasitology*, 37, 435-447.

Hazkani-Covo E., Sorek R. & Graur D. 2002. Evolutionary dynamics of large *Numts* in the human genome: Rarity of independent insertions and abundance of post-insertion duplications. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 169-174.

Hillis D.M. & Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *Review of Biology, The University of Chicago Press*, 66, 411-453.

Ho W.H., Bray R.A., Cutmore S.C., Ward S., Cribb T.H. 2014. Two new species of *Phyllodistomum* Braun, 1899 (Trematoda: Gorgoderidae Loss, 1899) from Great Barrier Reef fishes. *Zootaxa*, 3779, 551-562.

Jousson O., Bartoli P., Zaninetti L. & Pawlowski J. 1998. Use of ITS rDNA for elucidation of some life-cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea). *International Journal for Parasitology*, 28, 1403-1411.

León-Règagnon V. & Brooks D.R. 2003. Molecular phylogeny of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiidae), with emphasis on North American species. *The Journal of Parasitology*, 89, 1206-1211.

León-Règagnon V., D.R. Brooks & Pérez-Ponce de León. 1999. Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiformes): Molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology*, 85, 935-946.

Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R., Modi W. & O' Brien S.J. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, 39, 174- 190.

Luton K., Walker D. & Blair D. 1992. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56, 323-328.

Macnish M.G., Morgan-Ryan U.M., Monis P.T., Behnke J.M. & Thompson R.C.A. 2002. A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences in *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species. *Parasitology*, 125, 567-575.



McManus D.P. & Bowles J. 1996. Molecular genetics approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal for Parasitology*, 26, 687-704.

Mendoza-Garfias B. & Pérez-Ponce de León G. 2005. *Phyllodistomum centropomi* sp. n. (Digenea: Gorgoderidae), a parasite of the fat snook, *Centropomus parallelus* (Ostheichthyes: Centropomidae), in the Papaloapan River at Tlacotalpan, Veracruz State, Mexico. *Zootaxa*, 1056, 43-51.

Miura O., Kuris A.M., Torchin M.E., Hechinger R.F., Dunham E.J. & Chiba S. 2005. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology*, 35,793-801.

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.

Obwaller A., Schneider R., Walochnik J., Gollackner B., Deutz A., Janitschke K., Aspöck H. & Auer H. 2004. *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology*, 128, 569-575.

Pinacho-Pinacho D., García-Varela M., Hernández-Orts J.S., Mendoza- Palmero C. A., Sereno-Uribe A. L., Martínez-Ramírez E., Andrade- Gómez L., López-Jiménez A., Hernández-

Cruz E. & Pérez-Ponce de León, G. 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.

Pérez-Ponce de León G., Martínez-Aquino A. & Mendoza-Garfias B. 2015 (a). Two new species of *Phyllodistomum* Braun, 1899 (Digenea: Gorgoderidae), from freshwater fishes (Cyprinodontiformes: Goodeidae: Goodeinae) in central Mexico: An integrative taxonomy approach using morphology, ultrastructure and molecular phylogenetics. *Zootaxa*, 4013 , 87-99.

Pérez-Ponce de León G., Pinacho-Pinacho C. D., Mendoza-Garfias B. & García-Varela, M. 2015 (b). *Phyllodistomum spinopapillatum* sp. nov. (Digenea: Gorgoderidae), from Oaxaca killifish *Profundulus balsanus* (Ostheichthyes: Profundulidae) in Mexico, with new host and locality records of *P. inecoli*: Morphology, ultrastructure and molecular evidence. *Acta Parasitológica*, 60, 298-307.

Petkevičiūtė R., Kudali O., Stunžėnas V. & Stanevičiūtė G. 2015. Molecular and karyological identification and morphological description of cystocercous cercariae of *Phyllodistomum umblae* and *Phyllodistomum folium* (Digenea, Gorgoderidae) developing in European sphaeriid bivalves. *Parasitology International* 64, 441-447.

Quiroz, H. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Cap. 12. Introducción y generalidades de cestodos, morfología, fisiología y clasificación. Editorial Limusa. pp. 286, 287.

Razo-Mendivil U.J., León-Regàgnon V. & Pérez-Ponce de León G. 2004. Description of two new species of *Glyphthalmis* Stafford, 1905 (Digenea: Macroderoididae) in *Rana* spp. from Mexico, based on morphology and mtDNA and rDNA sequences. *Systematic for Parasitology*, 59, 199-210.

Razo-Mendivil U., Mendoza-Garfias B., Pérez-Ponce de León G. & Rubio-Godoy, M. 2014. A new species of *Auriculostoma* (Digenea: Allocreadiidae) in the Mexican tetra *Astyanax mexicanus* (Actinopterygii, Characidae) from central Veracruz, Mexico, described using morphological and molecular data. *Journal of Parasitology*, 100, 331–337.

Roberts L. & Janovy J. 2005. Foundations of Parasitology (9th edition). McGraw-Hill, New York. pp. 702.

Rohde, K. 2002. Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. En: Bray R.A. Gibson D.I. & Jones, A. (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol. 1. Centre for Agricultural Bioscience International & The Natural History Museum, Wallingford. pp. 5-14.

Rohde, K. 2005. Marine parasitology. Aspidogastrea (aspidogastreaans). Editorial Csiro. pp. 72-76.

Ronquist F., Teslenko M., Van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. & Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Rosas-Valdez R., Choudhury A., Pérez-Ponce de León G. 2011. Molecular prospecting for cryptic species in *Phyllodistomum lacustri* (Platyhelminthes, Gorgoderidae). *Zoologica Scripta*, 40, 296–305.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5463-5467.

Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatic*, 22, 2688-2690.

Stunžėnas V., Petkevičiūtė R., Poddubnaya L.G., Stanevičiūtė G & Zhokhov A.E. 2017. Host specificity, molecular phylogeny and morphological differences of *Phyllodistomum pseudofolium* Nybelin, 1926 and *Phyllodistomum angulatum* Linstow, 1907 (Trematoda: Gorgoderidae) with notes on Eurasian ruffe as final host for *Phyllodistomum* spp. *Parasites and Vectors*. 10, 286.

Song H., Buhay J.E., Whiting M. F. & Crandall K. A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 13486-13491.

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 Phylogenetics and Evolutions* 28, 2731-2739.

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

Vázquez-Domínguez E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T. & Gutiérrez-García T.A. 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.

Wanson W. & Larson O. 1972. Studies on Helminths of North Dakota. V. Life History of *Phyllodistomum nocomis*, Fischtal, 1942 (Trematoda: Gorgoderidae). *The Journal of Parasitology*, 58, 1106-1109.

Yamaguti, S. 1975. A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Editorial Keigaku, Tokio. pp. 20-23.

## **IX. ANEXOS.**

### **Anexo 1.**

#### **Tinción con Paracarmín de Mayer.**

1. Lavar a los parásitos con OH al 70% durante 10 minutos.
2. Lavar a los parásitos con OH al 96% durante 10 minutos.
3. Teñir a los parásitos en Paracarmín de Mayer durante 10-15 minutos.
4. Colocar a los parásitos en OH al 96% nuevamente para remover el exceso de colorante durante 5-7 minutos.
5. Colocar a los parásitos en OH al 96% acidulado con HCl, hasta que se observen los órganos internos al microscopio (3-5 minutos).
6. Lavar nuevamente a los parásitos en OH al 96% para detener el proceso del OH acidulado.
7. Deshidratar a los parásitos en OH al 100% durante 25 minutos.
8. Aclarar en salicilato de metilo durante 5-7 minutos.
9. Montar a los parásitos en preparaciones permanentes con Bálsamo de Canadá y etiquetarlas.

## **Anexo 2.**

### **Tinción con Tricrómica de Gomori.**

1. Lavar a los parásitos con OH al 70% durante 10 minutos.
2. Hidratar a los parásitos con agua destilada durante 15 minutos.
3. Hidratar a los parásitos con OH al 50% durante 15 minutos.
4. Hidratar a los parásitos con OH al 25% durante 15 minutos.
5. Lavar a los parásitos con agua corriente durante 10 minutos.
6. Teñir a los parásitos en Tricrómica de Gomori durante 10-15 minutos.
7. Diferenciar en agua acidulada al 0.5% con ácido acético.
8. Deshidratar a los parásitos en OH al 96% durante 20 minutos.
9. Deshidratar a los parásitos en OH al 100% durante 25 minutos.
10. Aclarar en salicilato de metilo durante 5-7 minutos.
11. Montar a los parásitos en preparaciones permanentes con Bálsamo de Canadá y etiquetarlas.

**Anexo 3. Distancias genéticas pareadas dadas en porcentajes entre las especies del género *Phyllodistomum* utilizando el gen nuclear 28S y el gen mitocondrial *cox***

		<b><i>cox 1</i></b>								
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>28S</b>	<b>1</b> <i>Phyllodistomum inecoli</i>	_____	5,83-10,71	7,12-28,61	18,45-22,02	21,73-22,92	18,45-20,54	18,45-23,81	17,86-19,64	17,86-24,11
	<b>2</b> <i>Phyllodistomum spinopapillatum</i>	0.12-0.98	_____	6,27-28,01	19,05-23,51	22,02-24,70	19,94-22,92	19,94-27,08	19,35-23,51	19,94-27,08
	<b>3</b> <i>Phyllodistomum wallacei</i>	1.12-2.01	1.0-2.16	_____	19,14-20,13	21,78-22,01	18,15-18,48	18,15-21,45	16,83-19,21	18,45-21,78
	<b>4</b> <i>Phyllodistomum</i> sp. 1	1.51-1.75	15.02-15.52	15.0-15.02	_____	15.48	15.77	15,77-16,07	16,88-19,64	15,77-17,26
	<b>5</b> <i>Phyllodistomum centropomi</i>	15.27-17.66	15.15-15.64	15.13-15.29	1.4	_____	16.67	16.67	15,63-19,05	16,37-16,96
	<b>6</b> <i>Phyllodistomum</i> sp. 2	14.9-17.09	14.78-15.27	14.75	2	2.7	_____	16,07-19,35	16,25-20,83	16,96-19,05
	<b>7</b> <i>Phyllodistomum</i> sp. 3	15.62-18.09	15.50-15.99	15.48-16.22	2.5	2.5	3.5	_____	13,75-19,64	14,29-17,56
	<b>8</b> <i>Phyllodistomum</i> sp. 4	15.38-17.96	15.25-15.76	15.23-15.70	2.94	2.8	3.69	3.68	_____	0,89-15,18
	<b>9</b> <i>Phyllodistomum</i> sp. 5	15.25-17.64	15.13-15.62	15.11-15.41	3	2.8	3.68	3.4	3.44	_____