



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

Eugregarinas del tracto digestivo de ortópteros del género *Taeniopoda* en México: caracterización morfológica y molecular basada en el gen SSU rDNA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. JORGE HUMBERTO MEDINA DURÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Rosaura Mayén Estrada

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Dr. Atilano Contreras Ramos

Instituto de Biología, UNAM

CD. MX., Mayo, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

Eugregarinas del tracto digestivo de ortópteros del género *Taeniopoda* en México: caracterización morfológica y molecular basada en el gen SSU rDNA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. JORGE HUMBERTO MEDINA DURÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Rosaura Mayén Estrada
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
Dr. Atilano Contreras Ramos
Instituto de Biología, UNAM

MÉXICO, CD. MX. Mayo, 2011

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/0369/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de marzo de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del alumno **MEDINA DURÁN JORGE HUMBERTO** con número de cuenta **309221450** con la tesis titulada **"Eugregarinas del tracto digestivo de ortópteros del género *Taeniopoda* en México: caracterización morfológica y molecular basada en el gen SSU rDNA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ROSAURA MAYÉN ESTRADA**:

Presidente: **DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO**
Vocal: **DRA. ROSA GABRIELA CASTAÑO MENESES**
Secretario: **DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS**
Suplente: **M. EN C. LUIS GARCÍA PRIETO**
Suplente: **DR. VLADIMIR SALVADOR DE JESÚS BONILLA**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 2 de mayo de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y permitirme formarme como taxónomo, sistémata y biólogo evolutivo

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt) por la beca 817546 que me otorgaron para poder llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al programa de apoyos de estudios de posgrado (PAEP), UNAM, por el apoyo que me otorgaron para realizar mi estancia de investigación en Texas A&M University, Estados Unidos.

A la International Society of Protistologists (ISOP) por los premios Holz-Conner que me otorgaron para asistir a los congresos de Moscú, Rusia, y Vancouver, Canada para presentar los resultados de este trabajo.

A la Orthopterists' Society por otorgarme el Ted-Cohn Research Fund para realizar trabajo de campo en relación a los ortópteros.

A mi tutora, Dra. Rosaura Mayén Estrada, y a su laboratorio de Protozoología por brindarme sus instalaciones para realizar mi proyecto de tesis. Agradezco tu guía, apoyo, confianza y conocimiento que me impulsó en mi formación como protistólogo.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Atilano Contreras Ramos y Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez por sus valiosos consejos para la elaboración de este manuscrito.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por permitirme ser parte de su alumnado y profesorado permitió mi desarrollo humano, científico y profesional.

A la Biól. Margarita Reyes Santos por brindarme su apoyo técnico para la realización de este trabajo, pero sobre todo por darme su amistad.

A amigos del Laboratorio de Protozoología (algunos ya no están en el lab): M. en C. Jazmín Aristeo Hernández (Jaz), C. Dr. Carlos Alberto Durán Ramírez (Sr. D.), Biól. Carlos Antonio González Palma (Carlos A), M. en C. Daniel Méndez Sánchez (Darth), M. en C. Jovanny Fernando Yonatan Olvera Bautista (Fer), M. en C. Mireya Ramírez Ballesteros (Mire) y Biól. Víctor Manuel Romero Niembro (Wolka) por permitirme conocerlos y ser un buen ejemplo de lo que la motivación, los consejos, el apoyo y las risas pueden hacer.

A los miembros de mi jurado, M. en C. Luis García Prieto, Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo, Dra. Rosa Gabriela Castaño Meneses y Dr. Vladimir De Jesús Bonilla por brindarme sus valiosas sugerencias en el escrito.

Al Dr. Ricardo Mariño Pérez por darme su amistad, ser mi mentor y mi ejemplo en la ciencia y en la vida. Gracias por darme tantas buenas experiencias.

A mis amigos y de la secu, prepa, facultad y posgrado: el Marie, el Pable, en César (garbanzo de oro), el Chuche, el Serch, la gemelita, el Edgars, la Titi, la Chofa, el Demian, el Chucho, el Deivid, el feo de Carlitos Blanco, la Dianis, la Viri, el Javi, el Román, la Sandy, y muchos otros con los que me disculpo por no incluirlos aquí.

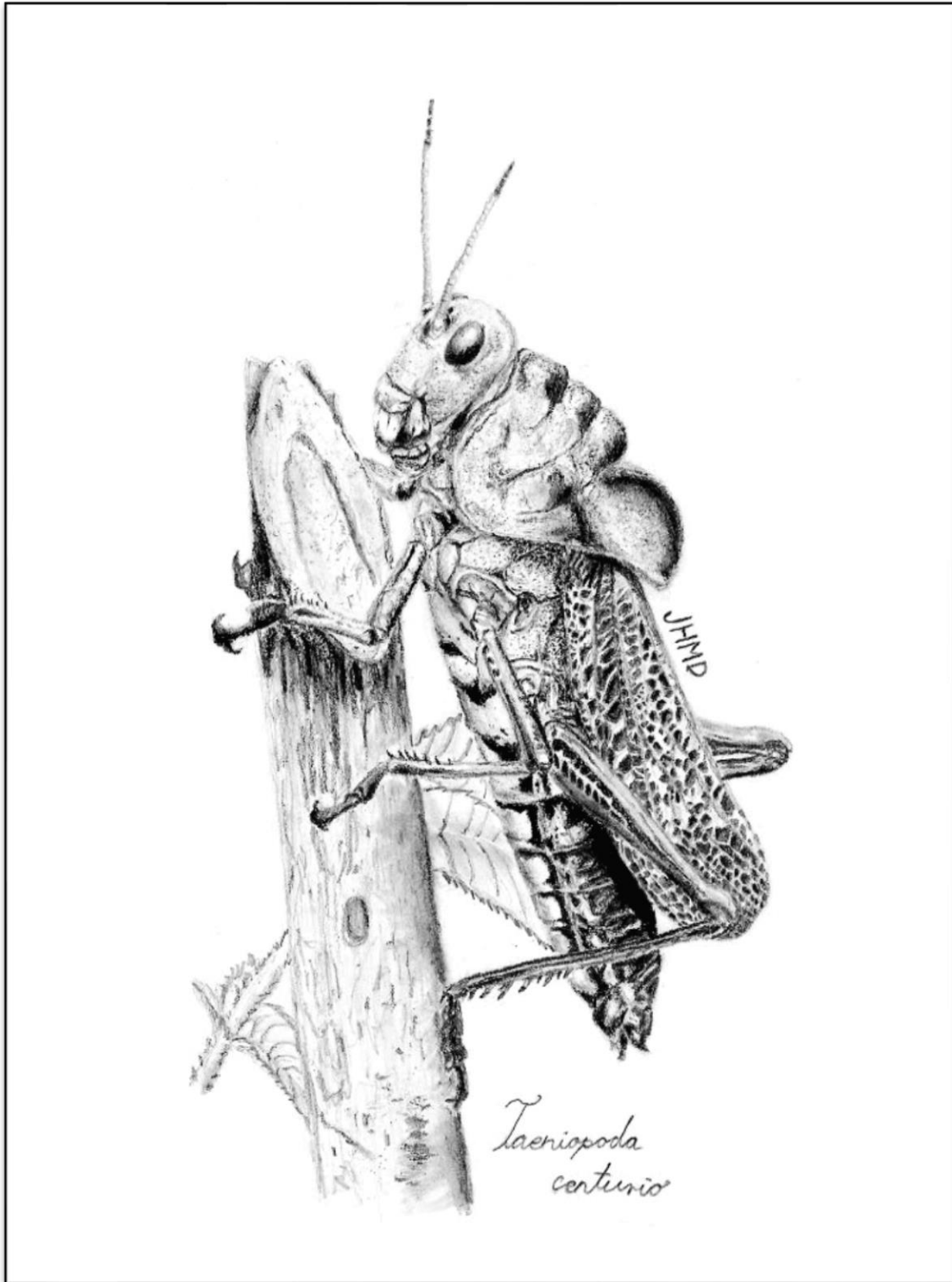
A mi tutor en Texas A&M, Dr. Hojun Song por su amistad y por darme la oportunidad para seguir formándome como biólogo evolutivo.

A mis amigos de otros países, Bert, Poorna, Charluz, Jeeva, Toan, Tyler, Cody, Kurt, Ruben, Alexey, Arina, Dongseok, que me han dado muchos buenos momentos y me han enseñado a pensar diferente.

A todos mis amigos que me dieron la oportunidad de contribuir, aunque sea un poquititititito, con su formación y darme tan buenos momentos molestándolos en el salón y en el campo.

A ti, que me estás leyendo.

**A mis padres y hermanos
son mi motivación y admiración**



Hembra de *Taeniopoda centurio* ilustrada por Jorge Humberto Medina Durán
(dibujo en carbón-grafito)

Índice de contenido

Lista de figuras	1
Lista de tablas	2
Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1. El phylum Apicomplexa en contexto con el árbol evolutivo de los eucariontes	5
1.2. Phylum Apicomplexa Levine, 1970	5
1.2.1. Principales grupos de Apicomplexa	7
1.2.1.1. Los criptosporidios (Subclase Cryptogregaria Cavalier-Smith, 2014)	7
1.2.1.2. Los coccidios (Subclase Coccidia Leuckart, 1879)	8
1.2.1.3. Los hemosporidios (Superorden Haemosporidia Danilewsky, 1885)	9
1.2.1.4. Las gregarinas (Clase Gregarinomorpha Dufour, 1828)	10
1.2.2. Las eugregarinas (Orden Eugregarinida Léger, 1900)	11
1.2.2.1. Eugregarinas con septo	13
1.3. Huéspedes	14
1.3.1. Orden Orthoptera Olivier 1789	14
1.3.2. Género <i>Taeniopoda</i> Stal, 1873 (Caelifera: Romaleidae)	15
1.4. El código de barras en las gregarinas	16
1.4.1. Otros marcadores moleculares propuestos para la clasificación de las gregarinas	17
2. Justificación	19
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo general	20

3.2. Objetivos particulares	20
4. Métodos	21
4.1. Trabajo de campo	21
4.1.1. Área de estudio	21
4.1.2. Recolección e identificación de los ortópteros	22
4.2. Trabajo de laboratorio	23
4.2.1. Procesamiento del material biológico	23
4.2.2. Identificación de las eugregarinas	23
4.3. Estadísticos descriptivos	24
4.4. Procedimientos moleculares	25
4.4.1. Extracción de DNA, amplificación, secuenciación y ensamble	25
4.4.2. Obtención de distancias genéticas	26
5. Resultados	27
5.1. Taxonomía de las eugregarinas	27
5.2. Eugregarinas parásitas de <i>Taeniopoda centurio</i>	27
5.2.1. Caracterización morfológica de <i>Amoebogregarina</i> sp.	27
5.2.2. Caracterización morfológica de <i>Quadruspinospora</i> sp.	33
5.3. Eugregarinas parásitas de <i>Taeniopoda eques</i>	40
5.3.1. Caracterización morfológica de Gregarinidae sp.	40
5.4. Prevalencias e intensidades de infección en <i>T. centurio</i> y <i>T. eques</i>	42
5.4.1. Prevalencia e intensidad de infección en <i>T. centurio</i>	42
5.4.2. Prevalencia e intensidad de infección en <i>T. eques</i>	44
5.5. Posición taxonómica de <i>Taeniopoda eques</i> y <i>T. centurio</i>	47

5.6. Reconstrucción del gen SSU rDNA y análisis de distancias genéticas	49
6. Discusión	55
6.1. Taxonomía	55
6.2. Consideraciones taxonómicas del género <i>Amoebogregarina</i>	58
6.3. Consideraciones taxonómicas del género <i>Quadruspinospora</i>	58
6.4. Distancias genéticas corregidas y no corregidas del gen SSU rDNA	59
6.5. El gen SSU rDNA como marcador molecular complementario en la identificación de gregarinas	60
6.6. Prevalencia e intensidad de las gregarinas	61
7. Conclusiones	64
8. Referencias	66
9. Anexos	84
9.1. Anexo 1: Protocolo de extracción de DNA	84
9.2. Anexo 2: Protocolo empleado para llevar a cabo la PCR	86
9.3. Anexo 3: Protocolo de electroforesis en gel de agarosa 1%	87
9.4. Anexo 4: Artículo aceptado. Morphology and phylogenetic position of two new species of gregarines (Apicomplexa: Eugregarinida) parasitizing the lubber grasshopper <i>Taeniopoda centurio</i> (Drury, 1770) (Insecta: Orthoptera: Romaleidae) in Mexico. <i>J. Euk. Microbiol.</i>	88

Lista de figuras

Figura	Pie de figura	Página
1	Ciclo de vida básico de una eugregarina	13
2	Localidades de muestreo de los estados de Querétaro e Hidalgo, México	21
3	Trofozoítos, gamontes y asociaciones de <i>Amoebogregarina</i> sp.	29
4	Gametoquistes y esporas de <i>Amoebogregarina</i> sp.	30
5	Trofozoítos y gamontes del <i>Quadruspinospora</i> sp.	35
6	Esporas y gametoquiste de <i>Quadruspinospora</i> sp.	36
7	Gamontes y asociaciones de Gregarinidae sp.	41
8	Esporas y gametoquiste de Gregarinidae sp.	41
9	Valores de prevalencia e intensidad totales y por especie de gregarina para <i>Taeniopoda centurio</i> .	44
10	Valores de prevalencia e intensidad para <i>T. eques</i>	46
11	Especies de <i>Taeniopoda</i> examinadas	48
12	Filograma obtenido a partir del método de Neighbor-Joining	54

Lista de tablas

Tabla	Encabezado	Página
1	Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de <i>Amoebogregarina</i> sp.	31
2	Comparación morfométrica de <i>Amoebogregarina</i> sp. con las especies de <i>Amoebogregarina</i> previamente descritas	32
3	Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de <i>Quadruspinospora</i> sp.	36
4	Comparación morfométrica de <i>Quadruspinospora</i> sp. con las especies de <i>Quadruspinospora</i> previamente descritas	38-39
5	Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de Gregarinidae sp. parásita de <i>Taeniopoda eques</i>	42
6	Valores de prevalencia en <i>Taeniopoda centurio</i>	43
7	Valores de intensidad de gregarinas en <i>Taeniopoda centurio</i>	43
8	Valores de prevalencia de Gregarinidae sp. en <i>Taeniopoda eques</i>	45
9	Valores de intensidad de gregarinas en <i>Taeniopoda eques</i>	45
10	Distancia genética no corregida calculada a partir del análisis de BLAST para el gen SSU rDNA de <i>Amoebogregarina</i> sp.	50
11	Distancia genética no corregida calculada a partir del análisis de BLAST para el gen SSU rDNA de <i>Quadruspinospora</i> sp.	51
12	Distancia genética del marcador SSU rDNA de <i>Amoebogregarina</i> sp. y <i>Quadruspinospora</i> sp.1 basada en el modelo Tamura-Nei (1993)	52

Resumen

El phylum Apicomplexa es un grupo diverso de eucariontes unicelulares parásitos de invertebrados y vertebrados que se distinguen principalmente por la presencia de un complejo apical en alguna fase de su ciclo de vida. Las gregarinas (Apicomplexa: Gregarinomorpha) parasitan a invertebrados en ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres. En el caso de los huéspedes terrestres, los insectos son el grupo en el que se han registrado la mayoría de las gregarinas, siendo las investigaciones del sistema gregarina-insecto escasas a nivel mundial, incluyendo México. El orden Orthoptera es un orden con especies de importancia humana en el que los registros de gregarinas son muy escasos. Para documentar la diversidad y prevalencia e intensidad de infección de las gregarinas en México se llevó a cabo un estudio de estos parásitos en *Taeniopoda centurio* y *T. eques*, dos especies de chapulines comunes en el norte de la Sierra Madre Oriental y la meseta central de México respectivamente, y que en algunas zonas pueden llegar a convertirse en plagas. La identificación de las gregarinas de estos huéspedes se basó en los caracteres morfológicos de las etapas de su ciclo de vida y fue complementada con el gen SSU rDNA. En ambas especies de ortópteros se identificaron gregarinas parasitando su tracto digestivo. Para *T. centurio*, se identificaron dos taxones de eugregarinas (*Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp.) pertenecientes a dos superfamilias. El análisis de las distancias genéticas del gen SSU rDNA de ambas especies mostró que, para el caso de *Amoebogregarina* sp., la secuencia más cercana correspondió a *Amoebogregarina nigra*, lo cual corrobora la identificación morfológica a nivel de género. Para el caso de *Quadruspinospora* sp., la secuencia más cercana corresponde a *Monocystis agilis*, que es una eugregarina que parasita anélidos, por lo que la secuencia obtenida en el presente trabajo corresponde al primer registro del gen SSU rDNA documentada para el género. Para *T. eques* se identificó solo un taxón (Gregarinidae sp.) en la cual no se logró secuenciar el gen SSU rDNA. Los valores de prevalencia e intensidad de infección de las gregarinas fueron siempre mayores en *T. centurio* en todos los meses de muestreo. Los resultados morfológicos y moleculares, junto con la información del uso y distribución del huésped sustentó que las eugregarinas que parasitan a *T. centurio* son nuevas especies. En el caso de *T. eques*, la información morfológica sugiere que la especie de gregarina pertenece al género *Amoebogregarina*.

Abstract

Phylum Apicomplexa is a diverse group of unicellular eukaryotes parasites of invertebrate and vertebrates that are mainly distinguished by the presence of an apical complex in at least one of the stages of their life-cycle. The gregarines (Apicomplexa: Gregarinomorpha) parasitize invertebrate hosts from marine, freshwater and terrestrial environments. In the case of the terrestrial hosts, the insects are the group in which most of the gregarines have been recorded, being the research regarding the gregarine-insect system is scarce worldwide, including Mexico. Order Orthoptera is a order with species of human importance in which the records of eugregarines are very scarce. To document the diversity, prevalence and intensity of gregarines in Mexico it was carried out a study of these parasites in the species *Taeniopoda centurio* and *T. eques*, two common species of lubber grasshoppers in the north mountain ranges of the Sierra Madre Occidental and the Mexican Plateau respectively, and in some areas, they may become plagues. The identification of the gregarines in these hosts was based on the morphological characters of the different life-cycle stages and complemented with the SSU rDNA gene. Gregarines were identified parasitizing the digestive tract of both species of orthopterans. For *T. centurio*, two species of eugregarines were identified (*Amoebogregarina* sp. and *Quadruspinospora* sp.) belonging to two superfamilies. The genetic distance analysis of the SSU rDNA gene of both species showed that, for *Amoebogregarina* sp., the closest sequence belongs to *Amoebogregarina nigra*, which support and complement the morphological identification. In the case of *Quadruspinospora* sp., the closest sequence belonged to *Monocystis agilis*, which is an eugregarine that parasitize anelids, so this sequence corresponds to the first record of the SSU rDNA gene documented for the genus. For *T. eques*, only one species (Gregarinidae sp.) was identified, and the SSU rDNA gene was not able to be sequenced. The values of prevalence and intensity of infection of the gregarines were always greater in *T. centurio* in all the sampling months. The morphological and molecular results, along with the information of host utilization and distribution supports that the eugregarine parasites of *T. centurio* are new species. In the case of *T. eques*, the morphological information suggest that the gregarine species belongs to genus *Amoebogregarina*.

1. Introducción

1.1. El phylum Apicomplexa en contexto con el árbol evolutivo de los eucariontes

El phylum Apicomplexa junto con los ciliados y dinoflagelados integran el clado Alveolata (Adl *et al.*, 2012). Morfológicamente, este clado se distingue por la presencia de alveolos corticales, los cuales consisten en vesículas membranosas aplanadas y conectadas entre sí que soportan la membrana plasmática (Cavalier-Smith, 1999; Leander y Keeling, 2003). Además del sustento morfológico, la evidencia genómica agrupa a este clado como monofilético de manera robusta, por lo que el grupo se ha mantenido estable en las propuestas de clasificación de los eucariontes más recientes (Adl *et al.*, 2012; Burki, 2014; Ruggiero *et al.*, 2015). El clado Alveolata se anida a su vez en el supergrupo SAR, el cual es un acrónimo para referirse a los clados Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria (Adl *et al.*, 2012; Burki, 2014). Este clado es muy diverso, tiene representantes heterotróficos y fotosintéticos con adaptaciones morfofisiológicas muy variadas y, contrario a otros supergrupos, solamente está soportado por datos moleculares (Burki, 2014). Si bien las relaciones filogenéticas agrupan de manera estable a los ciliados, dinoflagelados y apicomplexos dentro del clado Alveolata, las relaciones que existen dentro de estos grupos todavía están lejos de resolverse, nuevas evidencias morfológicas, fisiológicas, conductuales y genómicas están contribuyendo a entender las relaciones internas del clado (Morrison, 2009; Adl *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016).

1.2. Phylum Apicomplexa Levine, 1970

El phylum Apicomplexa es un clado monofilético que incluye organismos eucariontes unicelulares parásitos de animales (Leander *et al.*, 2003). Entre las características morfológicas que agrupan a los Apicomplexa están su forma de vida exclusivamente parásita, la pérdida de flagelos a excepción de los gametos de algunos taxa, la presencia de uno o más microporos, su ciclo de vida

complejo que involucra una etapa infecciosa conocida como esporozoíto, el desarrollo de estructuras citoesqueléticas que les permite moverse por deslizamiento, la formación de una vacuola parasitófora, la posesión del apicoplasto en varios grupos y la presencia del complejo apical en su etapa infectiva (Leander y Keeling, 2003; Baum *et al.*, 2006; Mikhailov *et al.*, 2015). El complejo apical está presente en al menos una etapa del ciclo de vida de todos los Apicomplexa por lo que es considerado la principal sinapomorfía del grupo (Votýpka, *et al.* 2017), y está conformado por anillos polares, conoide, roptrias, micronemas y microtúbulos subpeliculares. Su principal función está involucrada en la invasión de las células de los huéspedes que parasitan (Levine, 1988; Dubremetz *et al.*, 1998; Morrison, 2009). El complejo apical está presente también en otros taxa de vida libre que son fotosintéticos como los croméridos (Chromerida, Alveolata) o depredadores como los colpodélidos (Colpodellida, Alveolata) que también son conocidos como Apicomplexa de vida libre o apicomonádidos (Apicomonadea) (Cavalier-Smith, 2014; Milkhailov, *et al.*, 2015; Votýpka *et al.*, 2017).

Los Apicomonadea son alveolados fotosintéticos o heterótrofos depredadores que utilizan el complejo apical para llevar a cabo procesos como la mizocitosis, en la que la célula puede penetrar el córtex y aspirar el contenido citoplasmático de su presa (Leander y Keeling, 2003). En los grupos más primitivos de Apicomplexa (p. ej. gregarinas) la invasión celular ocasiona que el citoplasma de los huéspedes sea absorbido hacia las células del parásito (en un proceso de nutrición similar al de la mizocitosis), mientras que otros miembros del grupo utilizan el complejo apical para penetrar e ingresar completamente a las células de los huéspedes que parasitan (Dubremetz *et al.*, 1998; Leander, 2008). Los Apicomplexa estrictamente parásitos, también conocidos como Apicomplexa núcleo, poseen un plastidio remanente llamado apicoplasto cuya función aún no está bien definida, pero se piensa que está asociado con algunas vías metabólicas, lo que apoya la idea de

que los miembros del clado provienen de un ancestro de vida libre fotosintético (Leander y Keeling, 2003; Waller y McFadden, 2005).

Algunas especies del phylum Apicomplexa causan enfermedades de importancia médica y veterinaria como la malaria y la toxoplasmosis, por lo que han sido ampliamente estudiados, en comparación con otras especies que parasitan invertebrados y vertebrados de menor relevancia humana por lo que la mayoría de las especies son desconocidas (Morrison, 2009). El phylum Apicomplexa cuenta con aproximadamente 6000 especies descritas, no obstante, se estima que el número potencial de especies puede estar entre 1.2 y 10 millones debido a que se considera que todo animal puede contener al menos una especie de Apicomplexa (Adl *et al.*, 2007; Morrison, 2009).

La clasificación de los grupos pertenecientes al clado Apicomplexa se basa principalmente en características fenotípicas y los huéspedes que parasitan, representando un esquema de clasificación utilitario que no incluye su historia evolutiva (Tenter *et al.*, 2002; Morrison, 2009). El phylum Apicomplexa se ha dividido en cuatro grupos que incluyen a las gregarinas, criptosporidios, coccidios y hemosporidios, los cuales han sido catalogados como clases, subclases e inclusive órdenes en distintas propuestas de clasificación (Levine, 1988; Tenter *et al.*, 2002; Morrison, 2009), y solo recientemente los Apicomplexa depredadores y fotosintéticos han sido incluidos dentro de los arreglos taxonómicos (Votýpka *et al.*, 2017).

1.2.1. Principales grupos de Apicomplexa

1.2.1.1. Los criptosporidios (Subclase Cryptogregarina Cavalier-Smith, 2014)

Los criptosporidios son parásitos que se incluyen en un solo género (*Cryptosporidium*), con especies que parasitan vertebrados, incluyendo a los humanos, y causan la criptosporidiosis (Morgan-Ryan *et al.*, 2002). En humanos estos parásitos son transmitidos por la vía oral-fecal o a

través de la ingestión de agua contaminada, lo cual provoca enfermedades gastrointestinales que pueden llegar a ser letales en huéspedes inmunocomprometidos (Ramírez *et al.*, 2004). Además de su importancia médica y veterinaria, los criptosporidios son importantes desde un punto de vista evolutivo por compartir características con las gregarinas y los coccidios (Votýpka, *et al.* 2017).

Los criptosporidios son semejantes a los coccidios en su morfología y ciclos de vida. De la misma manera, con las gregarinas comparten características como la presencia de gamontes extracelulares que forman sicigias (Levine, 1988; Rosales *et al.*, 2005). Aunque inicialmente fueron clasificados junto con los coccidios, actualmente la evidencia genómica y ultraestructural los agrupa en la base de los Apicomplexa núcleo dentro del linaje de las gregarinas (Carreno *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2016, Votýpka *et al.*, 2017). Los caracteres de los criptosporidios que son compartidos con las gregarinas y los coccidios pueden ofrecer información relevante para entender las relaciones evolutivas entre los Apicomplexa.

1.2.1.2. Los coccidios (Subclase *Coccidia* Leuckart, 1879)

Los coccidios son el grupo con el mayor número de especies descritas de Apicomplexa (Tenter *et al.*, 2002). Se caracterizan por presentar gametos maduros intracelulares, microgamontes que producen cientos de miles de microgametos, la ausencia de sicigia, un cigoto inmóvil y un esporoquiste usualmente formado dentro de los ooquistes (Adl *et al.*, 2012). La clasificación de los coccidios se basa en caracteres fenotípicos como su forma, el patrón de alternancia de su reproducción entre la fase sexual y asexual durante su ciclo de vida y los grupos de vertebrados que parasitan (Levine, 1988; Tenter *et al.*, 2012). Actualmente se considera que los caracteres morfológicos son insuficientes por lo que se han utilizado datos genómicos para elucidar sus relaciones filogenéticas, delimitar a sus especies y proponer clasificaciones estables (Tenter *et al.*,

2002; Ogedengbe *et al.*, 2011, 2018). Este grupo tiene importancia médica y veterinaria pues causan enfermedades como la coccidiosis y toxoplasmosis en varios grupos de animales, incluyendo el humano, siendo un problema de salud pública por las altas incidencias de estos parásitos, principalmente en zonas pobres. Sumado a lo anterior, este parásito causa pérdidas económicas en la industria pecuaria que ascienden a millones de dólares (Fayer, 1980; Votýpka *et al.*, 2017).

1.2.1.3. Los hemosporidios (Superorden Haemosporidia Danilewsky, 1885)

Los hemosporidios y piroplásmidos son parásitos que se reproducen a través de un proceso de división múltiple conocido como esquizogonia en las células sanguíneas y tienen ciclos de vida heteroxenos en donde generalmente son transmitidos por algún vector, principalmente por mosquitos, mientras que los piroplásmidos se transmiten por garrapatas (Criado *et al.*, 2006; Votýpka *et al.*, 2017). Los piroplásmidos se diferencian del resto de los hemosporidios por ser piriformes, carecer de conoide, estructuras de locomoción y ooquistes; su reproducción sexual está asociada con la formación de una estructura similar a un axópodo con forma de rayo denominado “Strahlen” (Adl *et al.*, 2012). El bajo número de especies descritas de piroplásmidos contrasta con la diversidad potencial que este grupo puede albergar pues algunos estudios han sugerido que existen muchas especies crípticas debido a su alta diversidad genética (Criado-Fornelio *et al.*, 2004).

Los hemosporidios incluyen a las especies del género *Plasmodium*, las cuales son responsables de causar la malaria que afecta a animales y humanos (Levine, 1988). En la actualidad la malaria está restringida en su mayoría a los trópicos y subtrópicos, pero factores como la migración y el cambio climático están propiciando condiciones favorables para que esta enfermedad amplíe su distribución (Martens y Hall, 2000). Se ha estimado que alrededor de 300-500 millones de

personas a nivel mundial al año padecen malaria, de las cuales mueren aproximadamente dos millones (Martens y Hall, 2000). Por otro lado, los parásitos de los géneros como *Babesia* y *Theileria* infectan al ganado bovino causándoles anemia hemolítica que es mortal, provocando pérdidas económicas importantes (Schnittger *et al.*, 2003)

1.2.1.4. Las gregarinas (Clase Gregarinomorpha Dufour, 1828)

De acuerdo con Carreno *et al.* (1999), Perkins *et al.* (2002), Clopton (2009) y Schrével y Desportes (2013a), las gregarinas representan el linaje más plesiomórfico dentro del phylum Apicomplexa. Las características que distinguen a este grupo del resto de los Apicomplexa son: la presencia de un trofozoíto usualmente extracelular, la formación de una sicigia la cual se origina a partir de una asociación sexual entre dos gamontes haploides y la formación de un gametoquiste en donde se da lugar a la formación de los gametos (gamogonia) a través de la división múltiple de los gamontes por un proceso conocido como esquizogonia.

Las gregarinas parasitan exclusivamente a invertebrados (Levine, 1988; Clopton, 2002; Schrével y Desportes, 2013a), con el mayor número de especies descritas en poliquetos y artrópodos (Clopton, 2002; Schrével y Desportes, 2013a). Levine (1988) y Clopton (2002), registraron aproximadamente 1600 especies en 3124 especies de huéspedes. Sin embargo, se ha argumentado que la diversidad actual de gregarinas está subestimada con respecto al número real de especies existentes el cual se piensa que puede ser de hasta un millón de especies (Levine, 1988; Clopton, 2002; Schrével y Desportes, 2013a).

Los trabajos que se han enfocado a estudiar la diversidad e interacciones entre las gregarinas y sus huéspedes son escasos (Sienkiewicz y Lipa, 2009; Rueckert y Horák, 2017), lo cual ha provocado que en la actualidad todavía no exista consenso en el arreglo taxonómico del grupo y sus

relaciones filogenéticas se basan en la información molecular insuficiente proveniente principalmente del gen SSU rDNA (Rueckert *et al.* 2015; Simdyanov *et al.* 2017).

En los esquemas de clasificación más recientes basados en información molecular, se reconocen dos órdenes de gregarinas: Archigregarinorida Grassé, 1953 y Eugregarinorida Léger, 1900 (Symdianov *et al.* 2017). Sin embargo, desde un punto de vista morfológico y de utilización de hábitat, todavía se reconoce un tercer grupo, las neogregarinas (Neogregarinorida Grassé, 1953). De acuerdo con la información molecular disponible al momento, las neogregarinas están anidadas dentro del clado de las eugregarinas (Cavalier-Smith 2014; Rueckert *et al.* 2015; Symdianov *et al.* 2017). Se infiere que las arquigregarinas son el grupo más plesiomórfico pues presentan características como la similitud entre sus trofozoítos y esporozoítos, su distribución es exclusivamente marina y su forma de alimentación es por mizocitosis (Leander, 2008). Las neogregarinas son el grupo más apomórfico por poseer características como reproducción por merogonia, trofozoítos reducidos, hábitat exclusivamente terrestre y capacidad para infectar tejidos fuera del lumen intestinal (Leander, 2008). Las eugregarinas representan el linaje más diverso de gregarinas y poseen caracteres tanto primitivos como derivados (Desportes, 2013).

1.2.2. Las eugregarinas (Orden Eugregarinida Léger, 1900)

Las eugregarinas están incluidas dentro de la subclase Gregarinasina y se caracterizan por presentar gamogonia y esporogonia en su ciclo de vida y por carecer de merogonia (Clopton, 2002). Durante su ciclo de vida se pueden diferenciar tres fases (Schrével y Desportes, 2013a): trófica, sexual y esporogénica (Figura 1). Presentan trofozoítos más grandes que los del resto de los Apicomplexa, que son diferentes morfológicamente a sus esporozoítos (Leander, 2008). Las eugregarinas parasitan a invertebrados marinos, dulceacuícolas y terrestres (Leander, 2008; Desportes, 2013), principalmente de los grupos de los artrópodos y los anélidos. Aunque las

eugregarinas parasitan principalmente a invertebrados protostomados, se han registrado unas cuantas especies en deuterostomados del grupo de los tunicados (Clopton, 2002).

Tradicionalmente el orden Eugregarinorida se dividía en los órdenes Aseptatorina Chakravarty, 1959 y Septatorina Lankester, 1885 que se diferenciaban en que los segundos presentan un septo que divide a los trofozoítos y gamontes en dos compartimentos: el protomerito y el deuteromerito (Chakravarty, 1960). Las filogenias moleculares inferidas a partir del gen SSU rDNA de trabajos recientes como los de Rueckert *et al.* (2011a, 2017), Cavalier-Smith (2014) y Simdyanov *et al.* (2017) confirman que las gregarinas septadas y aseptadas no se sitúan en clados monofiléticos separados y, por lo tanto, la división de ambos grupos basada en la presencia del septo es inválida.

Simdyanov *et al.* (2017) propusieron el reemplazo de los subórdenes Septatorina y Aseptatorina por los linajes filogenéticos basados en el gen SSU rDNA que delimitan a las superfamilias propuestas por Clopton (2009) y Cavalier-Smith (2014). A pesar de que el septo no es un carácter informativo para agrupar a los clados, las filogenias recientes muestran que la mayoría de las gregarinas con septo se encuentran predominantemente en huéspedes que habitan en ambientes dulceacuícolas y terrestres parasitando cavidades intestinales. Por otro lado, las gregarinas sin un septo se encuentran en huéspedes marinos y pueden parasitar estructuras extraintestinales o tracto digestivo (Schrével y Desportes, 2013a).

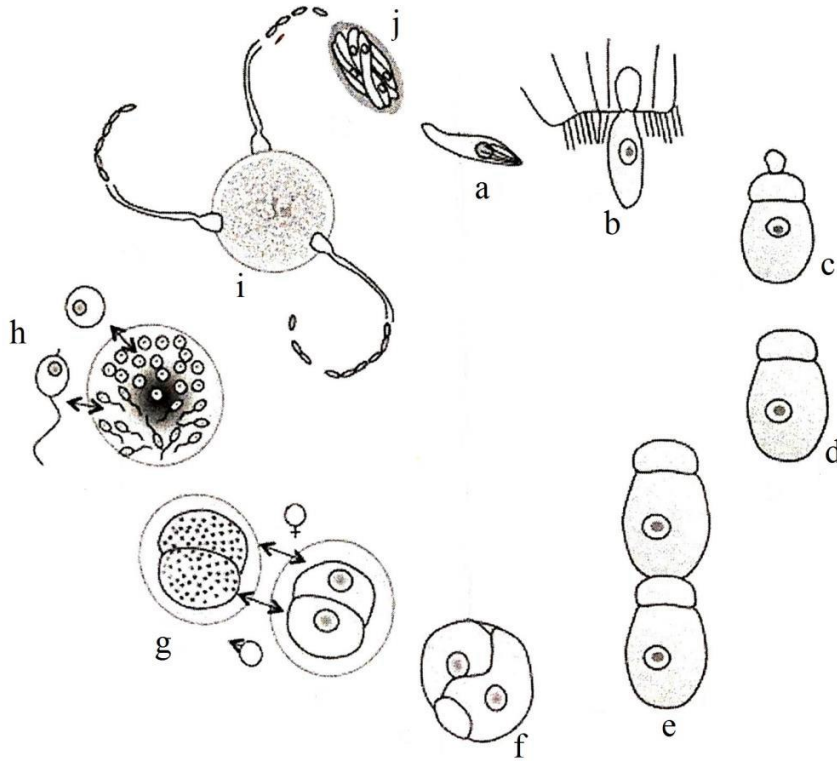


Figura 1. Ciclo de vida básico de una eugregarina; a-e) Fase trófica; f-g) Fase sexual; h-j) Fase esporogénica (modificado de Desportes, 2013)

1.2.2.1. Eugregarinas con septo

Los trofozoítos y gamontes de las eugregarinas con septo visible en microscopía de luz están divididos en dos regiones: el protomerito y el deuteromerito. Adicionalmente, los trofozoítos presentan un tercer compartimento llamado epimerito. El protomerito y el deuteromerito son morfológicamente diferenciables pues el segundo es de mayor tamaño y contiene al núcleo. El epimerito se puede diferenciar de los otros dos compartimentos pues en las etapas de desarrollo tempranas de los trofozoítos contiene el complejo apical, es el de menor talla y es altamente variable en forma (Levine, 1988; Clopton, 2002; Schrével y Desportes, 2013c). La mayoría de las gregarinas con septo parasitan artrópodos (Clopton, 2002; Schrével y Desportes, 2013c), y su forma de transmisión es por la vía oral-fecal mediante la ingestión de oocistos liberados en las heces (Schrével y Desportes, 2013b).

La clasificación de las superfamilias de las gregarinas con septo se basa en caracteres como: el tiempo de asociación de los gamontes, que puede ser temprana (las asociaciones se observan de manera frecuente, presentan distinto grado de desarrollo y tamaño), o tardía (se observan solamente a los gamontes en distinto grado de desarrollo y sus asociaciones son escasas o ausentes); el tipo de asociación presicigial que presentan (frontal, frontolateral, lateral o caudofrontal); el tipo de dehiscencia de los gametoquistes (p. ej., a través de esporoductos, por ruptura simple, por turgencia de la pared epiquística) y el tipo de extrusión de sus esporas (a través de cadenas o en masa) (Clopton, 2009; Desportes, 2013). En la actualidad se reconocen cuatro superfamilias de gregarinas que presentan septos (Cavalier-Smith, 2014; Simdyanov *et al.*, 2017): Actinocephaloidea Cavalier-Smith, 2014, Stylocephaloidea Clopton, 2009, Gregarinoidea Labbé, 1899 y Cephaloidophoroidea Simdyanov & Aleoshin, 2011. Todas ellas se establecieron basándose principalmente en la evidencia del gen SSU rDNA que las agrupa en clados bien soportados. Adicionalmente, se han rescatado sinapomorfías morfológicas como el tipo de asociación presicigial, la forma de dehiscencia del gametoquiste, forma del epimerito y forma de la espora (Clopton, 2009; Desportes, 2013; Cavalier-Smith, 2014; Simdyanov *et al.*, 2017).

1.3. Huéspedes

1.3.1. Orden Orthoptera Olivier 1789

Los ortópteros son insectos terrestres pterigotos que pueden ser ápteros o alados y en sus formas aladas presentan generalmente cuatro alas. Las alas frontales se conocen como tegminas y suelen ser elongadas, con venación bien desarrollada, mientras que las alas posteriores son membranosas y usualmente están plegadas por debajo de las tegminas. El cuerpo de los ortópteros es alargado y al final del abdomen presentan dos cercos bien desarrollados con uno o más segmentos. Sus antenas tienen un número variable de segmentos filiformes, son largas y en

ocasiones sobrepasan la longitud del cuerpo. Su ovopositor puede ser largo (incluso llegando a sobrepasar la longitud del cuerpo) o corto y escondido. Las patas de los ortópteros poseen tres o cuatro segmentos en los tarsos y su tercer par está bien desarrollado, lo cual les confiere a los individuos la capacidad de saltar. Su aparato bucal es mandibulado de tipo triturador-masticador y se alimentan principalmente de plantas, aunque también algunos miembros pueden ser depredadores, carroñeros u omnívoros (Triplehorn y Johnson, 2005; Resh y Cardé, 2009). Su ciclo biológico es hemimetábolo e incluye al huevo, usualmente cinco ninfas y al adulto; las ninfas son similares a los adultos, pero la principal diferencia es que sus alas y genitales no están bien desarrollados (Fontana *et al.*, 2008). En el ciclo de vida típico de los ortópteros, los huevos eclosionan en la primavera, las ninfas se desarrollan en verano y el adulto se reproduce en los últimos meses del año, aunque también muchas especies se presentan durante todo el año (Fontana *et al.*, 2008).

De acuerdo con Resh y Cardé (2009) los ortópteros se clasifican en dos subórdenes: Ensifera y Caelifera. Los Ensifera, con aproximadamente 14 familias, son considerados como el grupo más primitivo y se caracterizan principalmente por tener antenas más largas que el cuerpo y presentar órganos timpánicos en las tibiae anteriores. Los Caelifera, con aproximadamente 28 familias, presentan antenas usualmente cortas y sus órganos timpánicos se encuentran en los costados de su abdomen. Muchas especies de ortópteros son plagas importantes de cultivos debido a sus hábitos herbívoros y generalistas (Triplehorn y Johnson, 2005; Mariño-Pérez *et al.*, 2011; Cigliano *et al.*, 2017). Se distribuyen en todo el mundo a excepción de los polos (Resh y Cardé, 2009).

1.3.2. Género *Taeniopoda* Stal, 1873 (Caelifera: Romaleidae)

El género *Taeniopoda* está incluido dentro de la familia Romaleidae. La familia Romaleidae se caracteriza por la presencia de una espina inmóvil en las superficies internas y externas del ápice

de la tibia. La mayoría de los romaleidos son robustos y pueden tener alas cortas. Las alas posteriores presentan frecuentemente colores brillantes mientras que las alas anteriores presentan un patrón reticulado muy conspicuo.

El género *Taeniopoda* es un grupo que incluye 12 especies de chapulines conspicuos y coloridos distribuidos desde el sur de los Estados Unidos y hasta Centroamérica, principalmente en la zona de transición Neártica-Neotropical (Hebard, 1924; De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017, 2019). Las ninfas emergen del huevo a partir de las primeras lluvias de primavera y los adultos se pueden observar a partir del mes de junio y hasta los últimos meses del año (Rivera-García, 2006). Algunas especies del género son de importancia económica debido a que representan una plaga potencial en algunas regiones (Mariño-Pérez *et al.*, 2011; De Jesús-Bonilla *et al.*, 2019). En dos estudios recientes se encontró que el género *Taeniopoda* es parafilético con respecto al género *Romalea*, por lo que la sinonimia de *Taeniopoda* con *Romalea* necesita ser formalmente establecida (De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017, 2019).

Los estudios realizados sobre el género *Taeniopoda* han sido escasos y se han enfocado principalmente en su comportamiento, fisiología y solo recientemente se realizó la revisión del grupo con base en sus caracteres morfológicos, moleculares y datos de distribución (De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017). Hasta el momento no existe ningún trabajo que haya abordado las interacciones que ocurren entre las especies de este género y los eugregarínidos que los parasitan.

1.4. El código de barras en las gregarinas

Hasta la fecha el marcador más utilizado para establecer relaciones filogenéticas y caracterizar molecularmente a las especies de gregarinas es la subunidad pequeña del DNA ribosomal (SSU rDNA) (Leander *et al.*, 2003; Clopton, 2009; Rueckert *et al.* 2011a, 2011b; Cavalier-Smith, 2014; Simdyanov *et al.*, 2017). Los estudios en relación con la taxonomía y clasificación de las gregarinas

han utilizado principalmente este gen ya que ha mostrado ser útil en la delimitación de las especies debido a las tasas evolutivas altas que presenta el gen en este grupo (Leander *et al.*, 2003; Rueckert y Leander, 2008; Clopton, 2009; Cavalier-Smith, 2014). Sin embargo, este mismo efecto puede complicar el establecimiento de las relaciones evolutivas entre las gregarinas ya que pueden generar topologías con artilugios como la atracción de ramas largas (Cavalier-Smith, 2014). El uso amplio que se le ha dado al gen SSU rDNA en las gregarinas también se debe a que estos organismos carecen de mitocondrias o genoma mitocondrial, aunque en algunas especies del grupo se ha encontrado evidencia ultraestructural de organelos similares a mitocondrias (Ogedengbe, 2015).

A pesar de que la subunidad pequeña del DNA ribosomal (SSU rDNA) presenta regiones de covariación que pueden dificultar la inferencia de homologías de posición en las secuencias alineadas y tiene una tasa general evolutiva baja que puede dificultar la delimitación de especies cercanamente emparentadas (Heger *et al.*, 2011), este gen ha sido utilizado ampliamente para el estudio de relaciones filogenéticas de eucariontes. Lo anterior se debe a que el gen SSU rDNA está presente en todos los organismos y puede ser comparado universalmente (Chantangsi y Leander, 2010). Este gen también contiene regiones con variación que pueden ser utilizadas como un marcador del código de barras (Scicluna *et al.*, 2006; Chantangsi y Leander, 2010). En el caso de las gregarinas, este gen se ha utilizado como un marcador molecular universal fiable debido a su tasa evolutiva alta y la rapidez con la que se puede establecer una primera aproximación para la delimitación de especies con base en las distancias genéticas. Sin embargo, este gen también confiere ciertas desventajas pues los umbrales en las distancias genéticas intra e interespecíficos son arbitrarios (Rueckert, 2011b).

1.4.1. Otros marcadores moleculares propuestos para la clasificación de las gregarinas

Recientemente se han secuenciado otras regiones del operón ribosomal de las gregarinas (los genes LSU rDNA, ITS1, ITS2 y 5.8S) para evaluar su utilidad para establecer relaciones filogenéticas (Simdyanov *et al.*, 2015, 2017), encontrándose que el gen LSU rDNA puede ser útil para establecer relaciones evolutivas bien soportadas en las zonas basales de las topologías en donde el gen SSU rDNA suele arrojar soportes de ramas bajos. Lo anterior se debe a que el gen LSU rDNA presenta tasas evolutivas más bajas que el gen SSU rDNA. La utilidad que supone el uso del gen LSU rDNA está limitada por el bajo número de secuencias disponibles en GenBank en donde la mayoría pertenecen a las arquigregarinas y a otros Apicomplexa, lo que ocasiona un sesgo en el análisis de las secuencias (Simdyanov *et al.*, 2015, 2017).

2. Justificación

La información acerca del sistema simbiótico eugregarina-insecto es escasa, incluso a nivel mundial. En México solamente Zurita Ramón (1969), Leong *et al.* (1997), Reyes-Villanueva *et al.* (2013) y Medina Durán (2016) han documentado estos sistemas y aportaron información relevante respecto a los registros de las eugregarinas. Sin embargo, en el país no existe ningún trabajo en donde se haya caracterizado a las eugregarinas integrando información morfológica y molecular. Sumado a lo anterior, los estudios con relación a las especies del género *Taeniopoda* han sido muy escasos, enfocándose en algunos aspectos de su comportamiento y fisiología, y solo recientemente De Jesús-Bonilla *et al.* (2017) realizaron la revisión de este género utilizando información morfológica y genética para delimitar las especies y entender sus procesos evolutivos. Sin embargo, las asociaciones parasíticas siguen siendo totalmente desconocidas, por lo que el presente proyecto pretende mostrar estas asociaciones enfocándose en los eugregarínidos que parasitan a dos especies del género *Taeniopoda* bajo una perspectiva taxonómica que involucre la caracterización morfológica y molecular usando el gen SSU rDNA de los parásitos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Analizar el sistema eugregarina-ortóptero de dos especies del género *Taeniopoda* abordando la caracterización morfológica y molecular del gen SSU rDNA de las eugregarinas.

3.2. Objetivos particulares

Determinar taxonómicamente las eugregarinas que parasitan el tracto digestivo de las especies *Taeniopoda eques* y *T. centurio* que habitan la zona de transición Neártica-Neotropical del país, en los estados de Hidalgo y Querétaro.

Calcular la prevalencia e intensidad promedio de las eugregarinas en sus huéspedes.

Obtener la secuencia SSU rDNA de las eugregarinas para ser empleada como un marcador molecular taxonómico complementario en su determinación.

4. Métodos

4.1. Trabajo de campo

4.1.1. Área de estudio

Se seleccionaron dos localidades de muestreo ubicadas en los estados de Querétaro e Hidalgo, México, con base en los registros de distribución de las especies proporcionados por De Jesús-Bonilla *et al.* (2017; Figura 2). En Querétaro, la localidad está dentro del predio privado conocido como Agropark y está ubicada en el municipio de Colón ($20^{\circ} 40' 52.4''$ N, $99^{\circ} 59' 58.1''$ O), y en el estado de Hidalgo la localidad está en el municipio de Tlanchinol, y es conocida como paradero de la minera Autlán, ($20^{\circ} 59' 36.5''$ N, $98^{\circ} 39' 27.5''$ O).

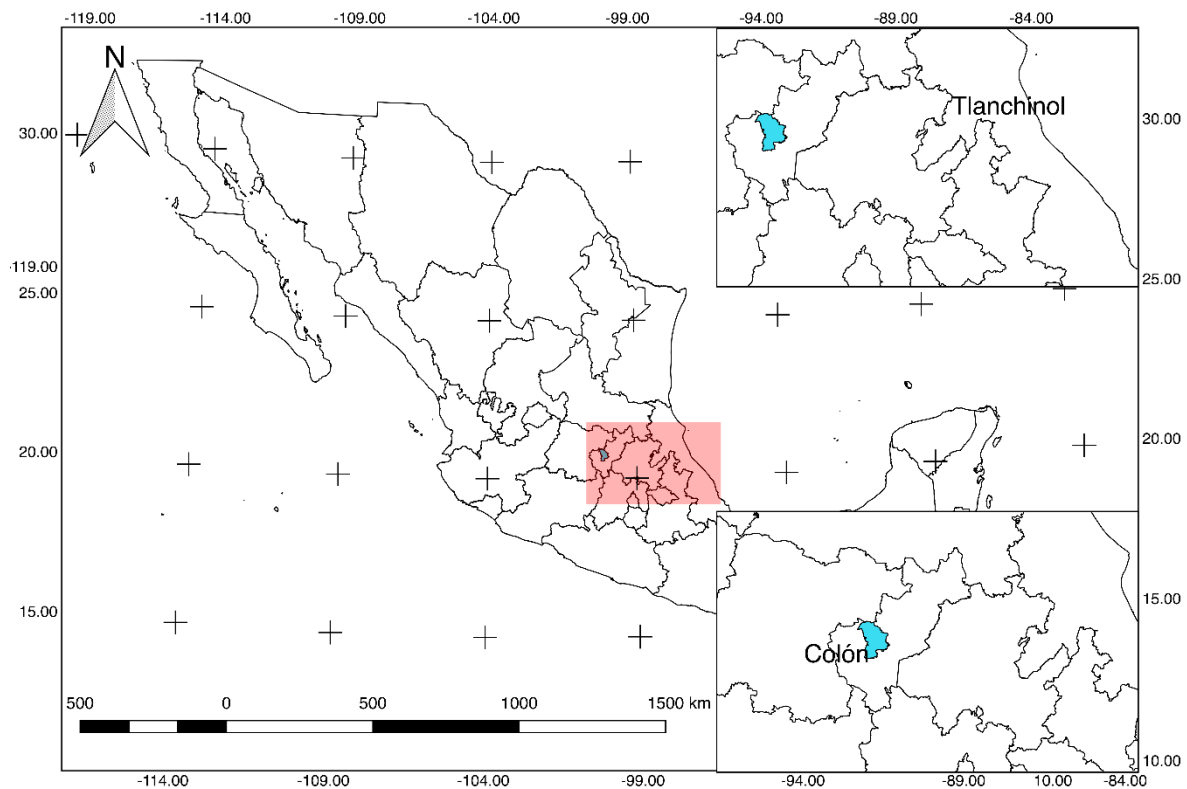


Figura 2. Localidades de muestreo de los estados de Querétaro e Hidalgo, México.

El municipio de Colón está ubicado al centro del estado de Querétaro, México, en la provincia de la Faja Volcánica Transmexicana, subprovincia Llanuras y Sierras de Querétaro e Hidalgo (INEGI, 2009a). Colinda al norte con el municipio de El Marqués, el estado de Guanajuato y el municipio Tolimán; al sur con los municipios de Tequisquiapan, Pedro Escobedo y El Marqués; al este con los municipios Tolimán, Ezequiel Montes y Tequisquiapan y al oeste con el municipio de El Marqués (INEGI, 2009a). El municipio cuenta con un intervalo de altitud de entre 1700 y 3400 m.s.n.m., y ocupa el 6.9 % de la superficie del estado de Querétaro (INEGI, 2009a). Cuenta con un clima predominantemente semiseco y templado (BS1k), con un intervalo de precipitación que va de los 400 a los 800 mm anuales. En la localidad de muestreo la tierra es de uso agrícola y contiene componentes de matorral xerófilo (INEGI, 2009a).

El municipio de Tlanchinol está ubicado al norte del estado de Hidalgo, México, en la provincia Sierra Madre Oriental, subprovincia Carso Huasteco (INEGI, 2009b). Colinda al norte con el estado de San Luis Potosí, al sur con el municipio Calnali, al este con los municipios Huazalingo, San Felipe Orizatlán y Huejutla y al oeste con el municipio Lolotla (INEGI, 2009b). Tlanchinol cuenta con un intervalo de altitud de entre 200 y 1900 m.s.n.m., y ocupa el 1.88 % de la superficie del estado de Hidalgo (INEGI, 2009b). El clima es predominantemente semicálido húmedo con lluvias todo el año, con un intervalo de precipitación de los 1900 a los 2100 mm anuales (Luna-Vega *et al.*, 1994). En la localidad de muestreo la tierra es de uso agrícola y habitacional (INEGI, 2009b; Aguilar-López *et al.*, 2013).

4.1.2. Recolección e identificación de los ortópteros

En Agropark, en el municipio de Colón, Querétaro, se realizaron cuatro recolectas en los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre de 2017, de la especie *Taeniopoda eques* (Burmeister, 1838). En la localidad minera Autlán, en el municipio Tlanchinol, Hidalgo, se realizaron tres

recolectas de la especie *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) durante el año 2017 (septiembre, octubre y noviembre). Para ambas especies, se recolectaron de forma manual 30 individuos en muestreos diurnos, siguiendo los métodos propuestos por Kula y Clopton (1999), y Lange y Wittenstein (2002). Los individuos recolectados se colocaron en frascos de plástico de boca ancha de aproximadamente 4 L con vegetación de la zona. Los ortópteros se identificaron en campo usando las guías de Hebard (1924) y De Jesús-Bonilla *et al.* (2017).

4.2. Trabajo de laboratorio

4.2.1. Procesamiento del material biológico

El material biológico fue transportado vivo al Laboratorio de Protozoología, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde se mantuvieron a temperatura ambiente. Al momento de su disección, en todos los chapulines se registró el estadio de desarrollo y sexo de acuerdo a Whitman y Orsak (1985). Para cada individuo se registró su longitud total, longitud total del pronoto y ancho de la cabeza utilizando un Vernier (0.1 mm). Los chapulines revisados fueron sacrificados por decapitación (Hall y Hostettler, 1993; Forbes *et al.*, 2011) y se extrajo el intestino medio y el posterior con ayuda de pinzas de punta fina. El intestino fue colocado en una caja de Petri de 5 cm con solución muscular de insecto (80 mEq/L Na⁺, 40 mEq/L K⁺; 10 mEq/L Ca⁺⁺, 20 mEq/L Mg⁺⁺, 150 mEq/L Cl⁻ y 0.4 M de sacarosa) (Belton y Grundfest, 1962; Clopton y Lucarotti, 1997), y se procedió a localizar las diferentes fases del ciclo de vida de los eugregarínidos utilizando un microscopio estereoscópico

4.2.2. Identificación de las eugregarinas

En ambas especies de chapulines se aislaron los trofozoítos, gamontes, sicigias, gametoquistes y ooquistes de los eugregarínidos. Se realizaron observaciones en vivo de cada etapa del ciclo de vida utilizando microscopía de contraste de fases y contraste diferencial de interferencia con un

microscopio NIKON LABOPHOT-2 para registrar la forma de la célula, la posición del núcleo, forma del epimerito, tipo de asociación presicigial y forma de los ooquistes. Con ayuda del microscopio estereoscópico se recuperaron los gametoquistes del tracto digestivo o buscándolos directamente de las heces, y se colocaron en cámaras húmedas (cajas de Petri con papel filtro húmedo), para su cultivo y observar el tipo de dehiscencia (Schrével y Desportes, 2013a). Para cada etapa de desarrollo se registraron los datos morfométricos como la longitud y ancho de los epimeritos, protomeritos y deuteromeritos en los trofozoítos, así como de los gamontes y sicigias. De igual manera, se realizó el registro microfotográfico con una cámara digital NIKON DIGITAL SIGHT DS2Mv adaptada a un microscopio NIKON LABOPHOT-2. Para resaltar las estructuras y organelos de importancia taxonómica se realizaron las técnicas de tinción de hematoxilina de Harris-Eosina de Zelmer y Giemsa-Eosina de Zelmer (Clopton, 1998; Lee *et al.*, 1985). Para la identificación, la descripción y el arreglo taxonómico de los parásitos se consultó a Clopton (2002, 2009), Desportes (2013), Scherével y Desportes (2013c), Cavalier-Smith (2014) y Simdyanov *et al.* (2017). La terminología empleada en la descripción de las gregarinas corresponde a la de Clopton (2004).

4.3. Estadísticos descriptivos

Para cada especie de chapulín se calcularon las prevalencias de cada especie de parásito, definidas como el número de huéspedes infectados con al menos una especie particular de un parásito entre el número total de huéspedes (Margolis *et al.*, 1982; Bush *et al.*, 1997; Mlynarek *et al.*, 2012). Se calculó la prevalencia total, prevalencia por sexo y prevalencia por muestreo. Para cada valor de prevalencia se calcularon los intervalos de confianza Clopper-Pearson 95% (Zar, 2010) y se compararon las diferencias entre la prevalencia de machos y hembras usando el Fisher Exact Test con tablas de contingencia de 2x2 utilizando el programa R Studio Versión 1.1.419 (RStudio Team, 2016). En los chapulines parasitados se calculó la intensidad promedio de los eugregarínidos que corresponde al número de células que presentaba cada chapulín infectado entre el número total

de chapulines infectados (Bush *et al.*, 1997). También se cuantificaron los intervalos de intensidad de los parásitos, definido como el número mínimo y máximo de parásitos que se encontraron en los huéspedes infectados. Los valores de intensidad y prevalencia fueron graficados utilizando el programa R Studio con ayuda del paquete ggplot2.

4.4. Procedimientos moleculares

4.4.1. Extracción de DNA, amplificación, secuenciación y ensamble

Se aislaron aproximadamente 100 células de cada especie de gregarina en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se lavaron las células tres veces en solución muscular de insecto (Belton y Grundfest, 1962; Clopton y Lucarotti, 1997) y se fijaron en alcohol absoluto grado molecular. Para la extracción del DNA se utilizó el kit de extracción Gentra Puregene mouse tail kit (Quiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones descritas por Woller y Raszick (com. pers.) (Anexo 1). El gen SSU rDNA fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Anexo 2) con un termociclador Bio-Rad T100 y utilizando los primers externos propuestos por Leander *et al.* (2003). Se aislaron los productos obtenidos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo 3) para confirmar la longitud esperada de los amplicones. Se purificaron los productos de la PCR con la longitud esperada utilizando el kit de limpieza USB ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.). Los productos de las muestras purificadas fueron secuenciados directamente usando los mismos primers externos que en la PCR y adicionalmente cuatro primers internos (Clopton, 2009; Rueckert *et al.* 2011a). La secuenciación se llevó a cabo en la University of Arizona Genetics Core (University of Arizona, U.S.A) utilizando un equipo analizador de DNA Applied Biosystems 3730. Todos los procedimientos de extracción, amplificación y purificación se llevaron a cabo en The Song's Lab of Insect Systematic and Evolution en el Departamento de Entomología, Texas

A&M University, Estados Unidos. Las secuencias obtenidas fueron editadas y los contigs fueron ensamblados usando Geneious 10 (Biomatters Ltd, Auckland, Nueva Zelanda; Kearse et al., 2012) para generar las secuencias consenso.

4.4.2. Obtención de distancias genéticas

Las secuencias obtenidas fueron inicialmente analizadas usando la búsqueda de BLAST implementada en Geneious 10 para confirmar que sus identidades correspondieran a secuencias de apicomplejos y obtener las distancias genéticas. Adicionalmente, se utilizó el modelo de evolución Tamura-Nei 93 (Tamura y Nei, 1993) para determinar las distancias genéticas corregidas para ambas secuencias y se construyó un filograma mediante el método de Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987).

5. Resultados

5.1. Taxonomía de las eugregarinas

Se identificaron tres taxones de eugregarinas, dos parasitando al ortóptero *Taeniopoda centurio* y una tercera especie parasitando a *T. eques*. El siguiente esquema de clasificación de las eugregarinas identificadas está basado en Cavalier-Smith (2014) y Simdyanov *et al.* (2017).

Phylum Apicomplexa Levine, 1970

Subphylum Sporozoa Leuckart, 1879

Clase Gregarinomorpha Grassé, 1953

Orden Eugregarinida Léger, 1900

Superfamilia Gregarinoidea Labbé, 1899

Familia Gregarinidae Labbé, 1899

Gregarinidae sp.

Género *Amoebogregarina* Kula y Clopton, 1999

Amoebogregarina sp.

Superfamilia Actinocephaloidea Cavalier-Smith, 2014

Familia Actinocephalidae Léger, 1892

Género *Quadruspinospora* Sarkar y Chakravarty, 1969

Quadruspinospora sp.

5.2. Eugregarinas parásitas de *Taeniopoda centurio*

5.2.1. Caracterización morfológica de *Amoebogregarina* sp.

El taxón *Amoebogregarina* sp. presentó trofozoítos y gamontes con dos compartimentos, el protomerito y el deuteromerito, separados por un septo (Figura 3c-e). Los deuteromeritos de los trofozoítos, gamontes y sicigias presentaron una forma elipsoidal con una razón aproximada de 2:1 en su proporción largo-ancho (Figura 3c-g), y los protomeritos fueron panduriformes constreñidos en el segundo y tercer tercio del eje anteroposterior con una razón cercana al 1:1 en

su relación largo-ancho (Figura 3a-c). En los trofozoítos, el epimerito presentó forma elipsoidal u ovoidal con un radio de aproximadamente 2:1 en la relación largo-ancho (Figura 3a, c, Tabla 1). El epimerito fue metamórfico pues se asimilaba (el epimerito se desplaza hacia el interior del protomerito) en los gamontes y las sicigias, en donde esta estructura presentó formas elipsoidales (Figura 3f-g) o deltoides (Figura 3b, d-e), con distintas proporciones en el radio ancho-largo que varían dependiendo del grado de su asimilación hacia el protomerito (Kula y Clopton, 1999; Clopton, 2002; Desportes, 2013). Su asociación presicigial fue precoz, caudofrontal y biasociativa (Figura 3f-h). Los gametoquistes presentaron un epiquiste hialino y su dehiscencia fue a través de esporoductos (Figura 4b-e); las esporas doliformes se liberaron por extrusión en cadenas tipo “monete” (Figura 4a-b). Los trofozoítos, gamontes y asociaciones se encontraron en los ciegos gástricos y la luz del intestino medio, mientras que los gametoquistes se hallaron al final del intestino medio y en el intestino posterior. Los datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida se muestran en la Tabla 1.

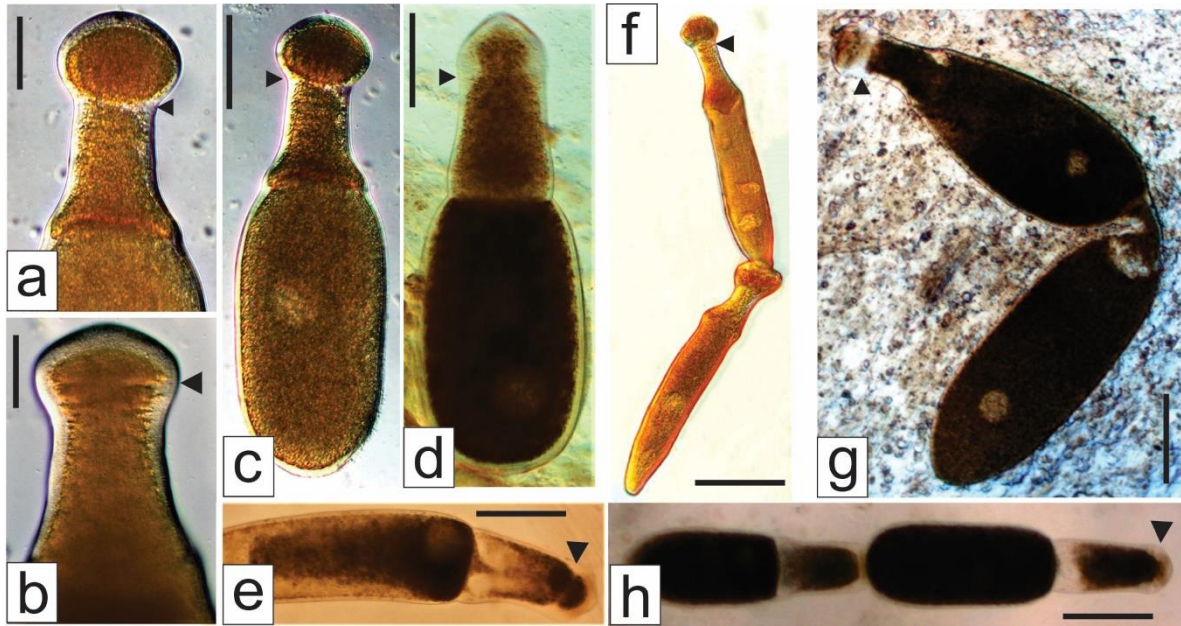


Figura 3. Trofozoítos, gamontes y asociaciones de *Amoebogregarina* sp.; a-b) Asimilación del epimerito (Barras=30 μ m); c) Trofozoíto (Barra=40 μ m); d-e) Gamontes con epimerito asimilado (Barras=50 μ m); f-h) Asociaciones mostrando el proceso de asimilación del epimerito (Barra f=50 μ m, Barra g y h=70 μ m). Las puntas de flecha muestran diferentes etapas durante el proceso de asimilación del epimerito.

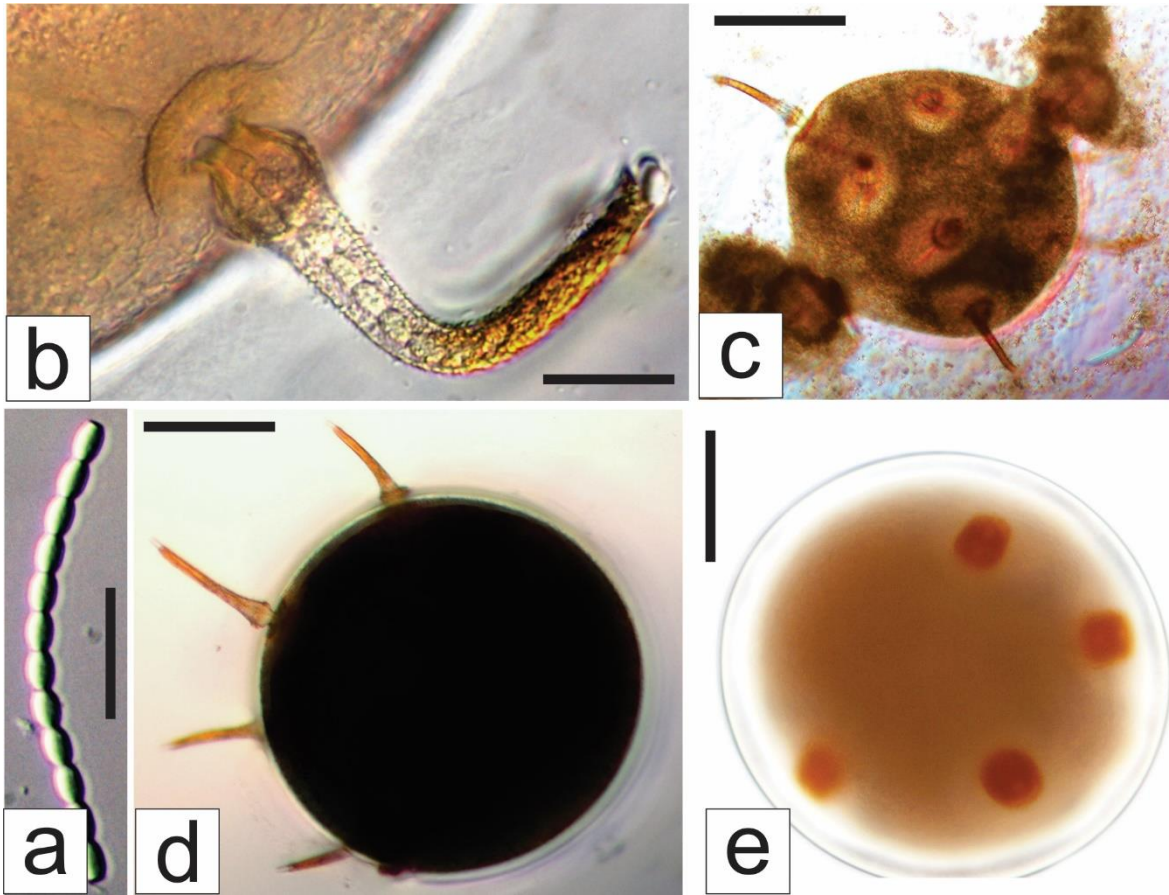


Figura 4. Gametoquistes y esporas de *Amoebogregarina* sp.; a) Esporas doliformes en cadena de tipo “monete” (Barra=25 μm); b) Detalle del esporoducto (Barra=30 μm); c-d) Gametoquistes con dehiscencia por esporoductos (Barras=300 μm); e) Gametoquiste previo a su dehiscencia (Barra=300 μm).

Tabla 1. Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de *Amoebogregarina* sp. parásito de *Taeniopoda centurio*

Etapa	Carácter	Mín	Máx	Prom	DE	n
Trofozoítos	Largo deuteromerito	157.3	371.8	272.0	47.3	18
	Ancho deuteromerito	71.5	200.2	124.7	39.9	18
	Largo protomerito	42.9	185.9	86.6	36.8	18
	Ancho protomerito	42.9	128.7	77.2	22.2	18
	Largo epimerito	28.6	64.3	45.8	10.5	18
	Ancho epimerito	54.3	94.1	69.2	12.9	18
	Diámetro del núcleo	21.4	50.1	34.4	8.39	14
Gamontes	Largo deuteromerito	143	572	403.1	110.0	20
	Ancho deuteromerito	114.4	271.7	178.3	47.73	20
	Largo protomerito	42.9	271.7	121.5	65.02	20
	Ancho protomerito	71.5	185.9	115.4	34.04	20
	Diámetro del núcleo	28.6	71.5	50.5	13.7	18
Asociaciones (primito)	Largo deuteromerito	143	572	370.3	110.8	10
	Ancho deuteromerito	121.5	243.1	176.6	44.2	10
	Largo protomerito	85.8	271.7	173.0	55.3	10
	Ancho protomerito	71.5	185.9	108.6	35.9	10
	Largo epimerito	28.6	50	40.5	10.9	3
	Ancho epimerito	71.5	85.8	78.6	7.1	3
	Diámetro del núcleo	28.6	71.5	50.0	15.1	9
Asociaciones (satélite)	Largo deuteromerito	328.9	743.6	471.6	128.3	10
	Ancho deuteromerito	114.4	271.7	185.1	57.8	10
	Largo protomerito	42.9	100.1	77.9	17.3	10
	Ancho protomerito	85.8	200.2	127.9	43.7	10
	Diámetro del núcleo	28.6	71.5	49.4	16.2	10
Gametoquistes	Largo total	400.4	443.3	422.6	18.1	7
	Ancho total	386.1	443.3	413.6	23.7	7
	Ancho epiquiste	57.2	92.9	76.8	15.8	7
Esporas	Largo	7	7.2	7.05	0.106	31
	Ancho medio	4.6	5.2	4.7	0.13	31
	Ancho terminal	2.6	3.5	2.8	0.35	31

Prom=promedio, DE=desviación estándar, n=número de individuos, Min=mínimo, Máx=máximo. Todos los valores están mostrados en micrómetros

Tabla 2. Comparación morfométrica de *Amoebogregarina* sp. con las especies de *Amoebogregarina* previamente descritas

	<i>Amoebogregarina</i> sp.	<i>A. ampulla</i>	<i>A. nigra</i>	<i>A. dhawanii</i>	<i>A. crenata</i>	<i>A. nymphae</i>
Largo total Media-DE (mín- máx)	524.64 ± 175.04 (200.2-843.7)	526.2 ± 13.3 (280-584)	509.0 ± 157.7 (252.7-814.0)	555.65 ± 15.3 (465.5-910)	134 (ND)	150.8 (109-205)
Largo epimerito Media-DE(mín-máx)	45.84 ± 10.54 (28.6-64.3)	ND (ND)	37.9 ± 8.2) (20- 50.5)	34 (ND)	6.8 ± 0.34 (6-7)	6.8 (ND)
Largo Protomerito Media-DE (mín- máx)	121.54 ± 65.02 (42.9-271.7)	129.8 ± 5.3 (96-192)	134.3 ± 38.4 (79.8- 223.4)	173.63 ± 5.82 (119.7-266)	22 (ND)	33.9 (26-45)
Largo deuteromerito Media-DE (mín- máx)	403.1 ± 110.02 (143-572)	396.4 ± 12.4 (180-464)	384.5 ± 128.8 (174.2-598.5)	382.04 ± 12.76 (319.2-715)	112 (ND)	116.8 (90-163)
Ancho epimerito Media-DE (mín- máx)	69.25 ± 12.94 (54.3-94.1)	ND (ND)	81 ± 15.6 (54.9- 105)	50 (ND)	ND (ND)	6.8 (ND)
Ancho protomerito Media-DE (mín- máx)	115.46 ± 34.04 (71.5-185.9)	133.3 ± 4.8 (72-160)	113.8 ± 48.6 (57.2-240.7)	118.65 ± 4.52 (93.1-208)	22 (ND)	32.5 (26-42)
Ancho deuteromerito Media-DE (mín- máx)	178.39 ± 47.73 (114.4-271.7)	223.1 ± 8.5 (104-296)	152.1 ± 70.2 (66.5-320.5)	152.36 ± 5.16 (119.7-235)	37 (ND)	58.6 (41-90)
Huésped(es)	Romaleidae: <i>Taeniopoda</i> <i>centurio</i>	Acrididae: <i>Ronderosia</i> <i>bergi</i>	Varias especies de las familias Acrididae y Pyrgomorphidae	Pyrgomorphidae: <i>Atractomorpha</i> <i>crenulata</i>	Varias especies de la familia Chrysomelidae	Chrysomelidae: <i>Galerucella</i> <i>nymphae</i>
Países en donde se registraron	América: México (Sierra Madre Oriental)	América: Argentina	América: Estados Unidos, África: Sudáfrica, Senegal, Costa de Marfil, República Democrática del Congo Asia: Tailandia	Asia: India	América: Brasil África: República Democrática del Congo, Etiopía Asia: India, Filipinas, Taiwán, Japón, Nueva Guinea, Rusia	Europa: Italia
Referencia	Este estudio	Lange y Cigliano (2004) Desportes (2013)	Kula y Clopton (1999) Desportes (2013)	Pushkala <i>et al.</i> (2000) Desportes (2013)	Bathia y Setna (1924) Desportes (2013)	Lipa y Triggiani (1989) Desportes (2013)

Todos los datos morfométricos se muestran en micrómetros. ND, datos no disponibles. Los datos entre paréntesis corresponden al valor mínimo (mín) y máximo (máx) de las medidas.

Desportes (2013) reconoció cinco especies del género *Amoebogregarina*. Tres de ellas parasitan a ortópteros: *Amoebogregarina ampulla* (Lange y Cigliano, 2004) Desportes, 2013; *Amoebogregarina nigra* (Watson, 1915) Kula y Clopton, 1999, y *Amoebogregarina dhawanii* (Pushkala *et al.*, 2000) Desportes, 2013, siendo la primera la especie tipo del género. Las dos especies restantes se registraron en coleópteros: *Amoebogregarina crenata* (Bathia y Setna, 1924) Desportes, 2013 y *Amoebogregarina nymphae* (Lipa y Triggiani, 1989) Desportes, 2013. En la tabla 2 se muestra la comparación entre *Amoebogregarina* sp. y las cinco especies previamente descritas.

5.2.2. Caracterización morfológica de *Quadruspinospora* sp.

Quadruspinospora sp. se caracterizó por tener trofozoítos y gamontes solitarios (Figura 5a-e), con una asociación presicigial efímera y que inmediatamente dio lugar al gametoquiste por lo cual fue imposible de observar. El deuteromerito en los trofozoítos fue obdeltoide u obpiriforme con una razón de 2:1 en su largo y ancho (Figura 5b-c), y en los gamontes cambió a una forma obtrullada con una proporción 3:1 en su largo y ancho (Figura 5d-e). El protomerito de los trofozoítos y gamontes presentó forma de luna con una proporción ancho-largo de 1.5:1 en los trofozoítos y de 2:1 en los gamontes (Figura 5b-e). El epimerito fue subsférico y con forma de “coliflor” con entre 8 y 12 procesos digitiformes (Figura 5a-c) (Desportes, 2013). Los trofozoítos y gamontes con dos compartimentos, el protomerito y el deuteromerito separados por un septo. Los gametoquistes presentaron un epiquiste grueso y su dehiscencia fue a través de una ruptura simple. Las esporas fueron ovoides y con dos filamentos polares parecidos a espinas en cada polo (Figura 6a-c). Los trofozoítos y gamontes presentaron en general tallas cercanas al milímetro de longitud y se encontraron parasitando los ciegos gástricos y la luz del intestino medio; los gametoquistes se encontraron en el intestino medio y posterior. Los datos morfométricos de *Quadruspinospora* sp.

se muestran en la Tabla 3. Las especies del género *Quadru spinospora* solo se han registrado en suborden Califera (Desportes, 2013).

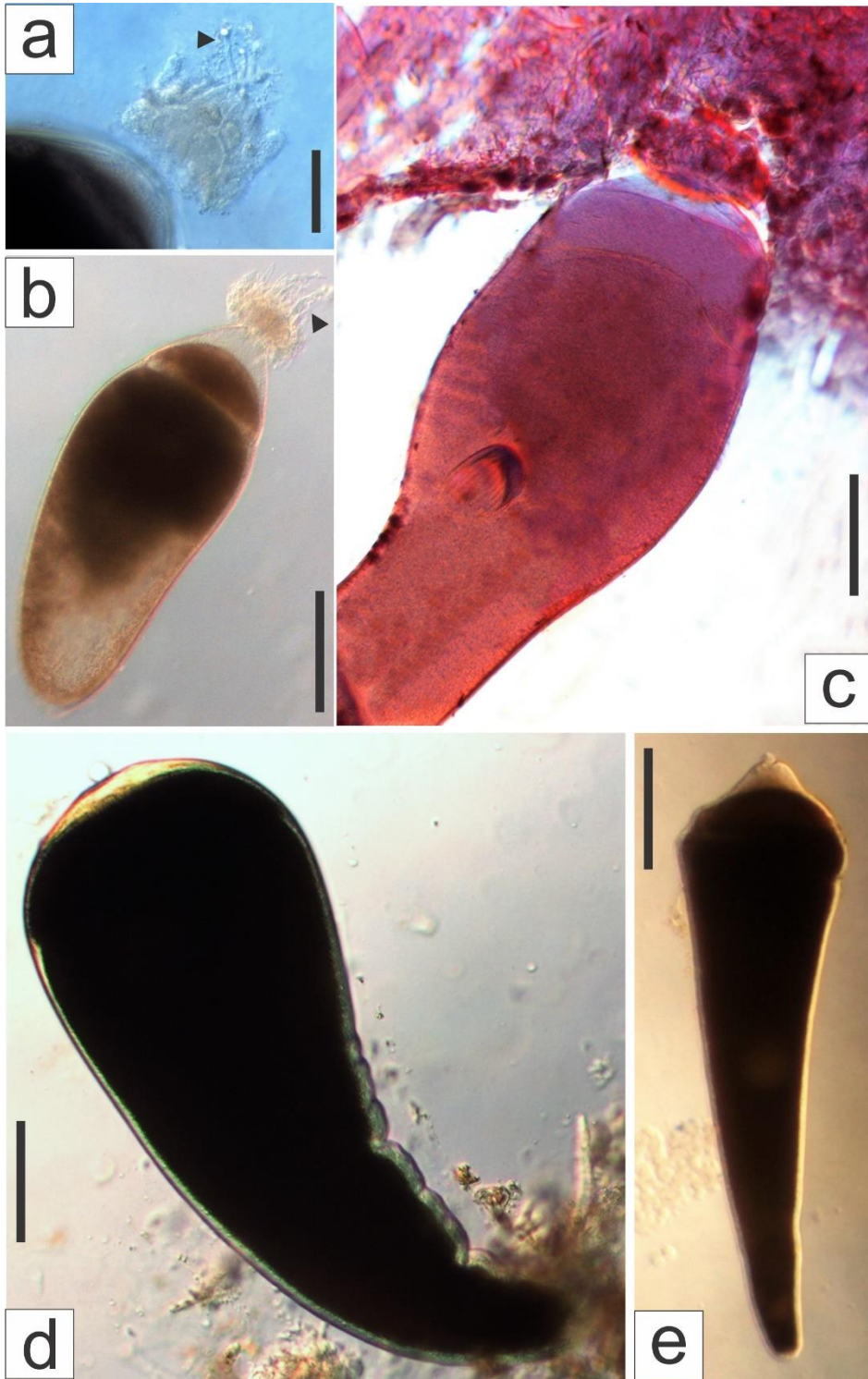


Figura 5. Trofozoítos y gamontes del *Quadruspinospora* sp.; a) detalle del epimerito con procesos digitiformes (Barra=35 μ m); b) Trofozoíto libre (Barra=150 μ m); c) Trofozoíto nutriéndose del tejido del huésped *T. centurio* (Barra=60 μ m); d-e) Gamontes (Barra d=100 μ m, Barra e=200 μ m).

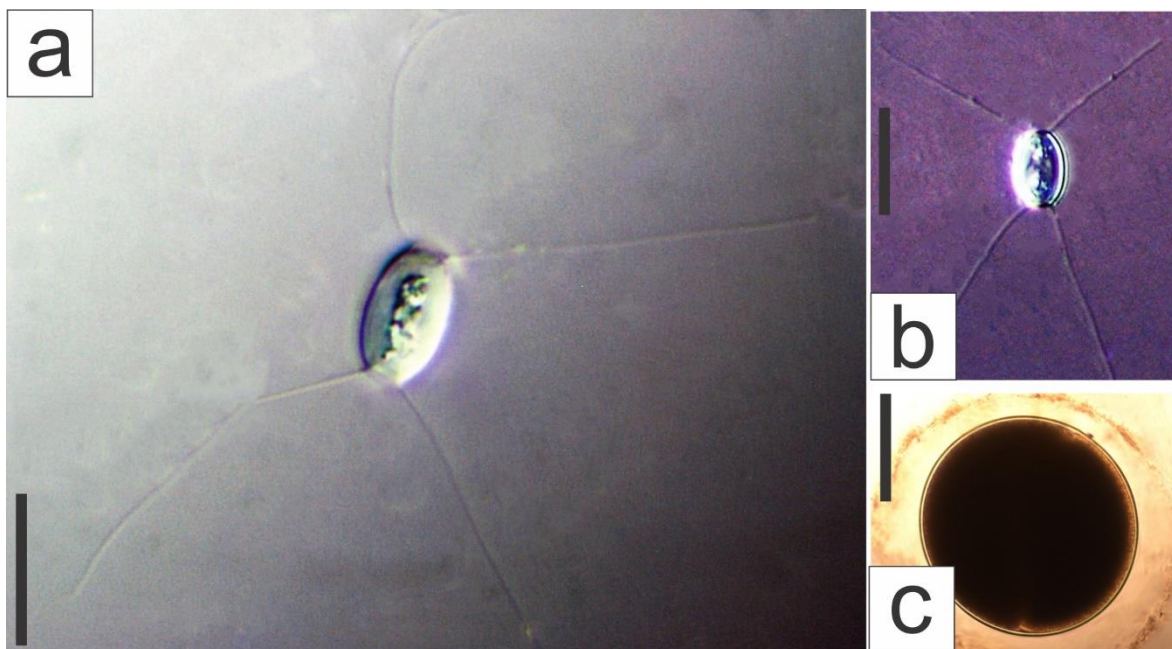


Figura 6. Esporas y gametociste de *Quadruspinospora* sp.; a-b) Esporas con sus cuatro espinas polares (Barras=10 μ m); c) Gametociste inmaduro (Barra=600 μ m).

Tabla 3. Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de *Quadruspinospora* sp. parásito de *Taeniopoda centurio*

Estadio	Carácter	Mín	Máx	Prom	DE	n
Trofozoítos	Largo deuteromerito	150.2	429	257.35	104.22	10
	Ancho deuteromerito	80.5	164.4	124.23	28.6	10
	Largo protomerito	24.5	100.1	57.7	26.73	10
	Ancho protomerito	38.5	143	89.83	37	10
	Largo epimerito	21	42.9	35.66	9.18	10
	Ancho epimerito	21.4	42.9	32.06	8.82	10
	Diámetro del núcleo	28	42.9	34.18	6.12	10
Gamontes	Largo deuteromerito	243.1	1186.9	655.41	286.51	27
	Ancho deuteromerito	93.1	471.9	239.65	107.67	27
	Largo protomerito	28.1	171.6	95.83	39.56	27
	Ancho protomerito	85.8	343.2	189.6	70.67	27
	Diámetro del núcleo	28.6	71.5	57.2	18.08	6
Gametocistes	Largo total	443.3	700.7	538.03	76.36	16
	Ancho total	457.6	715	535.31	68.29	16
	Ancho epiquiste	114.4	214.5	170.7	31.53	16
Esporas	Largo	7	10.5	8.8	0.66	30
	Ancho medio	4.6	5.25	5.15	0.22	30
	Ancho terminal	2.2	3.5	3.05	0.41	30
	Espinass	21	35	26.65	4.63	30

Prom=promedio, DE=desviación estándar, n=número de individuos, Min=mínimo, Máx=máximo. Todos los valores están mostrados en micrómetros.

Desportes (2013) reconoció 13 especies del género *Quadru-spinospora*: *Quadru-spinospora acridae* (Haldar & Chakraborty, 1979) Levine, 1988; *Quadru-spinospora adigitalis* Datta, Gosh & Haldar, 1990; *Quadru-spinospora aelopii* Sarkar & Chakravarty, 1969; *Quadru-spinospora attractomorphae* (Haldar & Chakraborty, 1978) Levine, 1985; *Quadru-spinospora caudata* Modak, Basu & Haldar, 2008; *Quadru-spinospora chakravartyi* (Chakraborty & Haldar, 1975) Levine, 1988; *Quadru-spinospora cloptoni* Modak, Basu & Haldar, 2008b; *Quadru-spinospora dichotoma* Kundu & Haldar, 1983; *Quadru-spinospora hieroglyphae* Mandal & Ray, 2007; *Quadru-spinospora indoaiolopii* Haldar & Chakraborty, 1976; *Quadru-spinospora japonicus* Hoshide, 1958; *Quadru-spinospora megaspinosa* Haldar & Chakraborty, 1976; *Quadru-spinospora platyepimerita* Datta, Gosh & Haldar, 1990. Adicionalmente se describió *Quadru-spinospora oxyae* Yumnam y Mohilal 2017, por lo que hasta el momento se han descrito 14 especies del género *Quadru-spinospora*. La especie tipo de este género es *Q. japonicus*. Todas las especies se han descrito parasitando solamente ortópteros del suborden Caelifera. La Tabla 4 muestra la comparación morfológica de *Quadru-spinospora* sp. con las 14 especies previamente descritas.

Tabla 4. Comparación morfométrica de *Quadruspinospora* sp. con las especies de *Quadruspinospora* previamente descritas

	<i>Quadruspinospora</i> sp.	<i>Q. aelopii</i>	<i>Q. attractomorphae</i>	<i>Q. chakravartyi</i>	<i>Q. dichotoma</i>	<i>Q. indoaiolopii</i>	<i>Q. megaspinosa</i>
Largo total	751.24 ± 326.07	ND (77.5-270)	443.7	ND (ND)	394.5 (85-749.7)	351 (140-600)	314.2 (95-630)
Media-DE (mín-máx)	(271.2-1358.5)		(110-1020)				
Largo epimerito	35.66 ± 9.18 (21-42.9)	ND (15-20)	20 (ND)	ND (ND)	25.9 (12.7-30)	19.2 (12.5-30)	24.5 (12.5-40)
Media-DE (mín-máx)							
Largo Protomerito	95.83 ± 39.56 (28.1-171.6)	ND (15-65)	62.5 (30-110)	ND (ND)	70.5 (25-116.7)	55.5 (32.5-110)	57 (20-100)
Media-DE (mín-máx)							
Largo deutomerito	655.41 ± 286.51	ND (62.5-205)	381.2 (80-910)	ND (ND)	324 (60-633)	283.7 (95-530)	246.5 (62.5-540)
Media-DE (mín-máx)	(243.1-1186.9)						
Ancho epimerito	32.06 ± 8.82 (42.9-21.4)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	86.4 (36.1-140)	ND (ND)	ND (ND)
Media-DE (mín-máx)							
Ancho protomerito	189.6 ± 70.67 (85.8-343.2)	ND (35-100)	130.7 (50-300)	ND (ND)	98.8 (45-140)	118.8 (45-270)	108.6 (32.5-108.6)
Media-DE (mín-máx)							
Ancho deutomerito	239.65 ± 107.67	ND (40-125)	153.8 (60-430)	ND (ND)	146.5 (60-210)	136.5 (45-350)	123.2 (32.5-270)
Media-DE (mín-máx)	(93.1-471.9)						
Epimerito	Esférico con forma de "coliflor" con 8 a 12 procesos digitiformes	Proyecciones numerosas y pequeñas similares a procesos digitiformes	Con 12 a 18 procesos digitiformes	Con 20 a 24 procesos digitiformes	Con 25 a 30 procesos digitiformes dicotómicos	Con 10 a 23 procesos digitiformes	Con 13 a 16 procesos digitiformes
Tamaño de los ooquistes	8.8x5.15	8x4	10x5	9x5	9.9x6.6	10x5	9x5
Espinas (longitud)	Cuatro espinas (21-35)	Cuatro espinas (36-38)	Cuatro espinas (33)	Cuatro espinas (30)	Cuatro espinas (33.2-49.8)	Cuatro espinas (40)	Cuatro espinas (30)
Huésped(es)	Romaleidae: <i>Taeniopoda centurio</i>	Pyrgomorphidae: <i>Aiolopus</i> sp.	Pyrgomorphidae: <i>Atractomorpha crenulata</i>	Pyrgomorphidae: <i>Spathosternum</i> sp. <i>Aiolopus thalassinus tamulus</i>	Pyrgomorphidae: <i>Spathosternum prasiniferum prasiniferum</i>	Pyrgomorphidae: <i>Aiolopus</i> sp. <i>Aiolopus thalassinus tamulus</i>	Pyrgomorphidae: <i>Trilophidia annulata</i>
Región geográfica	América: México	Asia: India	Asia: India	Asia: India	Asia: India	Asia: India	Asia: India
Referencia	Este estudio	Sarkar y Chakravarty (1969)	Haldar y Chakraborty (1978)	Chakraborty & Haldar (1975)	Kundu y Haldar (1983)	Haldar y Chakraborty (1976)	Haldar y Chakraborty (1976)

Tabla 4. Continuación

	<i>Q. acridae</i>	<i>Q. adigitalis</i>	<i>Q. caudata</i>	<i>Q. hieroglyphae</i>	<i>Q. japonicus</i>	<i>Q. cloptoni</i>	<i>Q. platyepimerita</i>	<i>Q. oxyae</i>
Largo total Media-DE (mín- máx)	326.1 (70-720)	277.1 (100-949.6)	489 ± 24.3 (258-614)	ND (ND)	ND (ND)	392 ± 17.4 (150-728)	243.3 (83.3-699.7)	146 ± 14.14 (120-163.6)
Largo epimerito Media-DE (mín- máx)	16.4 (10-30)	133.3 (ND)	34 ± 2.1 (21-45)	ND (ND)	ND (ND)	34 ± 2.1 (22-56)	33.3 (ND)	13.8 ± 5.3 (6.5-23.6)
Largo Protomerito Media-DE (mín- máx)	55.3 (15-130)	63.6 (16.7-299.9)	70 ± 4.2 (40-101)	ND (ND)	ND (ND)	62 ± 3.4 (27-104)	52.6 (16.7-116.6)	37.4 ± 5.9 (27.5-47.1)
Largo deuteromerito Media-DE (mín- máx)	264.2 (45-590)	216.1 (83.3-649.7)	419 ± 22.7 (218-513)	ND (ND)	ND (ND)	330 ± 21.7 (123-624)	190.7 (66.6-583.1)	96.9 ± 8.5 (87.9-116.5)
Ancho epimerito Media-DE (mín- máx)	ND (ND)	116.6 (ND)	50 ± 3.3 (43-58)	ND (ND)	ND (ND)	53 ± 3.5 (33-78)	58.3 (ND)	ND (ND)
Ancho protomerito Media-DE (mín- máx)	123.7 (30-310)	82.4 (41.7-199.9)	133 ± 6.7 (57-212)	ND (ND)	ND (ND)	94 ± 7.4 (33-135)	85.5 (33.3-166.6)	78.8 ± 12.9 (40.1-92.9)
Ancho deuteromerito Media-DE (mín- máx)	ND (ND)	91.4 (33.3-249.9)	176 ± 12.3 (57-235)	ND (ND)	ND (ND)	126 ± 11.7 (33-257)	90.8 (33.3-249.9)	91.1 ± 11.4 (66.8-106.6)
Epimerito	Con forma de perilla con 10 a 13 procesos digitiformes	Sin procesos digitiformes visibles	Napiforme	ND (ND)	ND (ND)	Con forma de coliflor	Proyecciones numerosas y pequeñas similares a procesos digitiformes	Procesos digitiformes curvados con forma de signo de interrogación
Tamaño de los ooquistes	9x5	8.3x5	9x4	ND (ND)	ND (ND)	10x5	8.3x5	oval 11.5x7.2
Espinas	Cuatro espinas (30)	Cuatro espinas (13.3)	Cuatro espinas (30-37)	ND (ND)	ND (ND)	Cuatro espinas (14-21)	Cuatro espinas (24.9-33.2)	Cuatro espinas (19.5-21.5)
Huésped(es)	Acrididae: <i>Acrida exaltata</i>	Acrididae: <i>Phlaeoba antennata antennata</i>	Acrididae: <i>Gesonula punctifrons</i>	Acrididae: <i>Hieroglyphus banian</i>	Acrididae: <i>Acrida lata</i> <i>Locusta migratoria</i> <i>Oedaleus infernalis</i> <i>Oxya japonica</i> <i>Oxya velox</i> Pyrgomorphidae: <i>Atractomorpha bedeli</i>	Acrididae: <i>Oxya hyla hyla</i>	Acrididae: <i>Oxya hyla hyla</i>	Acrididae: <i>Oxya hyla hyla</i>
Región geográfica	Asia: India	Asia: India	Asia: India	Asia: India	Asia: Japón	Asia: India	Asia: India	Asia: India
Referencia	Halдар y Chakraborty (1976)	Datta <i>et al.</i> (1990)	Modak <i>et al.</i> (2008)	Mandal y Ray (2007)	Hoshide (1958)	Modak <i>et al.</i> (2008)	Datta <i>et al.</i> (1990)	Yumnam y Mohilal (2017)

Todos los datos morfométricos se muestran en micrómetros. ND, datos no disponibles. Los datos entre paréntesis corresponden al valor mínimo (mín) y máximo (máx) de las medidas.

5.3. Eugregarinas parásitas de *Taeniopoda eques*

5.3.1. Caracterización morfológica de Gregarinidae sp.

Para la especie *Taeniopoda eques*, se identificó a la especie Gregarinidae sp. (Figuras 7-8), que se caracterizó por presentar gamontes y sicigias con dos compartimentos, el protomerito y deuteromerito, divididos por un septo (Figura 7a-e). Los deuteromeritos de los gamontes y sicigias presentaron una forma oblonga con una relación largo-ancho de 2:1 (Figura 7a, d-e), y los protomeritos fueron panduriformes ligeramente constreñidos en el segundo y tercer tercio del eje anteroposterior con una relación ancho-largo de 1:1 (Figura 7a-c). Su asociación presicigial fue precoz, caudofrontal y biasociativa (Figura 7d-e). Los gametoquistes con un epiquiste hialino y dehiscencia a través de esporoductos (Figura 8b-c); las esporas son doliformes y se liberaron por extrusión en cadenas tipo “monete” (Figura 8a). Los trofozoítos, gamontes y asociaciones se encontraron en los ciegos gástricos y la luz del intestino medio, mientras que los gametoquistes en el intestino posterior. Los datos morfométricos de Gregarinidae sp. se muestran en la Tabla 5.



Figura 7. Gamontes y asociaciones de Gregarinidae sp.; a) Gamonte (Barra=100 µm); b-c) Detalle del protomerito (Barras=60 µm), las estrellas muestran estructuras que probablemente pertenezcan a endosimbiontes de las gregarinas; d-e) Asociaciones (Barras=150 µm).

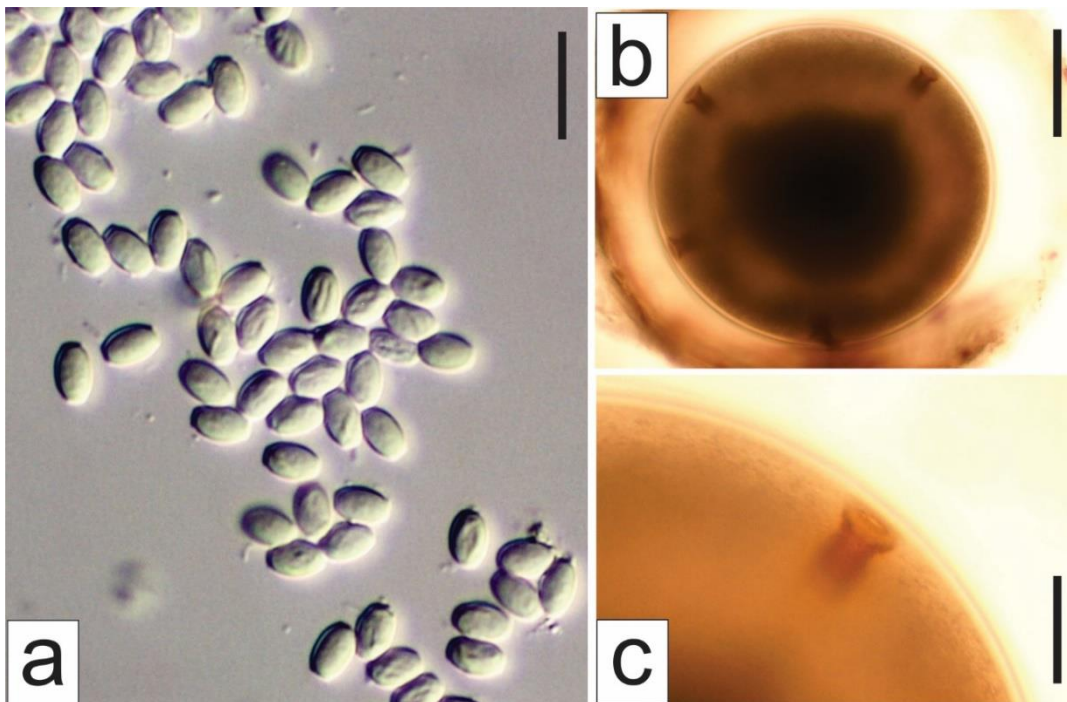


Figura 8. Esporas y gametociste de Gregarinidae sp.; a) Esporas de tipo monete, se observan los esporozoítos dentro de las esporas (Barra=15 µm); b) Gametociste previo a su dehiscencia (Barra=350 µm); c) Detalle del primordio del esporoducto (Barra=100 µm).

Tabla 5. Datos morfométricos de las etapas del ciclo de vida de Gregarinidae sp. parásita de *Taeniopoda eques*

Estadio	Caracter	Mín	Máx	Prom	DE	n
Gamontes	Largo deuteromerito	85	500.5	176.96	133.91	10
	Ancho deuteromerito	42.9	143	79.53	31.38	10
	Largo protomerito	28.6	157.3	61.66	40.25	10
	Ancho protomerito	42.9	107.2	66.13	21.17	10
	Diámetro del núcleo	21.4	42.9	30.61	7.37	10
Asociaciones (primito)	Largo deuteromerito	85.78	622.1	318.9	182.04	24
	Ancho deuteromerito	71.5	400.4	184.1	91.45	24
	Largo protomerito	35.7	371.8	169.81	145.81	24
	Ancho protomerito	54.3	228.8	125.29	54.57	24
	Diámetro del núcleo	28.6	57.2	37.39	9.3	13
Asociaciones (satélite)	Largo deuteromerito	100.1	956.8	394.98	258.72	24
	Ancho deuteromerito	57.2	386.1	173.42	96.27	24
	Largo protomerito	28.6	185.9	84.6	59.1	24
	Ancho protomerito	57.2	228.8	124.52	61.46	24
	Diámetro del núcleo	28.6	50.1	38.12	7.16	9
Gametoquistes	Largo total	405.4	421.7	413.55	11.52	2
	Ancho total	402.5	421.7	412.1	13.57	2
	Ancho epiquiste	60.2	67.5	63.85	5.16	2
Esporas	Largo	7	7.25	7.03	0.08	30
	Ancho medio	4.66	5.25	4.69	0.14	30
	Ancho terminal	2.625	3.5	2.74	0.30	30

Prom=promedio, DE=desviación estándar, n=número de individuos, Min=mínimo, Máx=máximo. Todos los valores están mostrados en micrómetros

5.4. Prevalencias e intensidades de infección en *T. centurio* y *T. eques*

5.4.1. Prevalencia e intensidad de infección en *T. centurio*

La prevalencia de infección total, por sexos, por mes de muestreo y por especie de parásito en *Taeniopoda centurio* se muestran en la tabla 6. La mayor prevalencia se obtuvo para los machos tanto para la prevalencia total como para la prevalencia por especie de gregarina; no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de prevalencia entre machos y hembras. La especie *Amoebogregarina* sp. fue la especie con mayor prevalencia en *T. centurio*. En el mes de noviembre 2017, la prevalencia de infección fue del 100% (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de prevalencia en *Taeniopoda centurio*

Categoría		Huéspedes sanos	Huéspedes infectados	Prevalencia (%)	Fisher Exact	IC Clopper-Pearson 95%	n
Total		11	80	87.9		79.4-93.8	91
Hembras		5	30	85.7	0.7434	69.74-95.19	35
Machos		6	50	89.2		78.12-95.97	56
<i>Amoebogregarina</i> sp.	Total	13	78	85.7	0.2347	76.81-92.17	91
	Hembras	7	28	80		63-91.56	35
	Machos	6	50	89.3		78.12-95.97	56
<i>Quadruspinospora</i> sp.	Total	19	72	79.1	0.431	69.33-86.94	91
	Hembras	9	26	74.3		56.74-87.51	35
	Machos	10	46	82.1		69.6-91.09	56
Prevalencia total por mes de muestreo							
sep-2017		10	23	69.7		51.29-84.41	33
oct-2017		1	29	96.7		82.78-99.92	30
nov-2017		0	28	100		87.66-100	28

La intensidad promedio de infección total, por sexos, por especie de parásito y por mes de muestreo para la especie *Taeniopoda centurio* se muestra en la tabla 7. El intervalo de intensidad de infección varió entre uno a 387 parásitos por hospedero (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de intensidad de gregarinas en *Taeniopoda centurio*.

Categoría		Intensidad promedio	Intensidad mínima	Intensidad máxima	n
Total		105.2	1	387	78
Hembras		113.4	1	381	28
Machos		100.6	1	321	50
<i>Amoebogregarina</i> sp.	Total	57.9	1	232	76
	Hembras	57	2	232	26
	Machos	58.4	1	200	50
<i>Quadruspinospora</i> sp.	Total	56.5	1	191	70
	Hembras	70.5	1	191	24
	Machos	48	1	160	46
Intensidad por mes de muestreo					
sep-2017		33.5	1	145	22
oct-2017		172.7	3	381	28
nov-2017		93.9	6	228	28

En la Figura 9 se muestra la relación entre la prevalencia e intensidad de las eugregarinas encontradas en *T. centurio*.

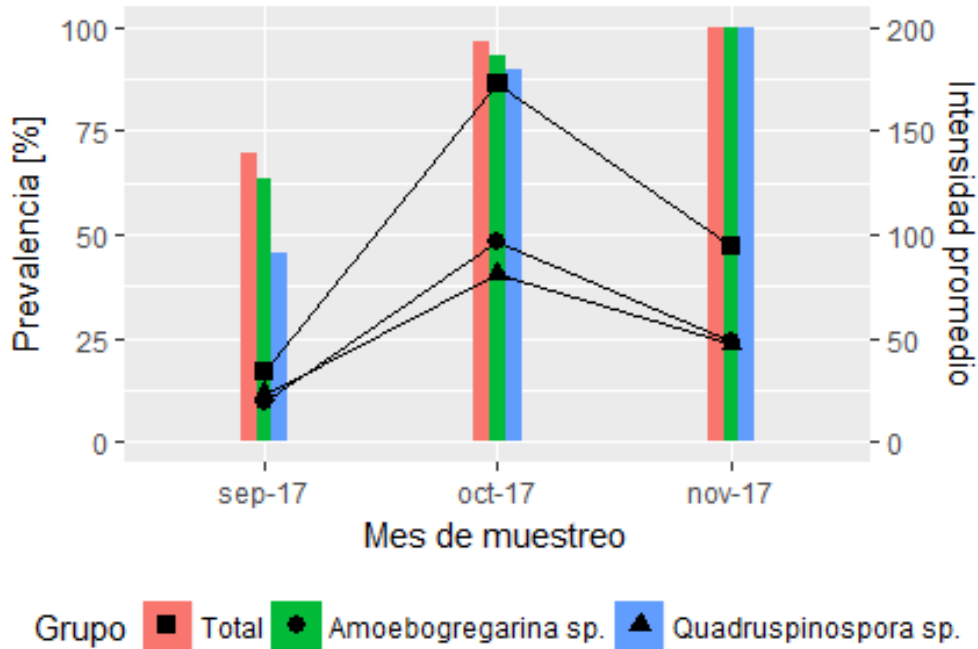


Figura 9. Valores de prevalencia (barras) e intensidad (líneas) totales y por especie de gregarina para *T. centurio*.

5.4.2. Prevalencia e intensidad de infección en *T. eques*

La prevalencia de infección total y por sexos en *Taeniopoda eques* se muestran en la tabla 8. La mayor prevalencia se obtuvo para las hembras, sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de prevalencia entre machos y hembras (Fisher Exact $p=1$). Para el mes de agosto 2017 la prevalencia fue de cero (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de prevalencia de Gregarinidae sp. en *Taeniopoda eques*.

Categoría	Huéspedes sanos	Huéspedes infectados	Prevalencia (%)	Fisher Exact	IC Clopper-Pearson 95%	n
Total	91	37	28.9		21.24-37.58	128
Hembras	58	24	29.26	1	19.74-40.35	82
Machos	33	13	28.26		15.99-43.46	46
Prevalencia total por mes de muestreo						
ago-2017	28	0	0		0-12.34	28
sep-2017	33	5	13.15		4.41-28.09	38
oct-2017	21	11	34.37		18.57-53.19	32
nov-2017	9	21	70		50.6-85.27	30

La intensidad promedio de infección total, por sexos y por mes de muestreo para la especie

Taeniopoda eques se muestra en la tabla 9, con un intervalo de intensidad entre 1 y 83 parásitos.

Tabla 9. Valores de intensidad de gregarinas en *Taeniopoda eques*.

Categoría	Promedio intensidad	Intensidad mínima	Intensidad máxima	n
Total	9.4	1	83	37
Hembras	11.5	1	83	24
Machos	5.4	1	27	13
Intensidad por mes de muestreo				
ago-2017	0	0	0	0
sep-2017	20.2	1	83	5
oct-2017	3.9	1	11	11
nov-2017	9.7	1	54	21

En la Figura 10 se muestra la relación entre la prevalencia e intensidad de las eugregarinas

observadas en *T. eques*.

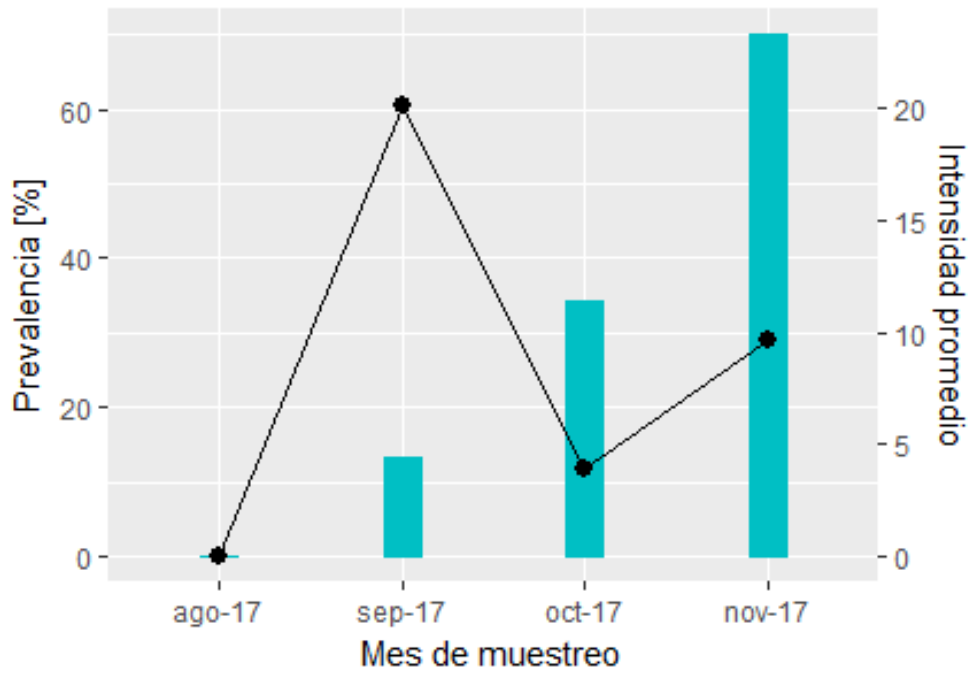


Figura 10. Valores de prevalencia (barras) e intensidad (líneas) para *T. eques*.

5.5. Posición taxonómica de *Taeniopoda eques* y *T. centurio*

Taeniopoda eques y *T. centurio* (Figura 11) son ortópteros que se ubican en la siguiente clasificación (Cigliano *et al.*, 2017; De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017).

Phylum Arthropoda Latreille, 1829

Subphylum Hexapoda Latreille, 1825

Clase Insecta Linnaeus, 1758

Cohorte Polyneoptera Martynov, 1930

Orden Orthoptera Olivier, 1789

Suborden Caelifera Ander, 1936

Superfamilia Acridoidea MacLeay, 1821

Familia Romaleidae Pictet y Saussure, 1887

Subfamilia Romaleinae Pictet y Saussure, 1887

Tribu Romaleini Pictet y Saussure, 1887

Género *Taeniopoda* Stal, 1873

T. centurio (Drury, 1770)

T. eques (Burmeister, 1838)



Figura 11. Especies de *Taeniopoda* examinadas, a) *Taeniopoda eques* (♀+♂) (Barra=2 cm) del municipio Colón, Querétaro; b) *Taeniopoda centurio* (♀) del municipio Tlanchinol, Hidalgo (Barra=3 cm).

5.6. Reconstrucción del gen SSU rDNA y análisis de distancias genéticas

Se reconstruyeron las secuencias completas del gen SSU rDNA de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp., ambas parásitas de *Taeniopoda centurio*. Para Gregarinidae sp. parásita de *T. eques* no fue posible reconstruir el gen debido a que las muestras de DNA estaban contaminadas probablemente por endosimbiontes microsporidios del parásito (Figura 7b-c). La secuencia del gen SSU rDNA de *Amoebogregarina* sp. se reconstruyó a partir de seis lecturas de cromatogramas apiladas en contigs. La secuencia de *Quadruspinospora* sp. se reconstruyó a partir de las 12 lecturas de los cromatogramas generados en la secuenciación. Las secuencias del gen SSU rDNA de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. tuvieron una longitud de 1764 y 1766 bases respectivamente.

Los análisis de BLAST confirmaron que ambas secuencias pertenecen al phylum Apicomplexa. En las tablas 10 y 11 se muestra la distancia genética no corregida entre las secuencias de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. con respecto a las secuencias más similares depositadas en GenBank.

En la tabla 12 se muestran las distancias genéticas corregidas de las secuencias de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. basadas en el modelo evolutivo Tamura-Nei 93. La figura 12 muestra el filograma obtenido a partir del método de Neighbor-Joining.

Tabla 10. Distancia genética no corregida calculada a partir del análisis de BLAST para el gen SSU rDNA de *Amoebogregarina* sp.

Número de acceso	Distancia genética no corregida (%)	Organismo	Longitud de secuencia
FJ459737	1.3	<i>Amoebogregarina nigra</i>	1674
LN577963	8.7	Uncultured eukaryote	607
LN587753	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN587788	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN587838	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN587893	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN587951	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN588023	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN588054	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN588251	9.3	Uncultured eukaryote	610
LN575214	9.9	Uncultured eukaryote	643
LN576098	9.9	Uncultured eukaryote	643
LN575470	10	Uncultured eukaryote	644
LN575797	10.2	Uncultured eukaryote	645
LN575578	10.2	Uncultured eukaryote	643
FJ459749	11.4	<i>Gregarina tropica</i>	929
KC890798	11.5	Apicomplexa sp.	1044
JX395936	12.4	Uncultured eukaryote	828
FJ459752	12.8	<i>Leidyana erratica</i>	899
L31799	13.2	<i>Gregarina caledia</i>	1047
L31841	13.4	<i>Gregarina chortiocetes</i>	1047
FJ459746	13.5	<i>Gregarina kingi</i>	788
EF024723	14.5	Heterocapsaceae environmental	1772
FJ459741	15.3	<i>Gregarina blattarum</i>	1617
AF372806	15.9	Uncultured eukaryote	1243
AF372802	16.4	Uncultured eukaryote	1243
AF372799	16.5	Uncultured eukaryote	1242
AF372797	16.6	Uncultured eukaryote	1243
AF372798	16.6	Uncultured eukaryote	1243
AF372800	16.6	Uncultured eukaryote	1243
AF372805	16.8	Uncultured eukaryote	1243
AF372803	17.1	Uncultured eukaryote	1243
GQ330638	17.2	Uncultured Eugregarinida	1260
AF372801	17.3	Uncultured eukaryote	1243
AF372710	17.3	Uncultured eukaryote	1243
AF372804	18	Uncultured eukaryote	1243
AF372709	18.7	Uncultured eukaryote	1243

Tabla 11. Distancia genética no corregida calculada a partir del análisis de BLAST para el gen SSU rDNA de *Quadruspinospora* sp.

Número de acceso	Distancia genética no corregida (%)	Organismo	Longitud de secuencia
EF024116	3.2	Cryptosporidiidae environmental	1761
EF024963	3.3	Cryptosporidiidae environmental	1760
EF024809	3.3	Eimeriidae environmental	1761
EF024338	3.3	Eimeriidae environmental	1761
EF024673	3.4	Eimeriidae environmental	1759
EF024471	3.4	Cryptosporidiidae environmental	1760
EF024351	3.4	Eimeriidae environmental	1760
EF024347	3.4	Eimeriidae environmental	1761
EF024102	3.4	Cryptosporidiidae environmental	1699
EF024130	3.5	Cryptosporidiidae environmental	1761
EF024388	3.5	Eimeriidae environmental	1760
EF024769	3.6	Cryptosporidiidae environmental	1410
EF024744	3.6	Eimeriidae environmental	1761
EU910605	4	Uncultured alveolate	1739
EF024957	4.8	Eimeriidae environmental	1764
AY179988	5.7	Uncultured alveolate	1767
AY821921	5.7	Uncultured eugregarine	1694
LC109003	5.9	Uncultured eukaryote	1764
HE655224	7.4	Uncultured apicomplexan	832
AF372777	7.5	Uncultured eukaryote	1252
DQ176427	8.2	Syncystis mirabilis	1761
AY689716	8.2	Uncultured alveolate	854
DQ462458	8.4	<i>Ascogregarina</i> sp.	937
EF024808	8.5	Eimeriidae environmental	1772
AF457127	9.1	<i>Monocystis agilis</i>	1766
EF024897	9.2	Oxytrichidae environmental	1035
EF024174	9.4	Eimeriidae environmental	1762
EF024223	9.8	Oxytrichidae environmental	1035
EF024854	9.8	Eimeriidae environmental	1759
EF024539	9.9	Eimeriidae environmental	1768
EF100363	10.6	Uncultured eukaryote	1199
AY334569	10.9	<i>Mattesia</i> sp.	1038
EF100358	11	Uncultured eukaryote	1199
GU320208	11.1	<i>Gregarina ctenocephali</i>	1766
AF129883	11.2	<i>Ophriocystis elektroscirrha</i>	1037
FJ459756	11.7	<i>Prismatospora evansi</i>	1694
EF100319	12	Uncultured eukaryote	1432

Tabla 12. Distancia genética del marcador SSU rDNA de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. basada en el modelo Tamura-Nei (1993)

Número de Acceso de GenBank	Organismo	% distancia genética (modelo Tamura-Nei) con respecto a <i>Amoebogregarina</i> sp.	% distancia genética (modelo Tamura-Nei) con respecto a <i>Quadruspinospora</i> sp.
AF022194	<i>Gymnodinium fuscum</i>	28.3	20.5
AF093489	<i>Cryptosporidium parvum</i>	28.7	21.8
AF093499	<i>Cryptosporidium serpentis</i>	28.5	20.8
AF494059	<i>Adelina bambarooniae</i>	29.6	21.2
AH008869	<i>Monocystis agilis</i>	47.4	11.6
U11440	<i>Cryptosporidium wrairi</i>	28.7	21.7
L19068	<i>Cryptosporidium baileyi</i>	28.7	21.8
L19069	<i>Cryptosporidium muris</i>	28.8	21.1
EU670240	<i>Lankesteria chelyosomae</i>	36.9	35.5
FJ459737	<i>Amoebogregarina nigra</i>	1.4	31.7
FJ459740	<i>Gregarina basiconstrictonea</i>	32.3	38.6
FJ459741	<i>Gregarina blattarum</i>	20.6	29.8
FJ459742	<i>Gregarina cloptoni</i>	32.2	35.3
FJ459743	<i>Gregarina coronata</i>	27.9	33.8
FJ459744	<i>Gregarina cuneata</i>	35.6	40.4
FJ459745	<i>Gregarina diabrotica</i>	27.0	33.0
FJ459746	<i>Gregarina kingi</i>	27.3	35.0
FJ459747	<i>Gregarina niphandrodes</i>	32.9	37.5
FJ459748	<i>Gregarina polymorpha</i>	33.0	37.5
FJ459749	<i>Gregarina tropica</i>	20.2	27.9
FJ459750	<i>Hoplorhynchus acanthatholius</i>	30.7	21.7
FJ459751	<i>Gregarina cubensis</i>	34.6	38.8
FJ459752	<i>Leidyana erratica</i>	27.4	34.2
FJ459753	<i>Leidyana haasi</i>	28.9	34.8
FJ459754	<i>Leidyana migrator</i>	28.6	34.8
FJ459755	<i>Paraschneideria metamorphosa</i>	30.5	16.5
FJ459756	<i>Prismatospora evansi</i>	31.8	12.8
FJ459757	<i>Protomagalhaensia granulosa</i>	39.0	41.9
FJ459758	<i>Protomagalhaensia wolffi</i>	34.3	38.4
FJ459759	<i>Pyxinia crystalligera</i>	39.5	38.2
FJ459760	<i>Stenophora robusta</i>	34.2	32.9
FJ459761	<i>Stylocephalus giganteus</i>	29.0	18.0
FJ459762	<i>Xiphocephalus ellisi</i>	29.2	18.0
FJ459763	<i>Xiphocephalus triplogemmatum</i>	32.1	21.1
FJ976721	<i>Ganymedes themistos</i>	44.6	45.5
GU320208	<i>Gregarina ctenocephali</i>	29.9	12.5

JF264837	<i>Lankesteria chelyosomae</i>	37.0	35.6
JF264840	<i>Lankesteria cystodytae</i>	36.7	35.4
JF264884	<i>Lecudina cf. tuzetae</i>	38.4	35.8
JF264885	<i>Lecudina cf. tuzetae</i>	38.4	35.8
JX426617	<i>Trichotokara japonica</i>	44.2	44.5
JX426618	<i>Trichotokara eunicae</i>	45.2	45.0
KJ736741	<i>Gregarina ormierei</i>	30.1	35.1
KR024700	<i>Lankesteria hesperidiiformis</i>	38.2	36.1
KR024702	<i>Lankesteria hesperidiiformis</i>	38.2	36.3
KR868712	<i>Urospora ovalis</i>	37.6	35.8
KR868713	<i>Urospora travisiae</i>	38.4	36.3
KU238664	<i>Ascogregarina culicis</i>	32.6	15.9
KU664395	<i>Stylocephalus gigas</i>	28.0	16.7
KU664396	<i>Gregarina sp.</i>	33.4	36.2
KU726617	<i>Ganymedes yurii</i>	50.0	49.1
KX982503	<i>Ancora sagittata</i>	30.9	25.1
KY697695	<i>Enterocystis dorypterygis</i>	31.1	37.5
LN901450	<i>Lecudina tuzetae</i>	36.8	34.1
TOXRRNA	<i>Toxoplasma gondii</i>	29.4	21.6

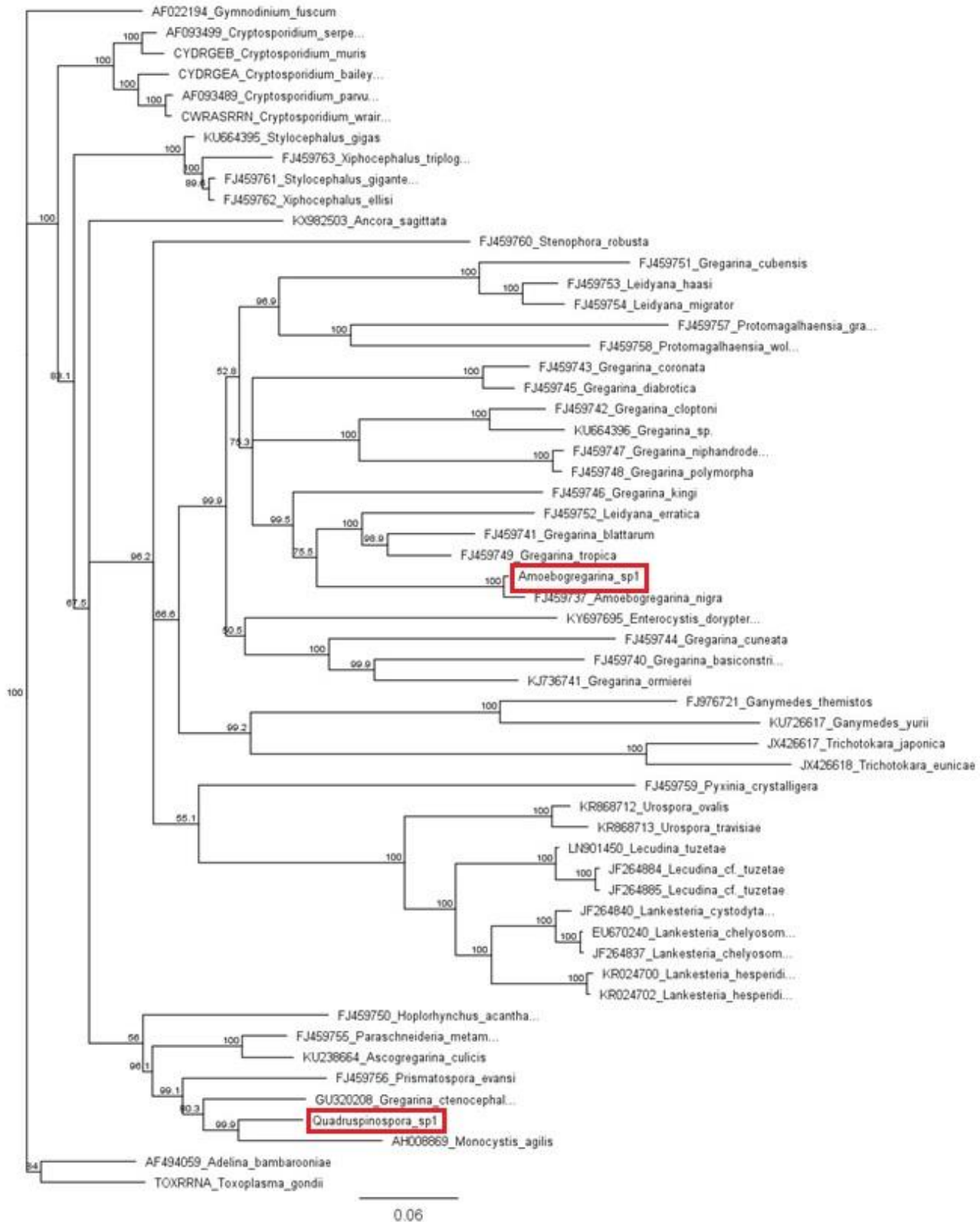


Figura 12. Filograma obtenido a partir del método de Neighbor-Joining, basado en distancias genéticas utilizando el modelo evolutivo Tamura-Nei 93 con un soporte de bootstrap de 10,000 réplicas.

6. Discusión

6.1. Taxonomía

En México, el sistema gregarina-insecto ha sido documentado solamente en mosquitos de la especie *Aedes albopictus* (Zurita-Ramón, 1969), mariposas monarcas (Leong *et al.*, 1997) y ortópteros de las especies *Gryllus assimilis* y *Conocephalus ictus* (Zurita-Ramón, 1969; Medina-Durán, 2016). Las especies de ortópteros en donde previamente se había registrado la presencia de gregarinas pertenecen al suborden Ensifera, por lo que este estudio contribuye con los primeros registros de estos parásitos infectando a ortópteros del suborden Caelifera en el país.

Amoebogregarina sp. se encontró parasitando a *Taeniopoda centurio* y representa el primer registro del género para México. Otras especies de *Amoebogregarina* han sido registradas previamente para ortópteros de las familias Acrididae y Pyrgomorphidae, y están distribuidas tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo (Desportes, 2013). *Quadruspinospora* sp. también se encontró infectando a *T. centurio*. Las especies del género *Quadruspinospora* han sido descritas previamente solo para Japón e India, por lo que su identificación en *T. centurio* representa el primer registro para el continente americano. La especie Gregarinidae sp. corresponde al primer registro de una gregarina parasitando a *T. eques*.

En los ortópteros estudiados en México se han registrado 17 especies de gregarinas, todas pertenecientes al orden Eugregarinida. Trece de las 17 especies fueron documentadas en el trabajo de Zurita-Ramón (1969), una especie fue identificada por Medina-Durán (2016), y las tres especies restantes corresponden a los nuevos registros del presente trabajo. Zurita-Ramón (1969) basó su identificación en caracteres morfológicos y datos morfométricos de los gamontes; estos caracteres en la actualidad se consideran ambiguos para la identificación de especies debido a que la variabilidad intraespecífica en la morfología y talla de los trofozoítos puede ser muy alta (Levine,

1988; Clopton, 2002, 2009; Rueckert *et al.*, 2011b; Desportes, 2013). Medina-Durán (2016) utilizó para la identificación de las gregarinas caracteres morfológicos de todas las etapas de su ciclo de vida, sin embargo, no incluyó datos moleculares para corroborar la misma.

En los trabajos taxonómicos de gregarinas más recientes se ha argumentado la necesidad de utilizar tanto caracteres morfológicos como moleculares para delimitar las especies (Rueckert, 2011a, 2011b). En este estudio, el uso de caracteres morfológicos tradicionales y la información molecular proveniente del gen SSU rDNA proporcionaron una descripción integral y robusta que permitió delimitar a las especies utilizando las discrepancias morfológicas interespecíficas y la distancia genética del marcador molecular empleado.

La presencia de gregarinas en las especies del género *Taeniopoda* estudiadas en este trabajo mostró que esta asociación puede ser recurrente y estar presente en el resto de las especies del género. Johny y Whitman (2005) registraron a la eugregarina *Boliviana floridensis* en el ortóptero *Romalea microptera* en Florida, EUA. Este huésped está muy cercanamente emparentado con los ortópteros del género *Taeniopoda*, y recientemente se encontró que el clado que incluye a las especies del género *Taeniopoda* es parafilético con respecto al género monotípico *Romalea*, por lo que se ha sugerido que las especies de *Taeniopoda* son en realidad otras especies de *Romalea* que especiaron por procesos vicariantes dados por la compleja orografía de México (De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017, 2019 en prensa). El hecho de que *Romalea* y *Taeniopoda* pertenezcan a un mismo género implicaría que existen al menos tres géneros de gregarinas (*Amoebogregarina*, *Boliviana* y *Quadruspinospora*) parasitando este grupo de saltamontes, por lo tanto es plausible que en un solo género de huéspedes se presente una alta diversidad de gregarinas, y esta pueda ser explicada por procesos de coevolución vicariante dados por sus huéspedes (Clopton, 2009).

En el saltamontes *T. centurio*, *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. fueron determinadas a nivel genérico utilizando los caracteres morfológicos y morfométricos de las diferentes etapas de su ciclo de vida. En ambas especies la determinación específica no fue posible ya que presentaron diferencias con respecto a las especies previamente descritas (Tabla 2 y 4). Por ejemplo, en el caso de *Amoebogregarina* sp. la comparación morfológica con la especie tipo *A. nigra* mostró diferencias principalmente en la forma del epimerito y protomerito, y la talla de los trofozoítos. Por otro lado, para *Quadruspinospora* sp., los principales caracteres que la distinguen del resto de las especies previamente descritas son la forma del epimerito y la talla de los gamontes, los cuales son de una talla considerablemente menor (Tabla 4).

Para el caso del saltamontes *T. eques*, la gregarina fue identificada dentro de la familia Gregarinidae ya que se observaron caracteres como asociaciones caudofrontales y la dehiscencia de los gametoquistes que ocurrió a través de esporoductos y ooquistes liberados en cadena de tipo monete. Sin embargo, para la identificación a nivel de género y especie, uno de los caracteres más informativos es la forma del epimerito (Clopton, 2002; Desportes, 2013), el cual no pudo ser observado ya que no se encontraron trofozoítos parasitando al huésped. A pesar de lo anterior, en algunas células de Gregarinidae sp. se encontraron estructuras parecidas a las reminiscencias de los epimeritos que se observan durante su proceso de asimilación (Figura 7b-c, e), en donde se observa un septo en la parte apical del contenido citoplasmático del protomerito. Estas mismas estructuras fueron también observadas en los gamontes maduros de *Amoebogregarina* sp. parásita de *T. centurio*, lo cual podría indicar que Gregarinidae sp. también pertenece al género *Amoebogregarina*.

6.2. Consideraciones taxonómicas del género *Amoebogregarina*

El género *Amoebogregarina* Kula & Clopton, 1999, se estableció para las gregarinas en las que el epimerito es asimilado dentro del protomerito después de que los trofozoítos se liberan del epitelio intestinal del huésped (Clopton, 2002; Desportes, 2013; Kula y Clopton, 1999). La especie *Amoebogregarina nigra* (= *Gregarina nigra*), descrita parasitando al ortóptero *Melanoplus differentialis* (Acrididae) fue establecida como la especie tipo del género. En la actualidad se reconocen cinco especies dentro del género *Amoebogregarina* (Tabla 2). Tres de estas especies, *A. nigra*, *A. ampulla* y *A. dhawanii*, son exclusivas de ortópteros de las familias Acrididae y Pyrgomorphidae, ambas pertenecientes al suborden Caelifera. Las dos especies restantes, *A. crenata* y *A. nymphaea*, han sido descritas como parásitas de coleópteros de la familia Chrysomelidae. De las tres especies de *Amoebogregarina* descritas en ortópteros, *A. ampulla* y *A. dhawanii* tienen una distribución restringida y solo se han registrado en Argentina e India, respectivamente. Por el contrario, *A. nigra* tiene una mayor distribución (Estados Unidos, Papua Nueva Guinea, Tailandia, Sudáfrica, República Democrática del Congo, Costa de Marfil y Senegal), sin embargo, la mayoría de las identificaciones de *A. nigra* están basadas en descripciones ambiguas de los trofozoítos y gamontes hechas con esquemas y no muestran micrografías de los individuos (Seck & Toguebaye, 1995; Semans, 1943; Théodorides *et al.* 1972, 1975).

6.3. Consideraciones taxonómicas del género *Quadruspinospora*

El género *Quadruspinospora* Sarkar & Chakravarty, 1969 se caracteriza por poseer trofozoítos solitarios con epimeritos subesféricos con procesos digitiformes y esporas elipsoidales u ovoides que presentan espinas polares y son liberadas por la ruptura simple de los gametoquistes. La especie *Coronoepimeritus japonicus* descrita por Hoshide (1958) parasitando a *Locusta migratoria*, *Oedaleus infernalis*, *Oxya japonica* y *O. velox* (Orthoptera: Acrididae) es la especie tipo del género

(Clopton, 2002; Desportes, 2013; Sarkar y Chakravarty, 1969). El género *Quadruspinospora* incluye 14 especies (Tabla 4), todas parásitas de ortópteros del suborden Caelifera, dentro de las familias Acrididae, Pyrgomorphidae y Tetrigidae (Desportes, 2013; Yumnam y Mohilal, 2017). Trece de las 14 especies de este género han sido descritas en India y una (*Q. japonicus*) fue descrita en Japón.

6.4. Distancias genéticas corregidas y no corregidas del gen SSU rDNA

Para el caso de las especies del género *Amoebogregarina*, la única secuencia genética disponible corresponde a la de la especie tipo *A. nigra* (número de acceso FJ459737). Tanto la distancia genética no corregida en el análisis de BLAST, como la distancia corregida con el modelo Tamura-Nei (1993) situó a la secuencia de *A. nigra* como la más cercana a la secuencia de *Amoebogregarina* sp., con una similitud del 98.7% y 98.6% respectivamente, lo cual sustenta la identificación morfológica en el género. Aunque la secuencia de *Amoebogregarina* sp. y de *A. nigra* son muy similares, con una distancia genética no corregida del 1.3% y corregida de 1.4% ambas especies presentan diferencias morfológicas marcadas que, sumadas a las discrepancias en el huésped y su distribución, apoyan que *Amoebogregarina* sp. es una especie distinta.

Para el caso de *Quadruspinospora* sp., hasta el momento no existe otra secuencia disponible de una especie dentro de este género en ninguna base de datos. En el análisis de BLAST, la secuencia de *Quadruspinospora* sp. fue similar (similitud > 96.5%) a varias secuencias ambientales identificadas dentro de la familia Cryptosporidiidae y Eimeriidae. Ambas familias pertenecen a grupos distantes con respecto de eugregarinas por lo que estas secuencias pueden estar mal identificadas, lo cual es común que ocurra en secuencias ambientales de eucariontes, de acuerdo con Berney *et al.* (2004). La secuencia de *Quadruspinospora* sp. presentó la menor distancia genética no corregida con las secuencias de gregarinas pertenecientes a las especies *Syncystis mirabilis* (8.2%), *Ascogregarina* sp. (8.4%), *Monocistys agilis* (9.1%), *Matessia* sp. (10.9%),

Gregarina ctenocephali (11.1%) y *Prismatospora evansi* (11.7%). De forma similar, la distancia genética corregida fue menor en las especies de gregarinas *Monocystis agilis* (11.6%), *Prismatospora evansi* (12.8%), *Stylocephalus gigas* (16.7%), *Ascogregarina culicis* (15.9%), *Gregarina ctenocephali* (12.5%), *Xiphocephalus ellisi* (18%), *Stylocephalus giganteus* (18%) y *Paraschneideria metamorphosa* (16.5%). Todas las especies mencionadas previamente parasitan insectos salvo *M. agilis* que infecta a anélidos, y todas las especies pertenecen al orden Eugregarinida (*S. mirabilis* y *Matessia* sp. son consideradas neogregarinas, que en la actualidad son un grupo dentro del orden Eugregarinida) (Simdyanov *et al.*, 2017). Las especies de gregarinas con las que se agrupó *Quadruspinospora* sp. incluyen especies con septo (*Xiphocephalus ellisi*, *G. ctenocephali*, *Stylocephalus gigas*, *S. giganteus* y *P. evansi*) y sin septo (*S. mirabilis* y *Ascogregarina* sp., *A. culicis*, *M. agilis*, *Paraschneideria metamorphosa* y *Matessia* sp.), a pesar de que no se incluyen análisis filogenéticos de las secuencias en el presente estudio, se puede inferir que tanto las gregarinas con septo, como las que carecen de él, son genéticamente cercanas y por lo tanto se corrobora que el septo no es un carácter taxonómico útil para clasificar a las eugregarinas (Rueckert *et al.* 2011a; Cavalier-Smith, 2014; Simdyanov *et al.*, 2017).

6.5. El gen SSU rDNA como marcador molecular complementario en la identificación de gregarinas

Las descripciones más recientes de gregarinas se han realizado en las que habitan en huéspedes marinos (p. ej. Rueckert y Leander 2010; Rueckert *et al.* 2010, 2015; Wakeman y Leander 2013; Diakin *et al.* 2017; Iritani *et al.* 2017; Wakeman *et al.* 2018). En las descripciones más recientes se incluyó información molecular proveniente principalmente del gen SSU rDNA, el cual ha mostrado ser útil en la delimitación de especies de gregarinas muy cercanamente emparentadas (Wakeman y Leander 2013). Por otro lado, las descripciones de gregarinas terrestres, en donde la mayoría de las especies han sido descritas para insectos, han recibido menos atención. La mayoría de las

descripciones de las eugregarinas que parasitan insectos se han basado solo en caracteres morfológicos provenientes de algunas de las fases del ciclo de vida del parásito, documentadas en imágenes de microscopía de luz y esquemas (p. ej. Bhatia y Setna 1924; Semans, 1943; Théodorides *et al.*, 1958, 1972, 1975). En los trabajos más antiguos, las descripciones consideraban caracteres ambiguos, lo cual ha contribuido a que la diversidad de eugregarinas esté subestimada. El uso de información molecular en las eugregarinas, en conjunto con datos morfológicos, es importante debido a que puede ayudar a discriminar a las especies, e identificar especies crípticas o con evolución convergente (Adl *et al.* 2007; Wakeman y Leander 2013), sin embargo, en la actualidad los trabajos que han utilizado tanto evidencia morfológica como molecular para la descripción de la diversidad de las eugregarinas terrestres son escasos (Leander *et al.* 2003; Clopton, 2009; Lantová *et al.* 2010; Rueckert y Devetak 2017). En este trabajo se contribuyó con el estudio de la diversidad de las gregarinas parásitas de insectos aportando los primeros datos moleculares provenientes del gen SSU rDNA de eugregarinas en México. Además de la información morfológica obtenida, la nueva información molecular pudo ser comparada con otras secuencias disponibles de gregarinas, lo que permitió identificaciones más robustas para el caso de las eugregarinas encontradas en *T. centurio*. Por el contrario, en *T. eques* la información morfológica recabada no fue suficiente para la identificación a nivel de especie o género, y además la secuenciación del gen SSU rDNA no fue posible debido a la contaminación del DNA extraído, por lo que la especie de eugregarina encontrada no pudo ser identificada más allá del nivel de familia, sin embargo, se corrobora la presencia de una sola especie de gregarina en *T. eques*, que muy probablemente está relacionada con el género *Amoebogregarina*.

6.6. Prevalencia e intensidad de las gregarinas

Los valores de prevalencia e intensidad de las gregarinas identificadas en *T. centurio* y *T. eques* fueron distintas (Tablas 6-9, Figuras 9 y 10). En *T. eques* los valores de prevalencia e intensidad

siempre fueron mayores que en *T. centurio*. Las diferencias en estos indicadores parasitológicos pueden deberse a los tipos de ambientes en los que habita cada huésped. *Taeniopoda centurio* se ha registrado en la Sierra Madre Oriental, en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla, asociado a bosques subhúmedos y húmedos (Hebard, 1924; De Jesús-Bonilla *et al.*, 2017). En el municipio de Tlanchinol, Hidalgo, los climas predominantes son semicálido húmedo y templado húmedo, y la vegetación nativa predominante es el bosque mesófilo de montaña (INEGI, 2009b). Por el contrario, *T. eques* se encuentra distribuido predominantemente en la meseta central de México, y en el sitio de estudio (Colón, Querétaro), el clima predominante es semiseco templado y la vegetación predominante es matorral xerófilo (INEGI, 2006). Los climas en donde habitan los huéspedes pueden explicar las diferencias en la prevalencia e intensidad de las gregarinas ya que trabajos como los de Semans (1941), Sienkiewicz y Lipa (2009) y Scherével y Desportes (2013b) concluyeron que los sitios con vegetación más abundante y mayor humedad son más favorables para la infección con gregarinas por parte de los insectos. Otros factores que pueden incidir en los valores de prevalencia e intensidad son la extensión de las áreas abiertas en donde habitan los huéspedes y la distancia de la vegetación primaria. En el estudio de Taylor y Merriam (1996) se encontró una correlación positiva entre la distancia de la vegetación primaria y los valores de prevalencia e intensidad de los insectos estudiados. Si bien en el presente trabajo no se investigaron las variables ambientales que pudieron incidir en los valores de prevalencia e intensidad de las gregarinas en los huéspedes examinados, los resultados obtenidos se ajustan a las observaciones documentadas previamente en estudios parasitológicos de las gregarinas que parasitan insectos.

En relación con las diferencias en los valores de prevalencia de infección entre machos y hembras, se encontró que en el caso de las gregarinas de *T. centurio*, los machos estuvieron más parasitados que las hembras. Por el contrario, las gregarinas que se encontraron en *T. eques* fueron

ligeramente más prevalentes en las hembras. Zuk (1987), Córdoba-Aguilar y Munguía-Steyer (2013) y Gray (1998) concluyeron que los machos están significativamente más parasitados que las hembras, y Sheridan *et al.* (2000), Poulin y Forbes (2012) no encontraron patrones patrones definidos en el sesgo sexual de las infecciones parasíticas de artrópodos. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el sesgo sexual de la prevalencia en ninguno de los casos. Con los datos disponibles en relación con las infecciones de gregarinas en insectos es todavía complicado definir si la idea del “sexo más enfermizo” que fue introducida por Zuk (2009) y propone que los machos son más propensos en desarrollar enfermedades que las hembras debido a que ambos sexos asignan recursos de manera diferencial con el fin de aumentar su adecuación, puede aplicarse de igual forma en artrópodos.

7. Conclusiones

- Se identificaron a las especies *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp., las cuales están lejanamente relacionadas, coinfectando el tracto digestivo del saltamontes *Taeniopoda centurio*
- Para el caso de *T. eques* se identificó a la especie Gregarinidae sp. infectando su tracto digestivo.
- El registro de *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. representan el primer registro para ortópteros de la familia Romaleidae y los primeros registros de gregarinas en ortópteros del suborden Caelifera en México.
- *Amoebogregarina* sp. representa el primer registro de una especie del género para México.
- *Quadruspinospora* sp. representa el primer registro para América.
- Para las especies de gregarinas parasitando a *T. centurio* se obtuvo la secuencia del gen SSU rDNA y se encontró que para el caso de la secuencia de *Amoebogregarina* sp. la especie con la menor distancia genética fue *A. nigra*. Para el caso de *Quadruspinospora* sp., la especie con la menor distancia genética fue *Primatospora evansi*.
- La secuencia de *Quadruspinospora* sp. es la primera obtenida para este género.
- En el caso de Gregarinidae sp. no fue posible identificar el género o la especie debido a que no se observaron trofozoítos en los huéspedes. Asimismo, no fue posible obtener su secuencia génica debido a que el DNA extraído estaba contaminado probablemente por endosimbiontes en las células de los parásitos.
- De acuerdo con la información morfológica y molecular de las eugregarinas de *T. centurio*, se sugiere que *Amoebogregarina* sp. y *Quadruspinospora* sp. son dos nuevas especies.

- Los valores de prevalencia e intensidad de *T. centurio* fueron mayores que las de *T. eques* y dichos valores pueden estar dados por el tipo de ambiente en el que habita cada huésped.
- No se encontró sesgo sexual en los valores de prevalencia en ambas especies de ortópteros.

8. Referencias

Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G. B., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Farmer, M. A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C. E., Lodge, D. J., Mann, D. G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Smirnov, A. V. y Spiegel, F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic biology*. 56: 684–689.

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. y Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59(5): 429-493.

Aguilar-López, M., Rojas-Martínez, A. E., Cornejo-Latorre, C., Vite-Silva, V. D. & Ruano-Escalante, Y. R. 2013. Lista taxonómica y estructura del ensamblaje de los mamíferos terrestres del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Mastozoología Neotropical*. 20(2): 229-242.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410

Barajas de Lopez, E. 1967. *Monocystis agilis* Stein (Protozoa, Sporozoa), entozoico de *Allolobophora longa* Ude, 1888 (Annelida, Oligochaeta) colectados en Mexico, D. F. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 27: 29–36.

Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P. y Cowman, A. F. 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature Reviews, Microbiology*. 4: 621–628

- Belton, P. y Grundfest, H. 1962. Potassium activation and K spikes in muscle fibers of mealworm larva (*Tenebrio molitor*). *American Journal of Physiology*. 203: 588–594.
- Berney, C., Fahrni, J. y Pawlowski, J. 2004. How many novel eukaryotic “kingdoms”? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys. *BMC Biology*. 2: 1-13.
- Bhatia, B. L. y Setna, S. 1924. On some new cephaline gregarines. *Parasitology*. 16(3): 279-288.
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. 2003. Invertebrates. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 934 pp.
- Burki, F. 2014. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*. 6(5): a016147.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M. y Shostak, A. W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*. 83(4): 575-583.
- Caceres-Martinez, J., Vasquez-Yeomans R. y Padilla-Lardizabal, G. 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 22: 141–151.
- Carreno, R. A., Martin, D. S. y Barta, J. R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*. 85: 899-904.
- Cavalier-Smith, T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 347–366.

Cavalier-Smith, T. 2014. Gregarine site-heterogeneous 18s rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*. 50: 472-495.

Chakravarty, M. M. 1960. Systematic position of some genera and classification of the suborder Cephalina Delage and Hérouard. *Proceedings of the Zoological Society of Calcutta*. 12: 71-81.

Chakraborty, N. & Haldar, D. P. 1975. Morphology and life history of a new cephaline gregarine from a grasshopper. *Proc. Ind. Sci. Congo*. 3: 51-52.

Chantangsi, C. y Leander, B. S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four novel genera and nine novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1962-1977.

Cigliano, M. M., Braun, H., Eades, D. C. y Otte, D. 2017. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. Accedido el 25 de noviembre de 2017 de <http://Orthoptera.SpeciesFile.org>.

Clopton, R. E. 1998. Gregarine protocol manual. Peru State College, Peru, Nebraska. National Science Foundation grant NSF9705179. 29 pp.

Clopton, R. E. 2002. Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Léger, 1900. En: Lee, J. J., Leedale, G., Patterson, D. y Bradbury, P. C. (Eds.). *Illustrated Guide to the Protozoa*. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. pp. 205-288.

Clopton, R. E. 2004. Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology*. 71(2): 130-140.

Clopton, R. E. 2009. Phylogenetic relationships, evolution and systematic revision of the septate gregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida: Septatorina). *Comparative Parasitology*. 76(2): 167-190.

Clopton, R. E. y Lucarotti, C. J. 1997. *Leidyana canadensis* N. Sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) from larval Eastern hemlock looper, *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44(5): 383-387.

Córdoba-Aguilar, A. y Munguía-Steyer, R. 2013. The sicker sex: Understanding male biases in parasitic infection, resource allocation and fitness. *Plos One*. 8(10): 1-15

Criado, A., Martínez, J., Buling, A., Barba, J. C., Merino, S., Jefferies, R. e Irwin, P. J. 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*. 142: 238–247.

Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M. A., Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J. C. 2004. The “expanding universe” of piroplasms. *Veterinary Parasitology*. 119: 337–345.

Datta, S. C., Gosh, S. y Haldar, D. P. 1990. Studies in septate gregarines (Apicomplexa: Sporozoa) from orthopteran insects of West Bengal: seven new species of *Didymophyes*, *Hirmocystis* and *Quadruspinospora*. *Records of the Zoological Survey of India*. 87(3): 227-247.

De Jesús-Bonilla, V. S., Barrientos-Lozano, L. y Zaldívar-Riverón, A. 2017. Sequence-based species delineation and molecular phylogenetics of the transitional Nearctic-Neotropical grasshopper genus *Taeniopoda* (Orthoptera: Romaleidae). *Systematics and Biodiversity*. 15(6): 1-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2017.1313792>

De Jesús-Bonilla, V. S. 2019. 3RAD-based systematics of the transitional Neartic-Neotropical lubber grasshopper genus *Taeniopoda* (Orthoptera: Romaleidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. En prensa.

Desportes, I. 2013. Systematics of terrestrial and fresh water gregarines. En: Desportes, I. y Schrével, J. (Eds.). *Treatise on Zoology – Anatomy, taxonomy, biology: The gregarines, the early branching Apicomplexa*. 2. Brill. Leiden, Holanda. pp. 377-671.

Diakin, A., Wakeman, K. C. y Valigurová, A. 2017. Description of *Ganymedes yurii* sp. n. (Ganymedidae), a new gregarine species from the antarctic amphipod *Gondogeneia* sp. (Crustacea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 64: 56-66.

Dubremetz, J. F., García-Réguet, N., Conseil, V. y Fourmaux, M. N. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal of Parasitology*. 28: 1007-1013.

Fayer, R. 1980. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. *Veterinary Parasitology*. 6: 75-103.

Feigenbaum, D. L. 1975. Parasites of the commercial shrimp *Penaeus vannamei* Boone and *Penaeus brasiliensis* Latreille. *Bulletin of Marine Science*. 25(4): 491-514.

Fontana, P., Buzzetti, F. M. y Mariño-Pérez, R. 2008. Grasshoppers, locusts, crickets & katydids of Mexico. Photographic guide. WBA Handbooks, 1, Verona, Italia. 272 pp.

Forbes, M., Mlynarek, J. J., Allison, J. y Hecker, K. R. 2011. Seasonality of gregarine parasitism in the damselfly, *Nehalennia irene*: understanding unimodal patterns. *Parasitology Research*. 110(1): 245-250.

Gao, F., Warren, A., Zhang, Q., Gong, J., Miao, M., Sun, P., Xu, D., Huang, J., Yi, Z. y Song, W. 2016. The all-data-based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). *Scientific Reports*. 6: 24874.

Gray, D. A. 1998. Sex differences in susceptibility of house crickets, *Acheta domesticus*, to experimental infection with *Serratia liquefaciens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 288-289

Grimaldi, D. y Engel, M. S. 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press, New York, USA. 755 pp.

Guzmán-Sáenz, F. M., Pérez-Castañeda, R., Gutiérrez-Salazar, G., González-Alanís, P., Hernández-Acosta, M. y Sánchez-Martínez, J. G. 2014. Impacto de la parasitosis por gregarinas (*Nematopsis* sp.) en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Ra Ximhai, revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. 10(6): 1-8.

Haldar, D. P. y Chakraborty, N. 1976. Observations on the morphology and life-history of three new species of cephaline gregarines (Protozoa: Sporozoa) from grasshoppers in West Bengal. *Proceedings of the Zoological Society of Calcutta*. 29: 73-81.

Haldar, D. P. y Chakraborty, N. 1978. A new cephaline gregarine (Protozoa: Sporozoa) from a grasshopper. *Indian Journal of Zoology*. 6(1): 43-47.

Hall, D. W. y Hostettler, N. 1993. Septate gregarines from *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40(1): 29-33.

Hebard, M. 1924. A revision of the Genus *Taeniopoda* (Orthoptera, Acrididae, Cyrtacanthacrinae). *Transactions of the American Entomological Society*. 50: 253-274.

Heger, T. J., Pawlowski, J., Lara, E., Leander, B. S., Todorov, M., Golemansky, V. y Mitchell, E. A.D. 2011. Comparing potential COI and SSU rDNA barcodes for assessing the diversity and phylogenetic relationships of Cyphoderiid testate amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist*. 162:131–141

Hoshide, H., 1958. Studies on the cephaline Gregarines of Japan. II. 3. Description of the members belonging to the families Didymophyidae, Actinocephalidae, Acanthosporidae, Stylocephalidae, Dactylophoridae. *Bulletin of the Faculty of Education, Yamaguchi University*. 8: 35–101.

INEGI. 2006. Colón, Querétaro de Arteaga: cuaderno estadístico municipal 2006. Consultado el 12 de octubre de 2018 en http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bviniegi/productos/historicos/2104/702825937539/702825937539_2.pdf

INEGI. 2009a. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Colón, Querétaro. Clave geodésica 22005. Consultada el 13 de noviembre de 2017 en http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/22/22005.pdf.

INEGI. 2009b. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tlanchinol, Hidalgo. Consultada el 13 de noviembre de 2017 en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/Mexicocifras /datos-geograficos/13/13073.pdf>.

Iritani, D., Wakeman, K. C. y Leander, B. S. 2017. Molecular phylogenetic positions of two new marine gregarines (Apicomplexa) – *Paralecudina anankea* n. sp. and *Lecudina caspera* n. sp. – from the intestine of *Lumbrineris inflata* (Polychaeta) show patterns of co-evolution. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 65:211-219.

Jardón-Pérez, E. 2003. Identificación de gregarinas (Protozoa: Sporozoa) en el aparato digestivo de camarones peneidos del Estado de Nayarit. Tesis de licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 61 pp.

Johny, S. y Whitman, D. W. 2005. Description and laboratory biology of *Boliviana floridensis* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) parasitizing the eastern lubber grasshopper, *Romalea microptera* (Orthoptera: Romalidae), from Florida, U.S.A. *Comparative Parasitology*. 72(2): 150-156.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. y Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649.

Kula, R. R. y Clopton, R. E. 1999. *Amoebogregarina nigra* n. gen., n. comb. (Apicomplexa: Gregarinidae) from adult *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) in Southeastern Nebraska. *Journal of Parasitology*. 85(2): 321-325.

Kundu, T. K. y Haldar, D. P. 1983. Observation on a new species of cephaline gregarine of the genus *Quadruspinospora* Sarkar and Chakravarty, 1969 from a grasshopper, *Spathosternum prasiniferum prasiniferum*. *Archiv für Protistenkunde*. 127: 97-102.

Lange, C. E. y Cigliano, M. M. 2004. The life cycle of *Leidyana ampulla* sp. n. (Apicomplexa: Eugregarinorida: Leidyaniidae) in the grasshopper *Ronderosia bergi* (Stal) (Orthoptera: Acrididae: Melanoplineae). *Acta Protozoologica*. 43(1): 81-87.

- Lange, C. E. y Wittenstein, E. 2002. The life cycle of *Gregarina ronderosi* n. sp. (Apicomplexa: Gregarinidae) in the Argentine grasshopper *Dichroplus elongates* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 79: 27-36.
- Lantová, L., Gosh, K., Svobodová, M., Braig, H. R., Rowton, E., Weina, P., Volf, P. y Votýpka, J. 2010. The life cycle and host specificity of *Psychodiella sergenti* n. sp. and *Ps. tobbi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) in sand flies *Phlebotomus sergenti* and *Ph. Tobbii* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 105: 182-189
- Leander, B. S. 2008. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? *Trends in Parasitology*. 24(2): 60-67.
- Leander, B. S. y Keeling, P. J. 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 395-402.
- Leander, B. S., Clopton, R. E. y Keeling, P. J. 2003. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 345-354.
- Lee, J. J., Small, E. B., Lynn, D. H. y Bovee, E. C. 1985. Some techniques for collecting, cultivating and observing protozoa. En: Lee, J. J., Hutner, S. H. y Bovee, E. C. (Eds.). *A Guide to the Protozoa*. Society of Protozoologist. Lawrence, Kansas, U.S.A. pp. 1-7.
- Leong, K. L. H., Yoshimura, M. A. y Kaya, H. K. 1997. Occurrence of a neogregarine protozoan *Ophryocystis elektroscirrha* McLaughlin and Myers, in populations of monarch and queen butterflies. *Pan-Pacific Entomologist*. 73(1): 49-51.
- Levine, N. D. 1988. The protozoan phylum Apicomplexa. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 203 pp.

Lipa, J. J. y Triggiani, O. 1989. *Gregarina nymphaeae* sp. n., a new eugregarine parasite of *Galerucella nymphaeae* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Protozoologica*. 28(1): 41-47.

Luna-Vega, I., Ocegueda-Cruz, S. & Alcántara-Ayala, O. 1994. Florística y notas biogeográficas del bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. 65(1): 31-62

Mandal, S. y Ray, R. 2007. Two new septate gregarines *Quadruspinospora hieroglyphae* sp. n. and *Globulocephalus euconocephalae* sp. n. in grasshoppers from Sundarban region of West Bengal, India. *Journal of Environmental Sociobiology*. 4: 155–162

Margolis, L., Esch, G. W., Holmes, J. C., Kuris, A. M. y Schad, G. A. 1982. The use of ecological terms in parasitology (Report of an Ad Hoc Committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology*. 68(1): 131-133

Mariño-Pérez, R., Fontana, P. y Buzzetti, F. M. 2011. Identificación de plagas de chapulín en el norte-centro de México. En: García-Gutiérrez C. y Lozano-Gutiérrez J. (Eds.). Control biológico de plagas de chapulín en el norte-centro de México. Universidad Autónoma de Zacatecas, México. pp. 35-55.

Martens, P. y Hall, L. 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Emerging Infectious Diseases*. 6(2): 103-109.

Medina-Durán, J. H. 2016. Prevalencia y distribución de eugregarinas (Apicomplexa: Eugregarinorida) en el tracto digestivo de *Conocephalus ictus* (Orthoptera: Tettigoniidae) en tres áreas de pastizal inducido en Tlanchinol, Hidalgo, México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 54 pp.

Mikhailov, K. V., Tikhonenkov, D. V., Janouskovec, J., Diakin, A. Y., Ofitserov, M. V., Mylnikov, A. P. y Aleshin, V. V. 2015. Primary structure of 28S rDNA gene confirms monophyly of free-living heterotrophic and phototrophic apicomplexans (Alveolata). *Biochemistry (Moscow)*. 80(11): 1492-1499.

Mlynarek, J. J., Hassall, C. & Forbes, M. R. 2012. Higher gregarine parasitism often in sibling species of host damselflies with smaller geographical distributions. *Ecological Entomology*. 37(5): 419-425.

Modak, B. K., Basu, S. y Haldar, D. P. 2008. Two new species of the genus *Quadruspinospora* Sarkar et Chakravarty, 1969 (Apicomplexa, Conoidasida) from grasshoppers (Insecta, Orthoptera). *Acta Parasitologica*. 53(4): 321-329.

Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R. C. A., Olson, M., Lal, A. y Xiao, L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 49: 433–440.

Morrison, D. A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now?. *Trends in Parasitology*. 25(8): 375-382.

Ogedengbe, M. E. 2015. DNA Barcoding of Apicomplexa: mitochondrial evolution across the phylum. PhD Thesis, University of Guelph, Canadá. 290 pp.

Ogedengbe, J. D., Hanner, R. H. y Barta, J. R. 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal of Parasitology*. 41: 843-850.

Ogedengbe, M. E., El-Sherry, S., Ogedengbe, J. D., Chapman, H. D., & Barta, J. R. (2018). Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with

morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). *International journal for parasitology*. 48(1), 59-69.

Perkins, F. O., Barta, J. A., Clopton, R. E., Pierce, M. A. y Upton, S. J. 2002. Phylum Apicomplexa Levine, 1970. En: Lee, J. J., Leedale, G., Patterson, D. y Bradbury, P. C. (Eds.). Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologist. Lawrence, Kansas, U.S.A. pp. 190-369.

Poulin, R. y Forbes, M. R. 2012. Meta-analysis and research on hosts-parasite interactions: past and future. *Evolutionary Ecology*. 26: 1169-1185

Pushkala, K., Muthukumaravel, K., Johny, S., Muralirangan, M. C. y Sanjayan, K. P. 2000. Two new species of cephaline gregarines in grasshoppers (Insecta: Orthoptera) from Tamil Nadu, (India): *Retractocephalus dhawanii* sp. n. (Eugregarinida: Didymorphyidae) and *Hentschelia gillii* sp. n. (Eugregarinorida: Dactylophoridae). *Journal of Orthoptera Research*. 9: 57-66.

Ramírez, N. E., Ward, L. A. y Sreevatsan, S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*. 6: 773–785.

Resh, V. H. y Cardé, R. T. 2009. Encyclopedia of Insects. Academic Press, Elsevier. Jamestown Road, London, Reino Unido. 1132.

Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernández, J. A., García-Munguía, A. M., Howard, A. F. V., Ortega-Morales, A. I., Adeleke, M. A. y Rodríguez-Pérez, M.A. 2013. *Aedes albopictus* in northeast Mexico: an update on adult distribution and first report of parasitism by *Ascogregarina taiwanensis*. *Journal of Vector Borne Diseases*. 50: 202-205.

Río-Rodríguez, R. E., Pech, D., Soto-Rodríguez, S. A., Gómez-Solano, I. y Sosa-López, A. 2013. A ten-month diseases survey on wild *Litopenaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae) from southern Gulf of Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 6(3): 1175-1188.

Rivera-García, E. 2006. An annotated checklist of some orthopteroid insects of Mapimi Biosphere Reserve (Chihuahuan Desert), Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*. 22(3): 131-149.

Rosales, M. J., Pérez-Cordón, G., Sánchez-Moreno, M., Marín-Sánchez, C. y Mascaró, C. 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*. 95: 74–78.

Rueckert, S. y Leander, B. S. 2008. Morphology and phylogenetic position of two novel marine gregarines (Apicomplexa, Eugregarinorida) from the intestines of North-eastern Pacific ascidians. *Zoologica Scripta*. 37(6): 637-645.

Rueckert, S. & Leander, B. S. 2010. Description of *Trichotokara nothriiae* n. gen. et sp. (Apicomplexa, Lecudinidae) – An intestinal gregarine of *Nothria conchylega* (Polychaeta, Onuphidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 172-179.

Rueckert, S. y Devetak, D. 2017. Gregarines (Apicomplexa, Gregarinasina) in psocids (Insecta, Psocoptera) including a new species description and their potential use as pest control agents. *European Journal of Protistology*. 60: 60-67.

Rueckert, S., Chantangsi, C. y Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60:2681-2690.

Rueckert, S., Simdyanov, T. G., Aleoshin, V. V. y Leander, B. S. 2011a. Identification of a divergent environmental DNA sequence clade using the phylogeny of gregarine parasites (Apicomplexa) from crustacean hosts. *Plos ONE*. 6(3): e18163.

Rueckert, S., Wakeman, K. C., Jenke-Kodama, H. y Leander, B. S. 2015. Molecular systematics of marine gregarine apicomplexans from Pacific tunicates, with descriptions of five novel species of *Lankesteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65:2598-2514.

Rueckert, S., Villette, P. M. A. H. y Leander, B. S. 2011b. Species boundaries in gregarine Apicomplexan parasites: a case study – comparison of morphometric and molecular variability in *Lecudina* cf. *tuzetae* (Eugregarinorida, Lecudinidae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 58(4): 275-283.

Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D. y Kirk, P. M. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*: 10(4): e0119248.

Ryan, U., Papparini, A., Monis, P. y Hijjawi, N. 2016. It's oficial – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. 105(15): 305-313.

Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.

Sarkar, A. y Chakravarty, M. 1969. Gregarines (Protozoa: Sporozoa) from insects 1. New cephaline gregarines of the family Actinocephalidea. *Proceedings of the Zoological Society of Calcutta*. 22: 17-29.

Scicluna, S. M., Tawari, B. y Clark, C. G. 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 157: 77–85.

Schnittger, L., Yin, H., Gubbels, M. J., Beyer, D., Niemann, S., Jongean, F. y Ahmed, J. S. 2003. Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitology Research*. 91: 398-406.

Schrével, J. y Desportes, I. 2013a. Introduction: gregarines among Apicomplexa. En: Desportes, I. y Schrével, J. (Eds.). *Treatise on Zoology – Anatomy, taxonomy, biology: The gregarines, the early branching Apicomplexa*. Brill. Leiden, Holanda. pp. 7-21.

Schrével, J. y Desportes, I. 2013b. Biology of gregarines and their host parasite interactions. En: Desportes, I. & Schrével, J. (Eds.). *Treatise on Zoology – Anatomy, taxonomy, biology: The gregarines, the early branching Apicomplexa*. Brill. Leiden, Holanda. pp. 25-196.

Schrével, J. y Desportes, I. 2013c. Marine gregarines. En: Desportes, I. & Schrével, J. (Eds.). *Treatise on zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The gregarines, the early branching Apicomplexa*. Brill. Leiden, Holanda. pp. 197-375.

Seck, A. G. y Toguebaye, B. S. 1995. Etude taxonomique de quelques grégaires (Protozoa, Apicomplexa) parasites de criquets du Sénégal. Description d' *Actinocephalus pyrgomorphae* n. sp. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique noire Cheikh Anta Diop, Dakar, sér. A*. 48: 37-47.

Semans, F. M. 1941. Protozoan parasites reported from the Orthoptera, with special reference of those of Ohio. III. Protozoan parasites in relation to the host and the host ecology. *Ohio Journal of Science*. 41: 457-464.

Semans, F. M. 1943. Protozoan parasites reported from the Orthoptera, with special reference to those of Ohio. IV. Classified list of the protozoan parasites of the Orthoptera of the world. Classes Mastigophora, Sarcodina, and Sporozoa. *Ohio Journal of Science*. 43: 221-234.

Sheridan, L. A. D., Poulin, R., Ward, D. F. y Zuk, M. 2000. Sex differences in parasitic infection among arthropod hosts: is there a male bias? *Oikos*. 88: 327-334.

Sienkiewicz, P. y Lipa, J. J. 2009. Prevalence of eugregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida) parasitizing in ground beetles (Coleoptera, Carabidae) in various habitats. *Polish Journal of Entomology*. 78: 351-368.

Simdyanov, T., Diakin, A. Y. y Aleoshin, V. V. 2015. Ultrastructure and 28S rDNA phylogeny of two gregarines: *Cephaloidophora* cf. *communis* and *Heliospora* cf. *longissimi* with remarks on gregarine morphology and phylogenetic analysis. *Acta Protozoologica*. 54: 241-262.

Simdyanov, T., Guillou, L., Diakin, A. Y., Mikhailov, K. V., Schrével, J. and Aleoshin, V. V. 2017. A new view on the morphology and phylogeny of eugregarines suggested by the evidence from the gregarine *Ancora sagittata* (Leuckart, 1860) Labbé, 1899 (Apicomplexa: Eugregarinida). *PeerJ*. 5: e3354.

Tamura, K. y Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512-526.

Taylor, P. D. y Merriam, G. 1996. Habitat fragmentatiton and parasitism of a forest damselfly. *Landscape Ecology*. 11: 181-189

Tenter, A. M., Barta, J. R., Beveridge, I., Duszynski, D. W., Mehlhorn, H., Morrison, D. A., Thompson, R. C. A. y Conard, P. A. 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. *International Journal for Parasitology*. 32: 595-616.

Théodorides, J., Ormières, R. y Jolivet, P. 1958. Eugrégarines parasites d'Orthoptéroïdes. *Exploration du Parc National Albert, Bruxelles*. 2: 3-44.

Théodorides, J., Desportes, I. y Jolivet, P. 1972. Grégarines de la Nouvelle-Guinée et des îles voisines. *Cahiers du Pacifique*. 16: 110–168.

Théodorides, J., Desportes I. y Jolivet, P. 1975. Grégarines de la Thaïlande. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 50: 145–159.

Triplehorn, C. A. y Johnson, N. F. 2005. Borror and DeLong's introduction to the study of Insects. Brooks/Cole. USA. 864 pp.

Votýpka, J., Modrý, D., Oborník, M., Slapeta, J. y Lukes, J. 2017. Apicomplexa. En: Archibald, J. M., Slamovits, C. H. y Simpson, A. G. B. (Eds.). Handbook of the Protists. Springer International Publishing AG. Cham, Suiza. 1657 pp.

Wakeman, K. C. y Leander, B. S. 2013. Molecular phylogeny of marine gregarine parasites (Apicomplexa) from tube-forming polychaetes (Sabellariidae, Cirratulidae, and Serpulidae), including Descriptions of two new species of *Selenidium*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 60:514-525.

Wakeman, K. C., Yabuki, A., Fujikura, K., Tomikawa, K. y Horiguchi, T. 2018. Molecular phylogeny and surface morphology of *Thiriotia hyperdolphinae* n. sp. and *Cephaloidophora oradareae* n. sp. (Gregarinasina, Apicomplexa) isolated from a deep sea *Oradarea* sp. (Amphipoda) in the West Pacific. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 65:372-381.

Waller, R. F. y McFadden, G. I. 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current Issues in Molecular Biology*. 7: 57-80.

Whitman, D. W. y Orsak, L. J. 1985. Biology of *Taeniopoda eques* (Orthoptera: Acrididae) in Southeastern Arizona. *Annals of the Entomological Society of America*. 78(6): 811-825.

Yumnam, I. y Mohilal, N. 2017. A new species of *Quadruspinospora* Sarkar and Chakravarty, 1969 (Apicomplexa: Conoidasida) from orthopteran insects of Manipur, India. *Journal of Parasitic Disease*. 41(2): 313-317.

Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 944 pp.

Zhang, Z. Q. (2011). Phylum Arthropoda von Siebold, 1848. In: Zhang, Z. Q. (Ed.) *Animal name*. *Zootaxa*. 3148, 99-103.

Zuk, M. 1987. Seasonal and individual variation in gregarine parasite levels in the field crickets *Gryllus veletis* and *G. pennsylvanicus*. *Ecological Entomology*. 12: 341-348.

Zurita-Ramón, L. 1969. Contribución al conocimiento de algunas gregarinas (Protozoa, Teloporea) parasíticas del ortóptero *Acheta assimilis* (Fabricius). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 31 pp.

9. Anexos

9.1. Anexo 1

Protocolo de extracción Genra Puregene Mouse Tail Kit modificado por Woller D. A. y Raszick T. J., Song Lab of Insect Systematic and Evolution, Texas A&M University

Día 1

- 1.- Aislar aproximadamente 100 células de cada especie de gregarina. Remover el exceso de alcohol con ayuda de una micropipeta y dejar secar a temperatura ambiente por 1 hora.
- 2.- Colocar nitrógeno líquido en un termo de unicel y sumergir por algunos segundos los viales con las muestras celulares para que se congelen. Con ayuda de una punta de micropipeta de 100 microlitros triturar el contenido del vial.
- 3.- Añadir 300 ul de Cell Lysis Solution (en kit) y 1.5 ul de proteinasa K al contenido del vial.
- 4.- Centrifugar por 30 segundos a 16,000 gx.
- 5.- Dejar incubando las muestras en un bloque térmico a 55 °C toda la noche (aproximadamente 15 hrs).

Día 2

- 6.- Añadir al vial 1.5 ul de RNase A Solution (en kit) y mezclar el contenido invirtiendo el vial 25 veces.
 - 7.- Centrifugar por 30 segundos a 16,000 gx.
 - 8.- Incubar el vial en un bloque térmico a 37 °C por una hora.
 - 9.- Incubar el vial por 1 minuto en un bloque frío a -20 °C.
 - 10.- Retirar del bloque frío y añadir 100 ul de Protein Precipitation Solution (en kit) y agitar en vórtex a máxima potencia por 20 segundos.
 - 11.- Agitar el vial fuertemente de manera manual algunas veces.
 - 12.- Centrifugar el vial a 16,000 gx por 3 minutos.
 - 13.- Incubar el vial por 5 minutos en el bloque frío a -20 °C.
 - 14.- Centrifugar el vial a 16,000 gx por 3 minutos.
- NOTA: Terminando esta centrifugación se debería de formar un pellet de proteínas rodeado de sobrenadante.
- 15.- Preparar un nuevo vial de 1.7 ml y añadir isopropanol absoluto. Etiquetar vial.
 - 16.- Tomar todo el sobrenadante del primer vial y transferirlo al nuevo vial. Tener cuidado de no tocar el pellet con proteínas precipitadas.
 - 17.- Añadir 1 ul de glicógeno al nuevo vial.

18.- Centrifugar vial a 16,000 gx por 3 minutos.

NOTA: Finalizando esta centrifugación el DNA debería de ser visible como un pequeño pellet blanquecino, pero en ocasiones puede ser muy pequeño y no observarse a simple vista.

19.- Retirar el sobrenadante del vial con una pipeta de 200 ul teniendo cuidado de no tocar el pellet.

20.- Dejar que el contenido del vial se evapore por 5 minutos.

21.- Centrifugar el vial por 3 minutos a 16,000 gx.

22.- Descartar todo el sobrenadante usando una pipeta de 20 ul.

23.- Dejar que el contenido del vial se evapore por 2 minutos.

24.- Añadir 300 ul de etanol 70% e invertir el vial para lavar el pellet.

25.- Centrifugar vial a 16,000 gx por 3 minutos.

26.- Descartar todo el sobrenadante de etanol 70% con una pipeta de 100 ul.

27.- Centrifugar vial en centrífuga de evaporación al vacío a 30 °C por 10 minutos.

28.- Añadir 100 ul de DNA hydration solution (en kit) al vial y mezclar en vórtex por 5 segundos.

29.- Centrifugar a 16,000 gx por 30 segundos.

30.- Incubar a 60 °C por 1 hora para disolver el DNA.

31.- Colocar el vial en una agitadora e incubar por 8 horas a temperatura ambiente a 100 rpm.

Día 3

32.- Centrifugar el vial a 16,000 gx por 30 segundos.

33.- Cuantificar el DNA.

9.2. Anexo 2

Protocolo empleado para llevar a cabo la PCR

Mezcla de reacción por pozo para amplificar el gen SSU rDNA:

Platinum 10x = 5 μ l

50 mM MgCl₂ = 1.5 μ l

DNTPs = 1 μ l

Taq (Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase) = 0.2 μ l

H₂O (ThermoFisher DEPC-Treated Water) = 39.3 μ l

Forward primer (F1 10 mM) = 1 μ l

Reverse primer (R1 10 mM) = 1 μ l

Templado de DNA = 1 μ l

Volumen total por pozo= 50 μ l

Las mezclas de reacción se corrieron en un termociclador Bio-Rad T100 siguiendo el siguiente protocolo:

Un periodo de desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos; 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 45 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 2 minutos; finalmente un periodo de extensión final de 72 °C por 5 minutos.

9.3. Anexo 3

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa 1%

Preparación del gel

- 1.- Pesar 1000 mg de agarosa
- 2.- Medir 100 mL de TAE X1
- 3.- Transferir los 100 mL de TAE X1 a un matraz y añadir los 1000 mg de agarosa
- 4.- Calentar en microondas en intervalos de 30 segundos hasta que se disuelva la agarosa. Evitar que la solución hierva
- 5.- Enfriar la solución poniendo el matraz en agua corriente fría
- 6.- Añadir 5 µl de bromuro de etidio a la solución y disolver.
- 7.- Vaciar la solución en la cámara de electroforesis, en donde previamente se montaron los pozos para correr las muestras.
- 8.- Dejar enfriar por 10 minutos.

Inicio de electroforesis

- 1.- Colocar 5 µl del marcador de peso molecular en el primer pozo y en los siguientes pozos colocar 5 µl de los productos de las PCR
- 2.- Añadir TAE 1x en la cámara de electroforesis hasta la marca
- 3.- Introducir lentamente el gel a la cámara de electroforesis con las muestras previamente cargadas
- 4.- Correr el gel a temperatura ambiente por 30 minutos a 96 mV

Visualización de bandas

- 1.- Llevar el gel a un transiluminador UV para visualizar si se amplificó el producto de la PCR

9.4. Anexo 4

Morphology and phylogenetic position of two new species of gregarines (Apicomplexa: Eugregarinida) parasitizing the lubber grasshopper *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Insecta: Orthoptera: Romaleidae) in Mexico

Artículo de investigación original sometido al *Journal of Eukaryotic Microbiology*

Two New Eugregarine Species from Mexico

Morphology and Phylogenetic Position of Two New Species of Gregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida) Parasitizing the Lubber Grasshopper *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Insecta: Orthoptera: Romaleidae) in Mexico

Jorge Humberto Medina-Durán^{a1}, Rosaura Mayén-Estrada^a, Ricardo Mariño-Pérez^b and Hojun Song^b

^a Laboratorio de Protozoología, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, C. P. 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Department of Entomology, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

J. H. Medina-Durán, Laboratorio de Protozoología, Facultad de Ciencias, Circuito Exterior S/N, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Z. C. 04510, Ciudad de México, México

Telephone number: +(52)56224924; e-mail: jorgemedinad@ciencias.unam.mx

ABSTRACT

Eugregarines are understudied apicomplexan parasites of invertebrates inhabiting marine, freshwater, and terrestrial environments. Most eugregarines in terrestrial habitats have been described parasitizing the gut of less than 1% of the total insect diversity. The eugregarine diversity in orthopterans (grasshoppers, locusts, katydids and crickets) is still little known. We carried out a survey of the eugregarines parasitizing the Mexican lubber grasshopper *Taeniopoda centurio* (Orthoptera: Romaleidae), which is an endemic species to the northwest of Mexico. We have described two new eugregarine species from the gut of the host: *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. and *Quadruspinospora mexicana* n. sp. Both species are morphologically dissimilar in their life-cycle stages. Our SSU rDNA phylogenetic analysis showed that the two species are phylogenetically distant from each other even though they parasitize the same host. *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. is found within the clade Gregarinoidea, being close related to *Amoebogregarina nigra* from the grasshopper *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae). *Quadruspinospora mexicana* n. sp. clustered within the highly supported clade comprising Actinocephaloidea and grouped together with *Prismatospora evansi*, a parasite from dragonfly naiads (Odonata). We conclude that *A. taeniopoda* n. sp. and *Q. mexicana* n. sp. are first reported as parasitizing a species of the family Romaleidae. Both species represent the first records of gregarines parasitizing grasshoppers of Mexico, and for *Q. mexicana* n. sp. is the first report for the New World.

Keywords

Amoebogregarina taeniopoda; apicomplexan parasites; eugregarines; Hidalgo State; insect parasites; *Quadruspinospora mexicana*; SSU rDNA phylogeny; Romaleidae

GREGARINES are a group of unicellular eukaryotes that parasitize mainly the digestive tracts of invertebrates from marine, freshwater, and terrestrial habitats (Schrével & Desportes 2013). Even though gregarines are regarded as one of the most diverse and early branching groups of Apicomplexa, their diversity is far from being completely known and remains to be discovered (Clopton 2002; Rueckert & Horák 2017; Schrével & Desportes 2013). Modern gregarine taxonomic arrangements are not fully understood because they are currently based on scarce molecular phylogenetic data mainly from SSU rDNA, where its evolutionary rates are the most disparate of any eukaryote group (Cavalier-Smith 2014). In addition, recent molecular phylogenetic analyses based on available molecular data are unable to resolve many of the nodes that connect lineages of gregarines, complicating the establishment of gregarine relationships (Cavalier-Smith 2014; Rueckert et al. 2015; Simdyanov et al. 2017). In the most recent classifications of eukaryotes proposed by Adl et al. (2012, 2018), three gregarine groups are recognized (archigregarines, eugregarines and neogregarines), agreeing with traditional classification schemes. However, some other recent classification schemes based mainly on molecular data only recognize the archigregarines and eugregarines as groups, placing neogregarines within the eugregarines group (Cavalier-Smith 2014; Simdyanov et al. 2017). So far, traditional taxonomy of gregarines is still used to discuss gregarine diversity, which rely on characters such as the morphology of sporozoites and trophozoites, and host habitat. From the groups mentioned above, the eugregarines are the most speciose (Desportes 2013).

Eugregarines (Eugregarinorida Léger, 1900) are characterized by having large extracellular trophozoites morphologically different from the sporozoites; trophozoites possessing an attachment region known as the mucron in aseptate forms and the epimerite in septate ones, which is mostly absent in mature gamonts, and its movement typically occurring by gliding locomotion of gamonts that is thought to be facilitated by longitudinal pellicular folds, 12 nm apical filaments, and cytoskeletal elements (Schrével & Desportes 2013; Simdyanov et al. 2017). Traditionally, eugregarines have been divided into two groups, aseptate and septate gregarines, based on the presence of a septum. However, recent phylogenetic analyses (Rueckert et al. 2011; Cavalier-Smith 2014; Simdyanov et al. 2017) have questioned if the septum is a reliable character for taxonomic division. In terrestrial habitats, eugregarines are frequent parasites in the gut of arthropods, with insects being the most common hosts infected. Levine (1988) mentioned that of the approximately 686,000 named species of insects at the time, there were only about 2,200 of them with reports of gregarines. By now, there are about one million of described insects (Stork 2018), but the number of insects with reports of eugregarines has remained almost the same, and not increased accordingly. This pattern is indicative of the dire state of taxonomic impediments in this group.

The descriptions of eugregarines in insects are currently biased toward the species within Odonata, Coleoptera and Diptera. In contrast, other common insect orders, such as Orthoptera, include fewer reports of their eugregarine parasites (Desportes 2013). Orthopterans (grasshoppers, locusts, katydids and crickets) are a diverse group of insects with many economically important species, due to their potential as food source or as plagues in agricultural areas (Fontana et al. 2008). For example, species of the grasshopper genus *Sphenarium* are important elements in the diet of Mexican people since pre-Columbian times and, at the same time, some species are known to be serious crop pest in central Mexico of corn (*Zea mays*) and beans (*Phaseolus vulgaris*), both fundamental elements of the Mexican diet (Cerritos & Cano-Santana 2008; Sanabria-Urbán et al. 2017). As an attempt to contribute to the knowledge of the diversity of eugregarines in orthopterans, we have carried out a survey of the eugregarines that parasitize the Mexican lubber grasshopper *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Romaleidae), which is a common species in the northeastern mountain ranges of Mexico, and in some areas, it even may become a plague (De Jesús-Bonilla et al. 2017).

The main objective of this study is to describe two new gregarine species *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. and *Quadruspinospora mexicana* n. sp. parasitizing the gut of *T. centurio*. We studied the life cycle, morphology, ultrastructure, and phylogenetic position based on SSU rDNA gene of the two new eugregarine species and compared their general morphology with closely related species. Our findings represent the first record of eugregarines for orthopterans from Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and isolation

Adults of the Mexican lubber grasshopper, *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Orthoptera: Romaleidae), were collected manually or with a sweep net during the months of September to November of 2017, obtaining 30 individuals each month, from croplands surrounded by cloud forest (20°59'32.99''N, 98°39'34.73''W) in the municipality of Tlanchinol, Hidalgo State, Mexico, at 1,526 masl. They were identified to species using De Jesús-Bonilla et al. (2017). Specimens were transported alive and decapitated prior to dissection. After dissection, the alimentary canal of each host was removed with fine forceps into insect muscle solution (Belton & Grundfest, 1962; Clopton & Lucarotti, 1997), and the different life-cycle stages of the eugregarines were identified and isolated with a fine glass pipette under a Nikon SMZ800 stereomicroscope.

Light and scanning electron microscopy

Eugregarines were isolated with a fine glass pipette from a well dish and observed with a Nikon Labophot-2 differential interference contrast (DIC) microscope with a Nikon Digital Sight DS2Mv adapted camera for live observation and microphotographic records of the cells. We measured the width and length of each compartment in trophozoites and gamonts, and the total width and length in gametocysts and oocysts. Morphological identification was based on Clopton (2002, 2004) and Desportes (2013), and we followed the taxonomic arrangement proposed by Simdyanov et al. (2017).

For Scanning Electron Microscopy (SEM), the guts of infected hosts were fixed in 2.5% glutaraldehyde 0.1M Na-cacodylate buffer-0.1M sucrose pH 7.4. Trophozoites, gamonts, and syzygies from each eugregarine species were released by gentle agitation of the gut tissue. Eugregarine cells were then isolated with fine glass pipettes and transferred

to fresh fixative for 3 hours. To remove the excess of fixator, cells were placed for 15 minutes in 0.1M Na-cacodylate buffer without sucrose three times and stored in the same buffer for 24 h, and then cells were dehydrated in a graded series of ethanol during 15 minutes at 10%, 30%, 40%, 50% and 70%, and stored at 4 °C. Cells were transferred to absolute ethanol and critical point dried with CO₂. Cells were mounted with adhesive carbon tape on aluminum stubs and sputter-coated with gold. SEM stubs were observed with a Hitachi Model SUI510 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) microscope. All SEM images were presented on a black background using Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Parasitological observations

We calculated the prevalence, defined as a percentage of the number of hosts infected with at least one cell of a parasite species of the total host sample, the intensity, defined as the number of individuals of a particular parasite species in a single infected host, and the mean intensity, defined as the average intensity of a particular species of parasite among the infected members of a particular host species (Bush et al. 1997). Prevalence of infection was calculated for the total number of hosts and sexes. Intensity of infection was calculated for the total number of infected hosts and sexes. Both prevalence and intensity values were estimated considering all life-cycle stages of the gregarines with exception of the sporozoites because they were small and might be overlooked. Sex bias on the prevalence of the gregarines was calculated using Fisher Exact Test using R Studio 1.1.419 (RStudio Inc., Boston, MA, USA).

DNA extraction and PCR amplification

For each of the two gregarine morphospecies, we isolated 100 cells (gamonts and zygites). To avoid contamination of the isolates with a different gregarine species, the cells were pooled one by one based on its morphology, and with the help of a micropipette under a stereoscope Nikon SMZ800. Cells were then fixed with 100% ethanol and stored in 1.5 ml centrifuge tubes to -20 °C. Genomic DNA was extracted using the Genra Puregene mouse tail kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The quality and concentration of DNA extracts were measured using DeNovix Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA). For PCR amplification of the SSU rDNA gene, two universal outside primers, F1 (5'-GCGCTACCTGGTTGATCCTGCC-3'), and R1 (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (Leander et al. 2003) were used in 50 µl PCR reactions using Invitrogen Platinum Taq Master Mix (ThermoFisher Scientific, MA, USA). The BioRad T100 thermal cycler used for the PCR, and the following PCR protocol as used: initial denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 34 cycles at 94 °C for 45 s, 45 °C for 45 s and 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were cleaned with USB ExoSAP-IT PCR (Life Technologies Corporation, CA, USA) and then Sanger sequencing was performed at the University of Arizona Genetics Core using primers F1, R1 and the internal primers F2 (5'-AAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'), R2 (5'-CGCAAGGCTGAAACTTAAA-3'), WSSU5-5 (5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3') and WSSU2-3 (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') (Clopton 2009; Rueckert et al. 2011). Raw sequence data were trimmed and contigs were assembled using Geneious 10 (Kearse et al.

2012; Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand). Novel SSU rDNA gene sequences were initially analyzed using a BLAST search implemented in Geneious to confirm their identities as apicomplexan sequences. The two novel sequences of the SSU rDNA gene were deposited in GenBank under accession numbers MK181531 and MK181532.

Molecular phylogenetic analyses

The two sequences were aligned with other 83 apicomplexan and alveolate sequences downloaded from GenBank. Alignment was carried out in MUSCLE (Edgar 2004) using default parameters implemented in Geneious. The alignment was subsequently edited manually by eye to remove ambiguous gaps. The dinoflagellates *Prorocentrum micans* and *Hematodinium* sp. (GenBank accession numbers AJ415519.1 and AF286023) were used as outgroup taxa. Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses were performed with GTR+I+G model selected using JModelTest v.0.1.10 (Darriba et al. 2012). Maximum likelihood analysis was performed using RAxML-HPC2 on XSEDE v. 8.2.9 (Stamatakis 2014) with 1,000 bootstrap replications. BI was performed using MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) using default priors, with four runs each with chains of 10,000,000 generations, with trees sampled every 1,000 generations. We plotted the likelihood trace for each run to assess convergence in Tracer V1.6 (Rambaut et al. 2018), and discarded an average of 25% of each run as burn-in. The resulting tree topologies were visualized on Geneious. Both ML and BI analyses were performed via the CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2011).

RESULTS

Morphological description of Amoebogregarina taeniopoda n. sp.

Trophozoites, single gamonts and gamonts syzygy were isolated from the middle-gut, and gametocysts from the hindgut of *T. centurio*. All stages were yellowish under dissecting microscope. Trophozoites (Fig. 1A-C) possessed a shallowly elliptoid to depressed deltoid metamorphic epimerite, that is, the epimerite was retained and incorporated to the protomerite of the cell after the detachment from host gut epithelium (average length x width = 45.8 μm x 69.2 μm , range = 28–64 μm x 54–94 μm , $n = 18$) (Fig. 1A-B). The protomerite was panduriform to broadly panduriform, constrained at the apex (average length x width = 86.6 μm x 77.2 μm , range = 42.9–185.9 μm x 42.9–128.7 μm , $n = 18$), and its deutomerite was oblong or elliptoid (average length x width = 272 μm x 124.7 μm , range = 157.3–371.8 μm x 71.5–200.2 μm , $n = 18$). Gamonts (Fig. 1D) were similar in shape to the trophozoites, but the epimerite was absent or highly incorporated to the protomerite, and slightly bigger than the trophozoites (Gamonts deutomerite: average length x width = 403.1 μm x 178.4 μm , range = 143–572 μm x 114.4–271.7 μm , $n = 20$; gamonts protomerite: average length x width = 121.5 μm x 115.4 μm ; range = 42.9–271.7 μm x 71.5–185.9 μm , $n = 20$). The protomerite and deutomerite of the cells were divided by a distinct septum. The nucleus was spherical (diameter = 50.5 μm , $n = 18$), and it was located from the middle to the lower portion of the deutomerite (Fig. 1C). Association of gamonts in syzygy was precocious, caudofrontal and biasociative (Fig. 1E). Trophozoites, gamonts and gamonts in syzygy were stiff and capable of gliding movements. Gametocysts showed a hyaline epicyst and the dehiscence occurred through sporoducts (Fig. 1F), releasing doliform oocyst through monete chains (average length x width = 7.05 μm x 4.7 μm , range = 7–7.25 μm x 4.6–5.2 μm , $n = 31$) (Fig. 1F-G). The SEM micrographs showed

that the whole cell presented longitudinal and parallel epicytic folds running along longitudinal axis with exception of the epimerite (Fig. 1H-J). In the middle of the cell, the density of folds was 6–7 folds per micron. Morphometric data are shown in Table 1.

Morphological description of Quadruspinospora mexicana n. sp.

Trophozoites and gamonts were observed from the middle-gut and gametocysts from the hind-gut of *T. centurio*, all stages were whitish under dissecting microscope. Trophozoites (Fig. 2B-C) possessed a subspherical rosette-shape epimerite with 7–12 digitiform process (Fig. 2D-E) (average length x width = 35.6 μm x 32 μm , range = 21–42.9 μm x 21.4–42.9 μm , $n = 10$). The protomerite of the cells were luniform (average length x width = 57.7 μm x 89.8 μm , range = 24.5–100.1 μm x 38.5–143 μm , $n = 10$), and the deutomerites were narrowly to very deeply obdeltooid, or narrowly obpyriform (average length x width = 257.3 μm x 124.2 μm ; range = 150.2–429 μm x 80.5–164.4 μm , $n = 10$). Gamonts (Fig. 2F) were similar in shape to trophozoites but without the epimerite that is detached from the cell. The deutomerite of gamonts also could present a narrowly obtrullate shape and were considerably bigger than the trophozoites (deuteromerite: average length x width = 655.4 μm x 239.6 μm ; range = 243.1–1186.9 μm x 93.1–471.9 μm , $n = 27$; protomerite: average length x width = 95.8 μm x 189.6 μm ; range = 28.1–171.6 μm x 85.8–343.2 μm , $n = 27$). The protomerite and deutomerite of the cells were divided by a distinct septum. In all cases the nucleus was spherical (diameter = 57.2 μm , $n = 6$), and it was located in the middle portion of the deutomerite (Fig. 2F). Both, trophozoites and gamonts were solitary and gamonts in syzygy were not observed. Trophozoites and gamonts were flexible and capable of gliding movements. Gametocysts were spherical and showed a thick gelatinous epicyst, the dehiscence occurred by a simple rupture of the cyst releasing single doliform oocysts in mass with two spines in each pole (Fig. 2A) (average length x width = 8.8 μm x 5.1 μm ; range = 7–10.5 μm x 4.6–5.2 μm , $n = 30$; average spines length = 26.6 μm , range = 21–35 μm , $n = 30$). The SEM micrographs showed that the whole cell presented longitudinal epicytic folds arranged in waves running along longitudinal axis (Fig. 1C and G). In the middle of the cell, the density of folds was 5 folds per micron. Morphometric data are shown in Table 2.

General parasitological observations

Of the 91 grasshoppers examined, 80 were co-infected with both eugregarine species (87.9%). Prevalence between sexes showed that 30 of 35 female (85.7%), and 50 of 56 males (89.2%) were co-infected, and no sex bias on the prevalence of gregarines was detected (Fisher's Exact test, $p = 0.7434$). For *A. taeniopoda* n. sp., a total of 78 of 91 (85.7%) specimens were infected. Prevalence differences between sexes showed that 28 of 35 female grasshoppers (80%), and 50 of 56 males (89.3%) were parasitized with *A. taeniopoda* n. sp. No sex bias was detected (Fisher's Exact test, $p = 0.2347$). In the case of *Q. mexicana* n. sp., 72 of 91 (79.1%) specimens were infected. Prevalence differences between sexes showed that 26 of 35 females (74.3%), and 46 of 56 (82.1%) were parasitized. No sex bias was detected (Fisher Exact test, $p = 0.431$).

The mean intensity of co-infection with both eugregarine species was 105 cells per host (range = 1–387 cells, $n = 78$). Female mean intensity was 113 cells per host (range = 1–381 cells, $n = 28$). Male mean intensity was 101 cells (range = 1–321 cells, $n = 50$). For *A. taeniopoda* n. sp., a mean intensity of 58 cells was found (range = 1–232 cells, $n = 76$). Female mean intensity was 57 cells (range = 2–232, $n = 26$). Male mean intensity was 58

cells (range = 1–200, $n = 50$). For *Q. mexicana* n. sp. the mean intensity was 56 cells per host (range = 1–191, $n = 70$). Female mean intensity was 70 cells (range = 1–191, $n = 26$). Male mean intensity was 48 cells (range = 1–160, $n = 46$).

Molecular phylogenetic position of *A. taeniopoda* n. sp. and *Q. mexicana* n. sp.

The partial SSU rDNA gene sequence from *A. taeniopoda* n. sp. (Genbank accession number MK181531) has a length of 1,764 bp and a G + C content of 45.5 %. While SSU rDNA gene sequence from *Q. mexicana* n. sp. (Genbank accession number MK181532) has a length of 1,766 bp and a G + C content of 44.9 %.

The resulting alignment was 1,466 bp in size. Both, BI and ML analyses recovered an almost identical tree topology, the only difference being that the BI tree showed a backbone polytomy. In general, BI and ML analyses of the 85–taxon alignment of SSU rDNA sequences yielded strong nodal supports for individual clades, but the deeper nodes of the tree were poorly resolved (Fig. 3).

The clade comprising eugregarines showed low support in both ML and BI trees (42 maximum likelihood bootstrap [MLB], BI= 0.64 Bayesian posterior probability [BPP]). Three terrestrial eugregarine clades were recovered. In the terrestrial gregarine clade I (nodal support of 100 MLB, 1 BPP), which included the eugregarines of superfamily Gregarinoidea, *A. taeniopoda* n. sp. formed sister to *A. nigra* with a strong nodal support (100 MLB, 1 BPP). In the terrestrial gregarine clade II (nodal support of 71 MLB, 0.7 BPP), comprised of gregarines of superfamily Actinocephaloidea, *Q. mexicana* n. sp. was recovered as sister to *Prismatospora evansi* with nodal support of 57 MLB and 0.87 BPP. Terrestrial gregarine clade III (nodal support of 100 MLB, 1 BPP) was only composed of the eugregarines parasites of coleopterans (Fig. 3). In both ML and BI analyses, terrestrial gregarines clade I nested within the group comprising marine gregarines, making marine gregarines paraphyletic in our phylogenetic trees.

DISCUSSION

Recent descriptions of gregarines have been biased toward the marine species (e.g. Diakin et al. 2017; Iritani et al. 2017; Rueckert & Leander 2010; Rueckert et al. 2010, 2015; Wakeman & Leander 2013; Wakeman et al. 2018), in which the inclusion of molecular markers, in particular SSU rDNA sequences, has been very informative in the delineation of very closely related species (Wakeman & Leander 2013). On the other hand, terrestrial gregarines, in which the majority of species reported are from insects, have received less attention. Most of the descriptions of eugregarines from insects have been done mainly based on morphological characteristics by using light microscopy and line drawings (Bhatia & Setna 1924; Semans 1943; Théodorides et al. 1958, 1972, 1975). Also, in older works, the description of species was often based on more ambiguous traits (i. e. description of species based only in the shape of gamonts), contributing to a underestimation of eugregarine diversity. Only few works have recently included the descriptions of terrestrial eugregarines based on both morphological and molecular evidence (Clopton 2009; Lantová et al. 2010; Leander et al. 2003; Rueckert & Devetak 2017; Votýpka et al. 2009). The inclusion of molecular information in gregarines is important because it can discriminate different species from one another, especially those species that are prone to cryptic speciation and convergent evolution (Adl et al. 2007; Wakeman & Leander 2013). In the present study, we have included the SSU rDNA sequences combined with the host affinity, type locality, trophozoite morphology and

ultrastructure, and morphology of other life-cycle stages to provide a comprehensive taxonomic description of the gregarines.

Taxonomic considerations for *A. taeniopoda* n. sp.

Genus *Amoebogregarina* Kula & Clopton, 1999, was erected for gregarines in which the epimerite is assimilated into the protomerite after detachment from host gut epithelium. *Gregarina nigra* described from *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) was established as the type species of the genus by Kula & Clopton (1999). Genus *Amoebogregarina* contains five species: *A. nigra* (Watson, 1915), *A. ampulla* (Lange & Cigliano, 2004) and *A. dhawanii* (Pushkala et al. 2000) which are exclusively parasites of orthopterans of families Acrididae and Pyrgomorphidae, while the two-remaining species, *A. crenata* (Bathia & Setna 1924) and *A. nymphaea* (Lipa & Triggiani 1989), are parasites of coleopterans of family Chrysomelidae. For a detailed diagnosis of the genus and its species refers to Kula & Clopton (1999), Clopton (2002) and Desportes (2013). *Amoebogregarina* seems to be distributed worldwide, but while *A. ampulla* and *A. dhawanii* are only reported in Argentina and India, respectively, *A. nigra* seems to have a wider distribution, reported from the United States, Papua New Guinea, Thailand, South Africa, Democratic Republic of the Congo, Ivory Coast and Senegal (Desportes 2013). However, most identifications of *A. nigra* are only based on vague descriptions and line drawing schemes (Seck & Toguebaye 1995; Semans, 1943; Théodorides et al. 1972, 1975).

The only available gene sequence for this genus corresponds to the type species, *A. nigra*. In our molecular phylogenetic analysis *A. taeniopoda* n. sp. formed a clade with the septate gregarines, *A. nigra*, several species of the genus *Gregarina* infecting earwigs (Dermaptera), crickets (Orthoptera) and cockroaches (Blattodea), and species of genus *Leidyana* parasites of crickets. *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. was placed within the highly supported clade of terrestrial gregarines belonging to superfamily Gregarinoidea (Fig. 3). Although the SSU rDNA sequences of *A. taeniopoda* n. sp. and *A. nigra* are very similar to each other with a genetic distance of 1.3 %, both lineages are morphologically quite different (Table 3). The main morphological traits that distinguish *A. taeniopoda* n. sp. from *A. nigra* are the shape of the epimerite and protomerite, and the size of the trophozoite cell. While for *A. nigra* the shape of the epimerite is shallowly ovoid to transversely elliptoid, for *A. taeniopoda* n. sp. its epimerite is shallowly elliptoid to depressed deltoid. These differences make the length of the epimerite of *A. taeniopoda* n. sp. greater (mean length of 45.8 μm) in comparison of the epimerite of *A. nigra* (mean length of 37.9 μm). Conversely, the epimerite of *A. taeniopoda* n. sp. is narrower (mean width of 69.2 μm) than those of *A. nigra* (mean width of 81 μm). With respect of the protomerite shape, *A. nigra* possesses an oblong to transversely oblong protomerite, while *A. taeniopoda* n. sp. has a panduriform to broadly panduriform protomerite constrained at the apex. The complete morphological comparison of *A. taeniopoda* n. sp. with the other *Amoebogregarina* species parasitizing grasshoppers is also shown in Table 3. The morphological differences of both species, along with the distinctions in host utilization, and the distribution discrepancies are the traits justifying the establishment of the new species.

Taxonomic considerations for *Q. mexicana* n. sp.

Genus *Quadruspinospora* Sarkar & Chakravarty, 1969 is characterized for having solitary trophozoites with subspherical epimerites with digitiform processes and ellipsoidal or ovoid oocysts with long filament-like polar spines released by simple rupture of the gametocyst.

Quadruspinospora japonicus (first described as *Coronoepimeritus japonicus* by Hoshide, 1958) from *Locusta migratoria*, *Oedaleus infernalis*, *Oxya japonica* and *O. velox* (Orthoptera: Acrididae) is the type species of the genus (Clopton 2002; Desportes 2013; Sarkar & Chakravarty 1969). Genus *Quadruspinospora* contains 14 species, all of which are exclusively parasites of orthopteran families, Acrididae, Pyrgomorphidae and Tetrigidae (Desportes 2013; Yumnam & Mohilal 2017): *Q. aelopii* Sarkar & Chakravarty 1969, *Q. attractomorphae* (Haldar & Chakraborty 1978), *Q. chakravartyi* (Chakraborty & Haldar 1974), *Q. dichotoma* Kundu & Haldar 1983, *Q. indoaiolopii* Haldar & Chakraborty 1976, *Q. megaspinosa* Haldar & Chakraborty 1976, *Q. acridae* (Haldar & Chakraborty 1979), *Q. adigitalis* Datta et al. 1990, *Q. caudata* Modak et al. 2008, *Q. hieroglyphae* Mandal & Ray 2007, *Q. japonicus* Hoshide 1958, *Q. cloptoni* Modak et al. 2008, *Q. platyepimerita* Datta et al. 1990 and *Q. oxyae* Yumnam & Mohilal 2017.

Quadruspinospora species have been only described from India and Japan, which means that *Q. mexicana* n. sp. represents the first record for this genus in the New World.

Until now, there has not been any available sequence of any *Quadruspinospora* species in any database such as GenBank. The establishment of *Q. mexicana* n. sp. within genus *Quadruspinospora* based on morphological evidence needs to be confirmed with the sequence of the type species of the genus. In our molecular phylogenetic analysis, the closest relatives of *Q. mexicana* n. sp. were both septate and aseptate gregarines including *Prismatospora evansi* infecting dragonflies (Odonata), *Monocystis agilis* parasite of earthworms (Annelida), *Syncystis mirabilis* a neogregarine parasite of dragonflies and *Gregarina ctenocephali* a parasite of fleas (Siphonaptera). The close relation of an aseptate gregarine (*M. agilis*) with other septate gregarines, including *Q. mexicana* n. sp., represents another example that supports the recent proposals of abolishing the division between septate and aseptate gregarines because it does not reflect accurate phylogenetic relationships (Cavalier-Smith 2014; Rueckert et al. 2011; Simdyanov et al. 2017). In the same way the inclusion of neogregarines (*Ophryocystis elektroscirrha* and *S. mirabilis*) within a clade of eugregarines supports the idea that neogregarines should be incorporated into the Eugregarinorida (Simdyanov et al. 2017). *Quadruspinospora mexicana* n. sp. clustered within the clade of terrestrial gregarines belonging to superfamily Actinocephaloidea (Fig 3). The main morphological characteristics that distinguish *Q. mexicana* n. sp. from the other described species are the shape of epimerite and the size of the gamonts (Table 4). *Q. mexicana* n. sp. is the larger of the described species of *Quadruspinospora*, with a mean total length of 751.24 µm, while the rest of the species have average total lengths ranging from 146 to 489 µm. Comparison of the epimerite show that, for example, the epimerite of *Q. aelopii* is subspherical with 8 to 12 digitiform processes with a length of 15 to 20 µm, or in the case of *Q. acridii* the epimerite is composed of 10 to 13 digitiform processes with a length of 10 to 30 µm. In contrast the epimerite of *Q. mexicana* n. sp. is subspherical and rosette-shape with 7 to 12 digitiform processes and is slightly larger with a length of 21 to almost 43 µm. As we mentioned above, one of the more notorious characteristic that distinguishes *Q. mexicana* n. sp. from the other described species is the total length and width of the cells, which is the larger species belonging to genus *Quadruspinospora*. *Q. mexicana* n. sp. has a range of 271.2 to 1358.5 µm length and 93.1 to 471.9 µm width, in contrast *Q. aelopii* length range goes from 92.5 to 290 µm, and the width span from 40 to 125 µm. In the case of *Q. acridii*, the length of the cell goes from 70 to 720 µm and the width is not mentioned on the original description. The morphological and molecular evidence along with the new ultrastructural

evidence, host utilization, and the distribution of the host justify the establishment of the new species.

In conclusion, this is the first report of *A taeniopoda* n. sp. and *Q. mexicana* n. sp. parasitizing a species of the family Romaleidae. Both species represent the first records of gregarines parasitizing grasshoppers of Mexico, and for *Q. mexicana* n. sp. is the first report for the New World. The above findings show the gaps in the knowledge of eugregarine diversity in insects. For example, showing the lack of the study of gregarine fauna in Orthoptera, only 140 gregarine species reported for 450 of the almost 28,000 valid orthopteran species have been described, which represent around 1.5 % of the total orthopteran diversity (Cigliano et al. 2018; Desportes 2013). This data shows the necessity of carrying out more research focused on the diversity, which will help to resolve gregarine systematics and elucidate its evolution.

Taxonomic summary

Phylum Apicomplexa Levine, 1970

Subphylum Sporozoa Leuckart, 1879

Class Gregarinomorpha Grassé, 1953

Order Eugregarinorida Léger, 1900

Superfamily Gregarinoidea Labbé, 1899

Family Gregarinidae Labbé, 1899

Genus *Amoebogregarina* Kula & Clopton, 1999

***Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. Medina-Durán, Mayén-Estrada, Mariño-Pérez and Song**

Diagnosis. Trophozoites with a shallowly elliptoid to depressed deltoid metamorphic epimerite. Cell is divided into protomerite and deutomerite by a septum visible under optical microscope. Protomerite panduriform to broadly panduriform, constrained at the apex. Deutomerite oblong or elliptoid. Trophozoites on average 404.6 µm long and 124.7 µm wide. Gamonts were similar in shape than the trophozoites, but slightly bigger and with the epimerite absent or highly incorporated to the protomerite. Gamonts on average 524.6 µm long and 178.4 µm wide. Spherical nucleus located from the middle to the lower portion of the deutomerite with an average diameter of 50.5 µm. Association of gamonts in syzygy precocious, caudofrontal and biasociative. Gametocysts with a hyaline epicyst and dehiscence occurring through sporoducts. Doliform oocysts released through sporoducts in monete chains. Trophozoites, gamonts and associations stiff and capable of gliding movements. Cell surface of trophozoites composed by longitudinal and parallel epicytic folds running along longitudinal axis of the whole cell excluding the epimerite. Density of folds 6–7 epicytic folds/micron. Cells are yellowish under stereoscope.

Remarks. Although *A. nigra* gene sequence is very similar to *A. taeniopoda* n. sp., morphological dissimilarities, as well as host species and distribution differences justify the establishment of this new taxon.

DNA sequence. SSU rDNA sequence GenBank accession number MK181531.

Type locality. Host in croplands surrounded by cloud forest (20°59'32.99''N, 98°39'34.73''W, 1,526 masl) in Tlanchinol municipality, Hidalgo, Mexico, (Sierra Madre Oriental Province, Neotropical Region (Morrone, 2017).

Type habitat. Terrestrial.

Type host. *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Insecta, Orthoptera, Caelifera, Romaleidae).

Location in host. Trophozoites, gamonts and associations in midgut and gastric caecum.

Gametocysts in hindgut.

Type micrograph: Fig. 1C and H.

Hapantotype: Trophozoites, gamonts and associations on SEM stubs with gold sputter-coat have been deposited at the Department of Life Sciences, National History Museum of London under accession number XXXXX.

Zoobank Registration LSID: urn:lsid:zoobank.org:act:D85F30D8-0EBA-4E7F-A202-00D18B5EF8F1

Etymology: The specific epithet, *taeniopoda*, refers to the genus of the type host.

Superfamily Actinocephaloidea Léger, 1892

Actinocephalidae Léger, 1892

Genus *Quadruspinospora* Sarkar & Chakravarty, 1969

***Quadruspinospora mexicana* n. sp. Medina-Durán, Mayén-Estrada, Mariño-Pérez and Song**

Diagnosis. Trophozoites with a subspherical rosette-shape epimerite with 7–12 digitiform process. Cell is divided into protomerite and deutomerite by a septum visible under optical microscope. Protomerite luniform, and deutomerite was narrowly to very deeply obdeltoid, or narrowly obpyriform. Trophozoites on average 350.7 µm long and 124.2 µm wide. Gamonts were similar in shape than the trophozoites, but without the epimerite that is detached from the cell and considerably bigger. Gamonts on average 751.2 µm long and 239.6 µm wide. Spherical nucleus located in the middle portion of the deutomerite with an average diameter of 57.2 µm. Trophozoites and gamonts solitaires and the presyzygial association was not observed. Gametocysts with a thick gelatinous epicyst and dehiscence occurring through simple rupture of the cyst. Doliform oocysts with two spines in each pole released in mass. Trophozoites and gamonts flexible and capable of gliding movements. Cell surface of the trophozoites composed by longitudinal epicytic folds arranged in waves running along longitudinal axis of the whole cell. Density of folds 5 epicytic folds/micron. Cells are whitish under stereoscope.

DNA sequence. SSU rDNA sequence GenBank accession number MK181532.

Type locality. Host in croplands surrounded by cloud forest (20°59'32.99''N, 98°39'34.73''W, 1,526 masl) in Tlanchinol municipality, Hidalgo, Mexico, (Sierra Madre Oriental Province, Neotropical Region (Morrone, 2017).

Type habitat. Terrestrial.

Type host. *Taeniopoda centurio* (Drury, 1770) (Insecta, Orthoptera, Caelifera, Romaleidae).

Location in host. Trophozoites and gamonts in midgut and gastric caecum. Gametocysts in hindgut.

Type micrograph: Fig. 2B-E

Hapantotype: Trophozoites and gamonts on SEM stubs with gold sputter-coat have been deposited at the Department of Life Sciences, National History Museum of London under accession number XXXXX.

Zoobank Registration LSID: urn:lsid:zoobank.org:act:C6B56953-EA90-4352-9E6A-A79E081FA5DD

Etymology: The specific epithet, *mexicana*, reflects the geographical distribution of the species and the type host in Mexico.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was possible through funding from Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and CONACyT for the grant to JHMD for master's studies, Programa de Estímulos para Estudios de Posgrado (PAEP) for support to JHMD for a short research stay in Texas A&M University, USA, and IOS-1253493 to HS, the United State Department of Agriculture (Hatch Grant TEX0-1-6584 to HS) to support molecular data generation. We are thankful with Santiago Medina-Jiménez for his help in the location and collection of specimens. Biól. Margarita Reyes-Santos Laboratorio de Protozoología, UNAM, for her technical support, and MSc María Berenit Mendoza-Garfias for her technical assistance for SEM procedures and images of apicomplexan species.

LITERATURE CITED

- Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G. B., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Farmer, M. A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C. E., Lodge, D. J., Mann, D. G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Smirnov, A. V. & Spiegel, F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.*, 56:684–689
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwich, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. & Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59(5):429–493.
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukes, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Cepicka, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., Hoppenrath, M., James, T. Y., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D. J. G., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mann, D. G., Molera, R. M., Mitchell, E. A. D., Morrow, C., Park, J. S., Pawlowski, J. W., Powell, M. J., Richter, D. J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F. W., Cortes, G. T., Youssef, N., Zlatogursky, V. & Zhang, Q. 2018. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 66:4-119.
- Bhatia, B. L. & Setna, S. 1924. On some new cephaline gregarines. *Parasitology*, 16(3):279–288.
- Belton, P. & Grundfest, H. 1962. Potassium activation and K spikes in muscle fibers of mealworm larva (*Tenebrio molitor*). *Am. J. Physiol.*, 203:588–594.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M. & Shostak, A. W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83:575–583
- Cavalier-Smith, T. 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur. J. Protistol.*, 50:472–495.

- Cerritos, R. & Cano-Santanta, Z. 2008. Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: a comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Prot.*, 27:473–480.
- Cigliano, M.M., H. Braun, D.C. Eades & D. Otte. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [retrieval date: 27th-July-2018]. <<http://Orthoptera.SpeciesFile.org>>
- Clopton, R. E. & Lucarotti, C. J. 1997. *Leidyana canadensis* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) from larval Eastern Hemlock Looper, *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44:383–387.
- Clopton, R. E. 2002. Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Léger, 1900. In: Lee, J. J., Leedale, G., Patterson, D. y Bradbury, P. C. (Ed.). Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. p. 205–288.
- Clopton, R. E. 2004. Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comp. Parasitol.*, 71:130–140.
- Clopton, R. E. 2009. Phylogenetic relationships, evolution, and systematic revision of the septate gregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida: Septatorina). *Comp. Parasitol.*, 76:167–190.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9:772.
- De Jesús-Bonilla, V. S., Barrientos-Lozano, L. & Zaldívar-Riverón, A. 2017. Sequence-based species delineation and molecular phylogenetics of the transitional Neartic-Neotropical grasshopper genus *Taeniopoda* (Orthoptera, Romaleidae). *Syst. Biodivers.*, 15:600–617.
- Desportes, I. 2013. Systematics of terrestrial and fresh water gregarines. In: Desportes, I. & Schrével, J. (Ed.). Treatise on Zoology – Anatomy, taxonomy, biology: The gregarines, the early branching Apicomplexa. 2. Brill. Leiden, Netherlands. p. 377–671.
- Diakin, A., Wakeman, K. C. & Valigurová, A. 2017. Description of *Ganymedes yurii* sp. n. (Ganymedidae), a new gregarine species from the Antarctic amphipod *Gondogeneia* sp. (Crustacea). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 64:56–66.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32:1792–1797.
- Fontana, P., Buzzetti, F. M. & Mariño-Pérez, R. 2008. Grasshoppers, locusts, crickets and katydid of Mexico. WBA Books, Italy. p. 272.
- Haldar, D. P. & Chakraborty, N. 1976. Observations on the morphology and life-history of three new species of cephaline gregarines (Protozoa: Sporozoa) from grasshoppers in West Bengal. *Proc. Zool. Soc., Calcutta*, 29:73–81.
- Hoshide, H., 1958. Studies on the cephaline Gregarines of Japan. II. 3. Description of the members belonging to the families Didymophyidae, Actinocephalidae, Acanthosporidae, Stylocephalidae, Dactylophoridae. *Bull. Fac. Educ. Yamaguchi Univ.*, 8: 35–101.
- Iritani, D., Wakeman, K. C. & Leander, B. S. 2017. Molecular phylogenetic positions of two new marine gregarines (Apicomplexa) – *Paralecudina ananke* n. sp. and *Lecudina caspera* n. sp. – from the intestine of *Lumbrineris inflata* (Polychaeta) show patterns of co-evolution. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 65:211–219.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software

- platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28:1647–1649.
- Kula, R. R. & Clopton, R. E. 1999. *Amoebogregarina nigra* n. gen., n. comb. (Apicomplexa: Gregarinidae) from adult *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) in South Nebraska. *J. Parasitol.*, 85:321–325.
- Lange, C. E. & Cigliano, M. M. 2004. The life cycle of *Leidyana ampulla* sp. n. (Apicomplexa: Eugregarinorida: Leidyanaidae) in the grasshopper *Ronderosia bergi* (Stal) (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Acta Protozool.*, 43:81–87
- Lantová, L., Gosh, K., Svobodová, M., Braig, H. R., Rowton, E., Weina, P., Volf, P. & Votýpka, J. 2010. The life cycle and host specificity of *Psychodiella sergenti* n. sp. and *Ps. tobbi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) in sand flies *Phlebotomus sergenti* and *Ph. tobbi* (Diptera: Psychodidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 105: 182–189.
- Leander, B. S., Clopton, R. E. & Keeling, P. J. 2003. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:354–354.
- Levine, N. D. 1988. The protozoan phylum Apicomplexa. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. p. 203.
- Lipa, J. J. & Triggiani, O. 1989. *Gregarina nymphaeae* sp. n., a new eugregarine parasite of *Galerucella nymphaeae* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Protozool.*, 28(1):41–47.
- Miller, M. A., Holder, M. T., Vos, R., Mildford, P. R., Liebowitz, T., Chan, L., Hoover, P. & Warnow, T. 2011. The CIPRES Portals. CIPRESS http://www.phylo.org/ssub_sections/portal
- Morrone, J. J. 2017. Neotropical biogeography: Regionalization and evolution. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 282.
- Pushkala, K., Muthukumaravel, K., Johny, S., Muralirangan, M. C. & Sanjayan, K. P. 2000. Two new species of cephaline gregarines in grasshoppers (Insecta: Orthoptera) from Tamil Nadu, (India): *Retractocephalus dhawanii* sp. n. (Eugregarinida: Didymorphyidae) and *Hentschelia gilli* sp. n. (Eugregarinida: Dactylophoridae). *J. Orthopt. Res.*, 9:57–66
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.*, 67:901–904.
- 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. *Syst. Biol.*, 61:539–542.
- Rueckert, S. & Leander, B. S. 2010. Description of *Trichotokara nothriae* n. gen. et sp. (Apicomplexa, Lecudinidae) – An intestinal gregarine of *Nothria conchylega* (Polychaeta, Onuphidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 104:172–179.
- Rueckert, S. & Horák, A. 2017. Archigregarines of the English Channel revisited: New molecular data on *Selenidium* species including early described and new species and the uncertainties of phylogenetic relationships. *PLoSOne*, 12:e0187430
- Rueckert, S., Chantangsi, C. & Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:2681–2690.

- Rueckert, S. & Devetak, D. 2017. Gregarines (Apicomplexa, Gregarinasina) in psocids (Insecta, Psocoptera) including a new species description and their potential use as pest control agents. *Eur. J. Protistol.*, 60:60–67.
- Rueckert, S., Simdyanov, T. G., Aleoshin, V. V. & Leander, B. S. 2011. Identification of a Divergent Environmental DNA Sequence Clade Using the Phylogeny of Gregarine Parasites (Apicomplexa) from Crustacean Hosts. *PlosOne*, 6:e18163.
- Rueckert, S., Wakeman, K. C., Jenke-Kodama, H. & Leander, B. S. 2015. Molecular systematics of marine gregarine apicomplexans from Pacific tunicates, with descriptions of five novel species of *Lankesteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65:2598–2514.
- Sanabria-Urbán, S., Song, H., Oyama, K., González-Rodríguez, A. & Cueva-del-Castillo, R. 2017. Integrative taxonomy reveals cryptic diversity in neotropical grasshopper: taxonomy, phylogenetics, and evolution of the genus *Sphenarium* Charpentier, 1842 (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *Zootaxa*, 4274(1):1–86.
- Sarkar, A. & Chakravarty, M. 1969. Gregarines (Protozoa: Sporozoa) from insects. I. New cephaline gregarines of the family Actinocephalidae. *Proc. Zool. Soc., Calcutta*, 22:17–29.
- Seck, A. G. & Toguebaye, B. S. 1995. Etude taxonomique de quelques grégaires (Protozoa, Apicomplexa) parasites de criquets du Sénégal. Description d' *Actinocephalus pyrgomorphae* n. sp. *Bull. Inst. Fond. Afr. noire Cheikh Anta Diop, Dakar, sér. A*, 48:37–47.
- Schrével, J. y Desportes, I. 2013. Introduction: gregarines among Apicomplexa. In: Desportes, I. y Schrével, J. (Ed.). *Treatise on Zoology – Anatomy, taxonomy, biology: The gregarines, the early branching Apicomplexa*. Volume 1. Brill. Leiden, Holanda. p. 7–21.
- Semans, F. M. 1943. Protozoan parasites reported from the Orthoptera, with special reference to those of Ohio. IV. Classified list of the protozoan parasites of the Orthoptera of the world. Classes Mastigophora, Sarcodina, and Sporozoa. *Ohio J. Sci.*, 43: 221–234.
- Simdyanov, T. G., Guillou, L., Diakin, A. Y., Mikhailov, K. V., Schrével, J. and Aleoshin, V. V. 2017. A new view on the morphology and phylogeny of eugregarines suggested by the evidence from the gregarine *Ancora sagittata* (Leuckart, 1860) Labbé, 1899 (Apicomplexa: Eugregarinida). *PeerJ*, 5:e3354.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312–1213.
- Stork, N. E. 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annu. Rev. Entomol.*, 63:31–45.
- Théodorides, J., Ormières, R. & Jolivet, P. 1958. Eugrégaires parasites d'Orthoptéroïdes. *Explor. Parc Nat. Albert, Bruxelles*, 2:3–44.
- Théodorides, J., Desportes, I. & Jolivet, P. 1972. Grégaires de la Nouvelle-Guinée et des îles voisines. *Cahiers du Pacifique*, 16: 110–168.
- Théodorides, J., Desportes I. & Jolivet, P. 1975. Grégaires de la Thaïlande. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 50: 145–159.
- Votýpka, J., Lantová, L., Gosh, K., Braig, H. and Volf, P. 2009. Molecular characterization of gregarines from sand flies (Diptera: Psychodidae) and description of *Psychodiella* n. g. (Apicomplexa: Gregarinidae). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 56:583–588.

Wakeman, K. C. & Leander, B. S. 2013. Molecular phylogeny of marine gregarine parasites (Apicomplexa) from tube-forming polychaetes (Sabellariidae, Cirratulidae, and Serpulidae), including Descriptions of two new species of *Selenidium*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 60:514–525.

Wakeman, K. C., Yabuki, A., Fujikura, K., Tomikawa, K. & Horiguchi, T. 2018. Molecular phylogeny and Surface morphology of *Thiriobia hyperdolphinae* n. sp. and *Cephaloidophora oradareae* n. sp. (Gregarinasina, Apicomplexa) isolated from a deep sea *Oradarea* sp. (Amphipoda) in the West Pacific. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 65:372–381.

Yumnam, I. & Mohilal, N. 2017. A new species of *Quadruspinospora* Sarkar and Chakravarty, 1969 (Apicomplexa:Conoidasida) from Orthopteran Insects of Manipur, India. *J. Parasit. Dis.*, 41:313–317.

FIGURE LEGENDS

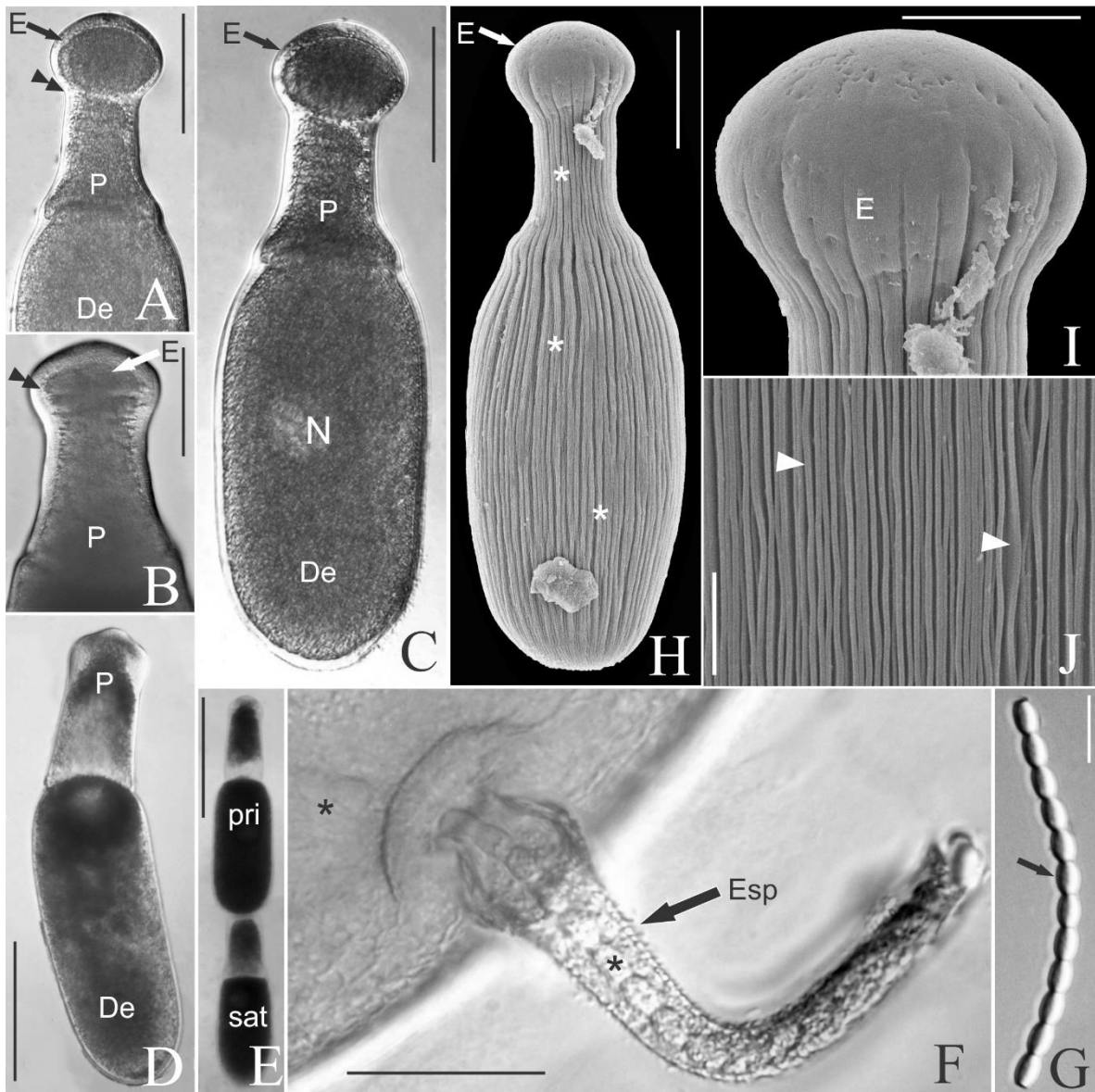


Figure 1. Differential interference contrast (DIC) light micrographs and scanning electron micrographs (SEM) showing the general morphology and surface ultrastructure of the life-cycle stages of *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. from the lubber grasshopper *Taeniopoda centurio* **A-C.** Trophozoites with three compartments: the epimerite (E), protomerite (P), and deutomerite (De). Process of assimilation of the epimerite in A and B is pointed with the double arrowhead. In C, the nucleus (N) is visible in the middle of the deutomerite. **D.** A gamont with the epimerite fully assimilated. The cell only retains the protomerite (p) and deutomerite (De). **E.** Association of gamonts in syzygy is caudofrontal and biassociative, conformed for a primite (pri) and a satellite (sat). **F.** Gametocyst dehiscence through sporoducts (Esp) releasing oocysts (asterisk). **G.** Doliform oocysts (arrow) released in monete chains. **H.** SEM of a trophozoite cell showing epicytic folds (asterisks) running longitudinally and parallel along the whole cell excluding the epimerite (E). **I.** Higher magnification SEM of the attachment zone of the epimerite (E). **J.** Higher magnification SEM of the longitudinal epicytic folds (arrowhead). Scale bars: A-C = 80 μm ; D = 100 μm ; E = 200 μm ; F = 30 μm ; G = 15 μm ; H = 90 μm ; I = 35 μm ; J = 2 μm .

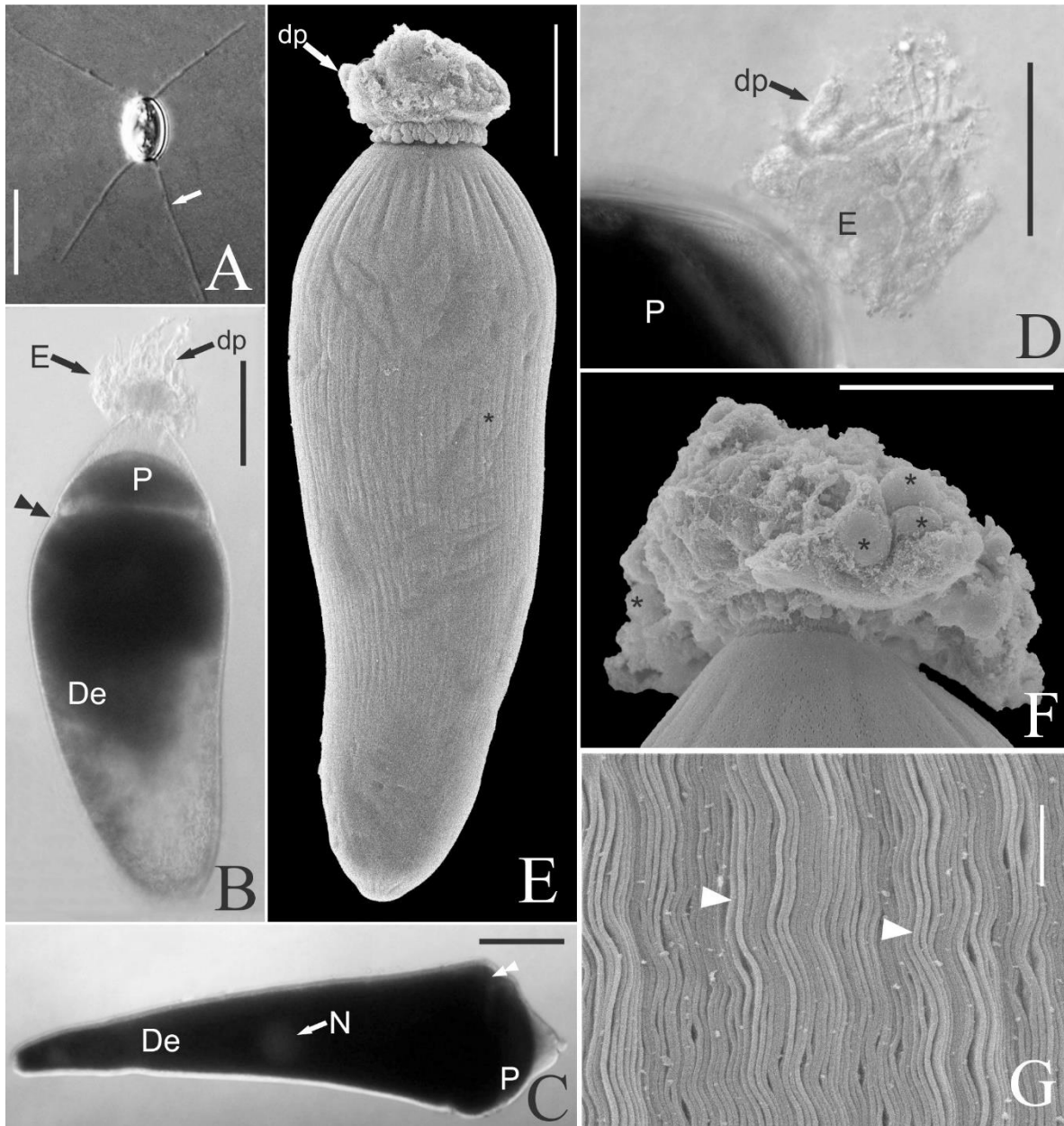
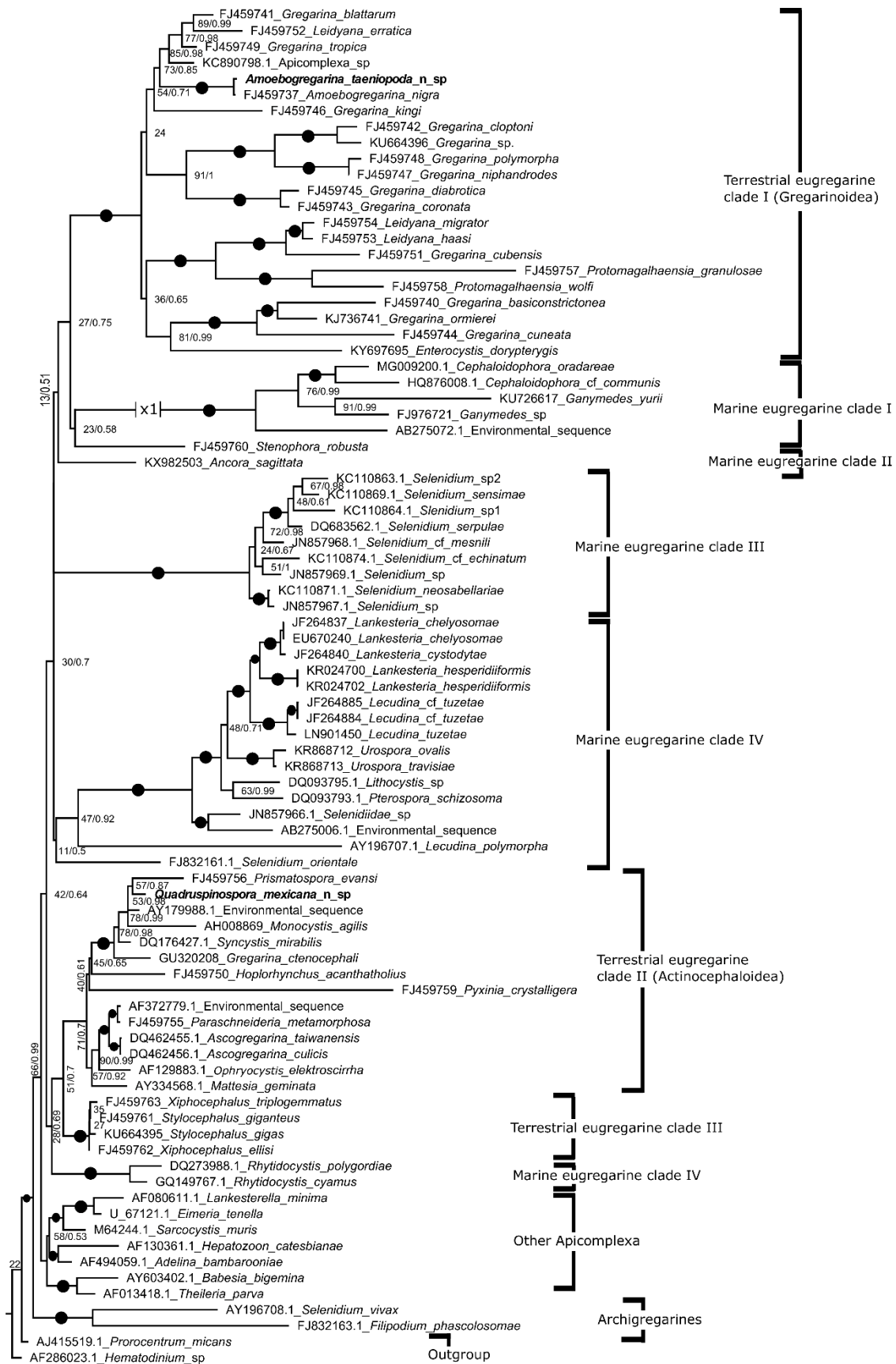


Figure 2. Differential interference contrast (DIC) light micrographs and scanning electron micrographs (SEM) showing the general morphology and surface ultrastructure of the life-cycle stages of *Quadruspinospora mexicana* n. sp. from the lubber grasshopper *Taeniopoda centurio* **A.** Doliform oocyst with two spines (arrow) in each pole. **B.** Trophozoites possess an epimerite (E) in the anterior part of the cell. The protomerite (P), and deutomerite (De) divided by a septum (double arrowhead). **C.** A gamont retaining only the deutomerite (De) and protomerite (P) divided by a septum (double arrowhead). The nucleus (N) is visible in the middle portion of the deutomerite. **D.** Epimerite (E) of a trophozoite showing digitiform process (dp). **E.** SEM of a trophozoite cell showing epimerite and a digitiform processes (dp). **F.** Higher magnification with SEM of the attachment zone of the epimerite with digitiform process (asterisk). **G.** Higher magnification SEM of the longitudinal epicytic folds arranged in waves (arrowhead). Scale bars: A = 10 μm ; B = 60 μm ; C = 100 μm ; D-E = 35 μm ; F = 25 μm ; G = 3 μm .



0.3

Figure 3. SSU rDNA phylogenetic tree derived from the Maximum Likelihood analysis from *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. and *Quadruspinospora mexicana* n. sp. plus 91 sequences of other gregarine taxa and other alveolates sequences as outgroup taxa. The tree was inferred using GTR+I+G substitution model. The numbers on the nodes show the bootstrap values. Dots denote the nodes where support values were higher than 95%. The sequences of *Amoebogregarina taeniopoda* n. sp. and *Quadruspinospora mexicana* n. sp. are highlighted in bold.