



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROSPECCIÓN MOLECULAR DE *SACCOCOELIOIDES*
LAMOTHEI AGUIRRE-MACEDO Y VIOLANTE-
GONZÁLEZ, 2008 (DIGENEA: HAPLOPORIDAE),
PARÁSITO DE PECES EN VERTIENTES DEL OCÉANO
PACÍFICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCELO TONATIUH GONZÁLEZ GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. LEOPOLDO ANDRADE GÓMEZ
Ciudad Universitaria, CD. MX.
2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado.

1. Datos del alumno

González

García

Marcelo Tonatiuh

5588053404

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

Número de cuenta 312325530

2. Datos del tutor

M. en C.

Leopoldo

Andrade

Gómez

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Rogelio

Aguilar

Aguilar

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Luis

García

Prieto

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Bárbara Pamela

Serrano

Flores

6. Datos del sinodal 4

Dr.

José Martín

García

Varela

7. Datos del trabajo escrito.

Prospección molecular de *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008 (Digenea: Haploporidae), parásito de peces en vertientes del océano pacífico.

79

2021

AGRADECIMIENTOS.

El proyecto de tesis fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN207219.

A la Facultad de Ciencias y la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa durante estos años.

A mi asesor, M. en C. Leopoldo Andrade Gómez por su tiempo y enseñanzas. Gracias por toda la dedicación y comprensión durante la realización de este trabajo. Gracias por siempre apoyarme, tanto para crecer académicamente como personalmente. Por todos sus consejos (en realidad solo 1) y todas las risas. Sobre todo, gracias por su amistad.

Al Dr. Martín García Varela, gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto. Gracias por todo el apoyo, las asesorías y todas las enseñanzas en el laboratorio, en campo y fuera de estos. Por todos sus comentarios, sus consejos y sus llamadas de atención. Gracias por toda la confianza brindada y por su amistad.

Al M. en C. Luis García Prieto por toda la ayuda brindada desde mi llegada a la Colección Nacional de Helminetos. Por formar parte de mi jurado, por todos los comentarios, sus enseñanzas y el apoyo brindado en este trabajo.

A la Dra. Bárbara Pamela Serrano Flores por aceptar formar parte de mi jurado y por los comentarios hechos para enriquecer este proyecto.

Al Dr. Rogelio Aguilar Aguilar por aceptar formar parte de mi jurado, por sus consejos y opiniones en este proyecto.

A la Dra. Mirza Patricia Ortega Olivares por su amistad brindada, por todos sus consejos y enseñanzas en el laboratorio. Por todos los momentos y las risas en el laboratorio. Por leer y darme sus opiniones en este trabajo.

Al Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante por ser mi profesor, mi compañero de carrera y mi amigo. Gracias por todos los consejos y todas las enseñanzas desde mi llegada a la Facultad de Ciencias y durante toda la carrera. Por todos esos momentos compartidos en practicas de campo, en salones de clase y fuera de ellos.

A los profesores del taller de parasitología de vertebrados dulceacuícolas. Al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por sus comentarios, consejos y el apoyo brindado. Al Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa por sus enseñanzas y consejos. Al M. en C. David Osorio Sarabia por sus consejos, apoyo y todas sus enseñanzas. A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por todas las enseñanzas en el Laboratorio Microscopia Electrónica.

A la Dra. Ana Lucia Sereno Uribe por todo su apoyo brindado, la confianza y enseñanzas durante todo este tiempo.

A la M. en C. Alejandra López Jiménez por sus consejos, por las platicas y las risas en el laboratorio.

A los amigos que encontré en la facultad y se convirtieron en una parte importante de mi vida. Gracias Adrián y Daniela por todas esas risas, por todas esas clases juntos y todo lo aprendido en el camino para estar donde estamos hoy.

En especial a Gabriela por haber sido mi compañera, mi amiga y mi persona. Gracias por crecer y soñar conmigo. Por enseñarme muchas cosas para crecer como persona. Gracias por acompañarme y por permitirme acompañarte en este camino.

Finalmente, agradezco infinitamente a mis padres, por todo el apoyo y el amor brindado, por siempre darme consejos para ser mejor. Por su paciencia y comprensión en cualquier momento. A mis hermanos por todos esos momentos juntos y todo el apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Características generales de los platelmintos	11
1.2. Clase Trematoda Rudolphi, 1808.....	11
1.3. Familia Haploporidae Nicoll, 1914.....	12
1.4. El género <i>Saccocoelioides</i> Szidat, 1954.....	15
1.5. Ciclo de vida de <i>Saccocoelioides</i> Szidat, 1954.....	22
1.6. <i>Saccocoelioides lamothei</i> Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008.....	22
1.7. Empleo de secuencias de DNA y filogenias moleculares en la familia Haploporidae.	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo general.	28
2.2. Objetivos particulares.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Colecta y revisión helmintológica de hospederos	29
3.2. Caracterización morfológica	35
3.3. Amplificación y secuenciación de DNA.....	35
3.4. Alineamientos y análisis filogenéticos.....	37
3.5. Construcción de red de haplotipo.....	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Clasificación taxonómica, distribución geográfica y espectro hospedatorio.....	40
4.2. Caracterización morfológica	41
4.3. Análisis de componentes principales (PCA).....	44
4.4. Comentarios	45
4.5. Análisis filogenéticos.....	48

4.6. Red de haplotipos.	54
5. DISCUSIÓN.....	57
5.1. Caracterización morfológica.	57
5.2. Caracterización molecular.	57
6. CONCLUSIONES.....	59
LITERATURA CITADA.	61
ANEXO 1. INDIVIDUOS Y CÓDIGOS DE LOS HAPLOTIPOS.	64
ANEXO 2. HOST-INDUCED PHENOTYPIC PLASTICITY IN <i>Saccocoelioides lamothei</i> AGUIRRE-MACEDO AND VIOLANTE-GONZÁLEZ, 2008 (DIGENEA: HAPLOPORIDAE) A PARASITE OF FRESHWATER, BRACKISH AND MARINE FISHES FROM MIDDLE AMERICA.	66

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIG.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS SUBFAMILIAS QUE COMPONEN A LA FAMILIA HAPLOPORIDAE RESULTADO DE UN ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA, CONCATENADO DE LOS GENES ITS2 Y 28S DEL DNAR, INCLUYENDO LAS PROBABILIDADES POSTERIORES (MODIFICADO DE ATOPKIN ET AL., 2019). EN COLOR MORADO SE MUESTRAN LAS ESPECIES DE LA SUBFAMILIA CHALCINOTREMATINAE.	14
FIG. 2. CICLO DE VIDA DE <i>SACCOCOELIOIDES TARPAZENSIS</i> (MODIFICADO DE DÍAZ Y GONZÁLEZ, 1990).	23
FIG. 3. ESQUEMA GENERAL DE <i>SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI</i> (A), SACO HERMAFRODITA (B). ABREVIATURAS: VENTOSA ORAL (VO), VENTOSA VENTRAL (VV), PREFARINGE (P), FARINGE (F), ESÓFAGO (E), CIEGOS INTESTINALES (CI), HUEVOS CON MIRACIDIO (HM), OVARIO (O), TESTÍCULO(T), GLÁNDULAS VITELÓGENAS (GV), SACO HERMAFRODITA (SH), MANCHAS OCULARES (MO), PORO GENITAL (PG), DUCTO HERMAFRODITA (DH), CÉLULAS PROSTÁTICAS (CP), METRATERMO (M), VESÍCULA SEMINAL EXTERNA (VSE), VESÍCULA SEMINAL INTERNA (VSI) (MODIFICADO DE AGUIRRE-MACEDO Y VIOLANTE-GONZÁLEZ, 2008).	24
FIG. 4. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES DEL DNA RIBOSOMAL EN EUKARIOTES, MOSTRANDO LAS UNIDADES REPETIDAS EN TÁNDEM (MODIFICADO DE EICKBUSH Y EICKBUSH 200.....	25
FIG. 5. MAPA GENÉTICO DEL DNA MITOCONDRIAL (MODIFICADO DE SOLANO ET AL. 2001).....	26
FIG. 6. MAPA DE LAS LOCALIDADES MUESTREADAS EN ESTE ESTUDIO, NÚMEROS DE LAS LOCALIDADES CORRESPONDEN CON EL CUADRO 2.....	30
FIG. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%, MOSTRANDO LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN <i>NAD1</i>	36
FIG. 8. MORFOTIPOS DE <i>SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI</i> A) MORFOTIPO 1 CORRESPONDE AL HOLOTIPO DEL HOSPEDERO TIPO <i>DORMITATOR LATIFRONS</i>), B) MORFOTIPO 2 DE <i>MUGIL CUREMA</i> EN PUERTO SAN JOSÉ, GUATEMALA, C) MORFOTIPO 3 DE <i>SICYDIUM</i> SP. EN RÍO TAMARINDO, NICARAGUA.	43
FIG. 9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE <i>SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI</i> (A) MORFOTIPO 2 DE <i>MUGIL CUREMA</i> EN PUERTO SAN JOSÉ, GUATEMALA Y (B) MORFOTIPO 3 DE <i>SICYDIUM MULTIPUNCTATUM</i> EN SAN JOSÉ DE LAS FLORES, OAXACA.	44
FIG. 10. DIAGRAMA DE DISPERSIÓN DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES APLICADO A LOS DATOS DE LAS 17 VARIABLES MORFOMETRICAS MEDIDAS A PARTIR DE 53 EJEMPLARES DE <i>SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI</i> . LAS FAMILIAS DE HOSPEDEROS ESTÁN MARCADAS CON DIFERENTES COLORES.....	46
FIG. 11. HIPÓTESIS FILOGENÉTICA DE INFERENCIA BAYESIANA OBTENIDO CON EL ALINEAMIENTO DEL GEN 28S. LOS NÚMEROS CERCANOS A LOS NODOS REPRESENTAN LAS PROBABILIDADES POSTERIORES Y LOS VALORES DE BOOTSTRAP. EN COLOR MORADO SE MUESTRA LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN ESTE ESTUDIO.....	50

FIG. 12. HIPÓTESIS FILOGENÉTICA OBTENIDA DEL ANÁLISIS DEL GEN MITOCONDRIAL *COX1* USANDO EL MÉTODO DE INFERENCIA BAYESIANA. LOS NÚMEROS CERCANOS A LOS NODOS INTERNOS MUESTRAN LOS VALORES DE PROBABILIDADES POSTERIORES Y LOS VALORES DE BOOTSTRAP. EN COLOR MORADO SE MUESTRAN LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN ESTE ESTUDIO.....51

FIG. 13. HIPÓTESIS FILOGENÉTICA DE INFERENCIA BAYESIANA OBTENIDO CON EL ALINEAMIENTO DE HAPLOTIPOS ÚNICOS DEL GEN *NAD1*. LOS NÚMEROS CERCANOS A LOS NODOS REPRESENTAN LAS PROBABILIDADES POSTERIORES. LOS NÚMEROS ENTRE PARÉNTESIS SON LA N DEL HAPLOTIPO, SEGUIDO POR CÓDIGO DE LAS LOCALIDADES (CUADRO 2).52

FIG. 14. RED DE HAPLOTIPOS OBTENIDA CON LAS SECUENCIAS DEL GEN *NAD1* PARA *SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI*. EL TAMAÑO DE LOS CÍRCULOS REPRESENTA EL NÚMERO DE INDIVIDUOS DE CADA HAPLOTIPO Y LAS DIVISIONES DENTRO DE LOS CÍRCULOS REPRESENTAN LA PROPORCIÓN DE INDIVIDUOS DE CADA FAMILIA DE HOSPEDEROS, INDICADAS CON COLORES DIFERENTES. LAS LETRAS DENTRO DE LOS CÍRCULOS CORRESPONDEN A LOS NOMBRES DE LOS HAPLOTIPOS (ANEXO 1). LOS PUNTOS NEGROS PEQUEÑOS INDICAN HAPLOTIPOS PERDIDOS O NO MUESTREADOS. LOS NÚMEROS SEÑALAN LOS PASOS MUTACIONALES POR ENCIMA DE TRES.....55

FIG. 15. MAPA DE HAPLOTIPOS. LOS CÍRCULOS EN EL MAPA INDICAN LAS PROPORCIONES DE LOS HAPLOTIPOS EN CADA LOCALIDAD. LOS CÍRCULOS BLANCOS REPRESENTAN LOS HAPLOTIPOS ÚNICOS EN LOCALIDADES. EL TAMAÑO DE LOS CÍRCULOS REPRESENTA EL NÚMERO DE INDIVIDUOS QUE LO CONFORMAN.56

ÍNDICE DE TABLAS.

CUADRO 1. COMPOSICIÓN ESPECÍFICA, ESPECTRO HOSPEDATORIO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO <i>SACCOCOELIOIDES</i>	18
CUADRO 2. LOCALIDADES, HOSPEDEROS COLECTADOS, COORDENADAS GEOGRÁFICAS Y GENES AMPLIFICADOS DE <i>SACCOCOELIOIDES</i> . LOS NÚMEROS CORRESPONDEN A LOS INDIVIDUOS QUE SE OBTUVIERON SECUENCIAS POR LOCALIDAD Y HOSPEDERO.....	31
CUADRO 3. NÚMEROS DE ACCESOS DE GENBANK PARA LOS GENES 28S Y <i>COX1</i> DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>SACCOCOELIOIDES</i>	38
CUADRO 4. MEDIDAS COMPARATIVAS DE LOS TRES MORFOTIPOS DE <i>SACCOCOELIOIDES LAMOTHEI</i> AGUIRRE- MACEDO Y VIOLANTE-GONZÁLEZ, 2008.....	47
CUADRO 5. DISTANCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>SACCOCOELIOIDES</i> CON EL MARCADOR 28S (POR DEBAJO DE LA DIAGONAL) Y EL GEN <i>COX1</i> (POR ENCIMA DE LA DIAGONAL). EN NEGRITAS SE REPRESENTA LA DIVERGENCIA GENÉTICA INTRAESPECÍFICA	53

RESUMEN

Saccocoelioides es el género más diverso de la subfamilia Chalcinotrematinae con 24 especies distribuidas en América. Las especies del género han sido reportadas parasitando a peces dulceacuícolas y marinos. *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008 es un parásito descrito del intestino del pez eleotrido *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844) en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. Individuos de *Saccocoelioides* sp. fueron colectados de 14 especies de peces de cinco familias (Eleotridae, Mugilidae, Gobiidae, Poeciliidae and Profundulidae) en 29 localidades en costas del Océano Pacífico en seis países. Los individuos fueron secuenciados con tres marcadores moleculares; 28S del DNA ribosomal nuclear; y *cox1* y *nad1* del DNA mitocondrial. Las nuevas secuencias fueron alineadas con secuencias disponibles en GenBank. Los análisis de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud fueron inferidos con los marcadores 28S y *cox1*. Estos mostraron que los individuos colectados pertenecen a *S. lamothei*. Posteriormente, se realizó una red de haplotipos con 119 secuencias del gen *nad1*, detectando 57 haplotipos divididos en tres grupos. Además, se realizó un análisis de componentes principales mostrando tres polígonos correspondiendo a cada familia de hospederos, sugiriendo plasticidad fenotípica inducida por el hospedero.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de los platelmintos.

Los platelmintos se caracterizan por ser organismos acelomados, aplanados dorsoventralmente, con simetría bilateral y por lo general, hermafroditas. El cuerpo de los platelmintos está cubierto por un tegumento sincitial cuya función es la absorción de nutrientes, agua y protección. El phylum incluye organismos parásitos y de vida libre (planarias). Los parásitos dentro del grupo se encuentran divididos en tres clases: Trematoda, Monogenea y Cestoda. Para México se han descrito 1, 015 especies de platelmintos parásitos. De éstos, 544 corresponden con la clase Trematoda, 269 a Monogenea y 202 a Cestoda. Este número representa el 7.4% de la diversidad mundial de Platyhelminthes (García-Prieto et al., 2014).

1.2. Clase Trematoda Rudolphi, 1808.

Los trematodos son organismos que presentan un cuerpo foliáceo provisto con una ventosa oral que rodea a la boca y una ventosa ventral, cuya función es la de fijación a su hospedero (García-Prieto et al., 2014; Lunaschi, 2017). La clase Trematoda se compone de dos subclases: Digenea Carus, 1963 y Aspidogastrea Faust y Tang, 1936. Los digeneos son el grupo más diverso de los platelmintos parásitos con más de 18, 000 especies incluidas en 2, 500 a 2, 700 géneros nominales (Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena, 2019).

Los miembros de la subclase Digenea se caracterizan por presentar un ciclo de vida indirecto, generalmente con dos o tres hospederos, de los cuales el definitivo es un vertebrado donde los digeneos alcanzan su madurez sexual. Los digeneos maduros liberan huevos al medio acuático a través de las heces del hospedero definitivo, donde eclosionan liberando al miracidio que penetra al primer hospedero intermediario (moluscos principalmente). Una ruta alterna que presentan, es que los huevos pueden ser ingeridos por el molusco y el miracidio se libera dentro de éste. El miracidio migra a un lugar específico dependiendo del hospedero intermediario (hepatopáncreas, gónada o manto). Una vez establecido, se transforma en esporocisto y por reproducción asexual se producen redias y posteriormente cercarias. Las cercarias

emergen del hospedero intermediario dispersándose en el ambiente. Algunas especies de digeneos requieren de un segundo hospedero intermediario (insectos acuáticos, crustáceos, peces o anfibios). En el segundo hospedero intermediario las cercarias, se desarrollan en metacercarias. A su vez, hay especies que no requieren de un segundo hospedero intermediario, sino que penetran directamente al hospedero definitivo. Posteriormente, en el hospedero definitivo, la metacercaria migra a un órgano específico donde se desarrollarán los adultos (Kostadinova y Pérez-del-Olmo, 2014; Lunaschi, 2017).

1.3. Familia Haploporidae Nicoll, 1914.

Los miembros de la superfamilia Haploporoidea Nicoll, 1914, parasitan peces teleósteos marinos, estuarinos y de agua dulce, principalmente herbívoros y omnívoros. La superfamilia está compuesta por dos familias: Haploporidae Nicoll, 1914 y Atractotrematidae Yamaguti, 1939 (Andres et al., 2018).

La familia Haploporidae es un grupo cosmopolita, cuyas características generales son: tegumento espinado, generalmente con espinas cortas; manchas oculares dispersas en la parte anterior del cuerpo de los adultos (las cercarias presentan una mancha ocular); ventosa oral en la parte terminal o subterminal del cuerpo, ventosa ventral en la parte media o anterior del cuerpo. Presentan prefaringe, faringe y esófago; el ciego intestinal puede ser bifurcado o simple. Las especies de la familia generalmente presentan un saco hermafrodita. Este órgano está constituido por órganos sexuales, tanto femeninos como masculinos. Es una estructura que encierra un ducto hermafrodita de longitud variable, una pars prostática, una vesícula seminal interna, así como la porción terminal del útero y un metratermo. En su mayoría, los miembros del grupo tienen un solo testículo, ocasionalmente dos, un poro genital que se localiza anterior a la ventosa ventral, un ovario pretesticular y un canal de Laurer. Los huevos son operculados, las glándulas vitelógenas tienen forma y localización variable dependiendo la subfamilia y la vesícula excretora puede tener forma Y-, I- o V (Overstreet y Curran, 2005).

Las clasificaciones taxonómicas se han basan principalmente en características morfológicas. Si bien esto ha servido para establecer una idea general de la diversidad biológica, estas características con frecuencia son incompletas ya que pueden ser efímeras o difíciles de interpretar. En el caso particular del estudio de la familia

Haploporidae, algunos rasgos morfológicos son propensos a sufrir alteraciones dependiendo de la forma de fijación (particularmente gónadas y vesícula seminal, ver Curran et al., 2018). Por tales motivos existe la tendencia reciente de complementar las clasificaciones taxonómicas incorporando datos moleculares, lo que con frecuencia modifica las conclusiones basadas exclusivamente en caracteres morfológicos. En la revisión taxonómica basada en morfología de la familia Haploporidae, Overstreet y Curran (2005) concluyeron que la familia estaba conformada por cuatro subfamilias. Sin embargo, con la incorporación de caracteres morfológicos y moleculares, actualmente la familia esta compuesta por 8 subfamilias: Haploporinae Nicoll, 1914; Megasoleninae Manter, 1935; Waretrematinae Srivastava, 1937; Chalcinotrematinae Overstreet y Curran, 2005; Forticulcitinae Blasco-Costa, Balbuena, Kostadinova y Olson, 2009; Cadenatellinae (Gibson y Bray, 1982) Andres, Pulis, Curran y Overstreet, 2018; Hapladeninae Andres, Pulis, Curran y Overstreet, 2018 y Pseudohaploporinae Atopkin, Beprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen y Chalenko, 2019 (Fig. 1) (Andres et al., 2018; Atopkin et al., 2019).

Particularmente, los miembros de la subfamilia Chalcinotrematinae son endoparásitos de peces de agua dulce y salobre. La subfamilia está compuesta por seis géneros (*Chalcinotrema* Freitas, 1948; *Paralecithobotrys* Freitas 1948; *Saccocoelioides* Szidat, 1954; *Megacoelium* Szidat, 1954; *Unicoelium* Thatcher y Dossman, 1975 e *Intromugil* Overstreet y Curran, 2005). La subfamilia está caracterizada morfológicamente por presentar un saco hermafrodita y numerosas glándulas vitelógenas que rodean a un solo testículo (Andrade-Gómez et al., 2019).

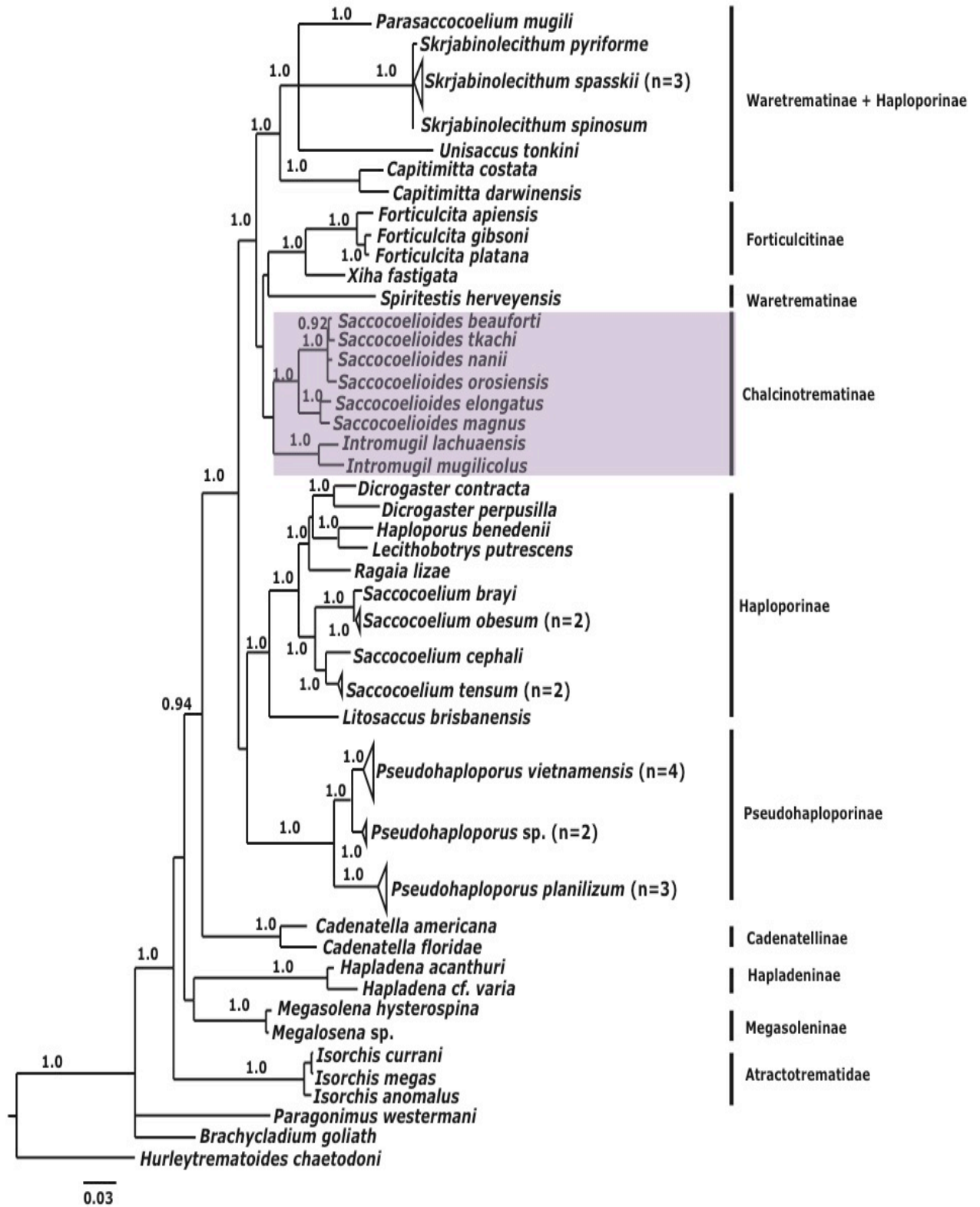


Fig.1. Relaciones filogenéticas de las subfamilias que componen a la familia Haploporidae resultado de un análisis de Inferencia Bayesiana, concatenado de los genes ITS2 y 28S del DNAr, incluyendo las probabilidades posteriores (Modificado de Atopkin et al., 2019). En color morado se muestran las especies de la subfamilia Chalcinotrematinae.

1.4. El género *Saccocoelioides* Szidat, 1954

Las especies del género *Saccocoelioides* Szidat, 1954 se caracterizan por tener un cuerpo fusiforme o elongado, manchas oculares difusas o concentradas, ventosa oral subterminal y ventral en la parte ecuatorial o ligeramente en la parte anterior del cuerpo. Esófago más largo que la faringe; prefaringe corta o ausente; saco hermafrodita elipsoidal; ciegos intestinales usualmente saculares. Testículo subesférico; ovario situado anterior al testículo y útero distribuido entre el esófago y posterior al testículo. Huevos maduros con un miracidio con manchas oculares, glándulas vitelógenas en ambos lados del cuerpo, desde el ovario hasta posterior del testículo (Overstreet y Curran, 2005).

Los miembros del género *Saccocoelioides* se han registrado asociados a 10 familias de peces dulceacuícolas y salobres distribuidos únicamente en América: (Poeciliidae, Mugilidae, Characidae, Cichlidae, Eleotridae, Gobiidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Curimatidae y Loricariidae) distribuidos en el continente americano (Lunaschi, 1984; Curran et al., 2018; Andrade-Gómez et al., 2017; 2019). El género es el más diverso de la subfamilia ya que contiene 24 especies reconocidas (Curran et al., 2018; Andrade-Gómez et al., 2019; Gallas y Utz., 2019) (Cuadro 1). Catorce se distribuyen en Sudamérica: ocho en Argentina (*Saccocoelioides nanii* Szidat, 1954 [especie tipo]; *Saccocoelioides elongatus* Szidat, 1954; *Saccocoelioides magniovatus* Szidat, 1954; *Saccocoelioides magnus* Szidat, 1954; *Saccocoelioides szidati* Travassos, Freitas y Kohn, 1969; *Saccocoelioides octavus* Szidat, 1970; *Saccocoelioides carolae* Lunaschi, 1984; *Saccocoelioides antonioi* Lunaschi, 1984), dos en Venezuela (*Saccocoelioides tarpazensis* Díaz y González, 1990; *Saccocoelioides tilapiae* Nasir y Gómez, 1976), dos en Brasil (*Saccocoelioides guaporense* (Thatcher, 1999) Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018; *Saccocoelioides bacilliformis* Gallas y Utz, 2019), una en Colombia (*Saccocoelioides ruedasueltensis* (Thatcher, 1978) Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018), y una en Chile (*Saccocoelioides overstreeti* Fernández-Bargiela, 1988). En Centro y Norteamérica se distribuyen nueve especies: dos en Estados Unidos *Saccocoelioides sogandaresi* Lumsden, 1963; *Saccocoelioides beauforti* (Hunter y Thomas, 1961), cuatro en México (*Saccocoelioides chauhani* Lamothe-Argumedo, 1974; *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008; *Saccocoelioides olmecae* Andrade-Gómez, Pinacho-Pinacho, Hernández-Orts,

Sereno-Uribe y García-Varela, 2016 y *Saccocoeloides macrospinosus* Andrade-Gómez, Sereno-Uribe y García-Varela, 2019), dos en Costa Rica (*Saccocoeloides tkachi* Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018 y *Saccocoeloides orosiensis* Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018), una en Nicaragua (*Saccocoeloides cichlidorum*, (Aguirre-Macedo y Scholz, 2005) Andrade-Gómez, Pinacho-Pinacho y García-Varela, 2017) y finalmente una especie se ha registrado en Puerto Rico, *Saccocoeloides agonostomus* Dyer, Bunkley-Williams, y Williams, 1999.

Saccocoeloides orosiensis es la especie del grupo que se ha reportado en el mayor número de familias de peces y con la distribución geográfica más amplia. Esta especie se ha registrado en 4 países: México, Honduras, Nicaragua y Costa Rica, parasitando a 3 familias de peces: Poeciliidae, Mugilidae y Cichlidae (Curran et al., 2018; Andrade-Gómez et al., 2019). No obstante, Curran et al. (2018) señalan que existe una serie de especies crípticas no descritas de este género en las costas de América, principalmente en Centroamérica.

Con respecto a la morfología, dentro de *Saccocoeloides* se reconocen dos morfotipos (diminuto y robusto); el diminuto es de cuerpo pequeño (<1.7 mm de largo) con numerosos huevos grandes, de longitud mayor que la faringe, y está conformado por 18 especies, *Saccocoeloides nanii* [especie tipo]; *S. tkachi*, *S. orosiensis*, *S. agonostomus*, *S. beauforti*, *S. carolae*, *S. chauhani*, *S. cichlidorum*, *S. lamothei*, *S. magniovatus*, *S. octavus*, *S. olmecae*, *S. overstreeti*, *S. sogandaresi*, *S. tarpazensis*, *S. tilapiae*, *S. ruedasueltensis* y *S. macrospinosus*. El segundo morfotipo se caracteriza por presentar un cuerpo de mayor tamaño (>1.7 mm de largo) con huevos más pequeños con respecto a la longitud de la faringe, en este morfotipo se encuentran 5 especies: *Saccocoeloides elongatus*, *S. magnus*, *S. antonioi*, *S. guaporense* y *S. szidati* (Curran et al., 2018; Andrade-Gómez et al., 2019).

Curran et al., (2018) mencionan que son pocas las características morfológicas que son útiles para distinguir entre especies del morfotipo diminuto, y que son necesarias herramientas moleculares para diferenciarlas. Esto se confirma analizando la comparación que estos autores realizaron entre las especies *S. tkachi* y *S. orosiensis* con miembros del morfotipo diminuto, en donde la mayoría de las características morfológicas que usualmente distinguen a estos trematodos se sobreponen. Por lo anterior, es claro que la adecuada delimitación entre las especies

del género depende de una buena caracterización morfológica completada con el empleo de marcadores moleculares. En este sentido, este trabajo pretende realizar la revisión taxonómica, determinar la variabilidad morfológica y analizar regiones del genoma mitocondrial para precisar los límites taxonómicos de la especie *Saccocoelioides lamothei*.

Cuadro 1. Composición específica, espectro hospedatorio y distribución geográfica del género *Saccocoelioides*.

ESPECIE	LOCALIDAD TIPO	HOSPEDERO TIPO	OTROS HOSPEDEROS	OTRAS LOCALIDADES
<i>S. macrospinosus</i>	México Andrade-Gómez, Sereno-Uribe y García-Varela, 2019	<i>Poecilia catemaconis</i> (Miller)	<i>Mugil curema</i> (Valenciennes)	
<i>S. tkachi</i>	Costa Rica Curran, Pulis, Andres, y Overstreet, 2018	<i>Astyanax aeneus</i> (Günther)	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier) <i>Astyanax aeneus</i> (Günther)	Nicaragua
<i>S. orosiensis</i>	Costa Rica Curran, Pulis, Andres, y Overstreet, 2018	<i>Poeciliia gillii</i> (Kner)	<i>Poecilia mexicana</i> (Steindachner) <i>Poeciliia gillii</i> (Kner) <i>Poecilia</i> sp. <i>Poecilia formosa</i> (Girard) <i>Poecilia sphenops</i> (Valenciennes) <i>Poeciliopsis balsas</i> (Hubbs) <i>Poecilia mexicana</i> (Steindachner) <i>Poecilia</i> sp. <i>Pseudoxiphophorus</i> sp. <i>Xiphophorus hellerii</i> (Heckel) <i>Vieja bifasciata</i> (Steindachner) <i>Thorichthys helleri</i> (Steindachner) <i>Herichthys cyanoguttatus</i> (Baird y Girard) <i>Mugil curema</i> (Valenciennes) <i>Vieja maculicauda</i> (Regan)	Nicaragua Honduras México

<i>S. ruedasuelensis</i> (Thatcher, 1978) Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018	Colombia	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier)		
<i>S. guaporensis</i> (Thatcher, 1999) Curran, Pulis, Andres y Overstreet, 2018	Brasil	<i>Prochilodus nigricans</i> (Spix y Agassi)		
<i>S. cichlidorum</i> (Aguirre-Macedo y Scholz 2005) Andrade-Gómez, Pinacho-Pinacho y García-Varela, 2017	Nicaragua	<i>Vieja maculicauda</i> (Regan)	<i>Hypsophrys nematopus</i> (Günther) <i>Hypsophrys nicaraguensis</i> (Günther) <i>Amatitlania nigrofasciata</i> (Günther) <i>Amatitlania septemfasciata</i> (Regan) <i>Amatitlania siquia</i> (Schmitter-Soto) <i>Amphilophus lyonsi</i> (Gosse) <i>Cribroheros alfari</i> (Meek)	Costa Rica
<i>S. olmecae</i> Andrade-Gómez, Pinacho-Pinacho, Hernández-Orts, Sereno-Uribe y García-Varela, 2017	México	<i>Dormitator maculatus</i> (Bloch)	<i>Gambusia yucatanana</i> (Regan)	
<i>S. lamothei</i> Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008	México	<i>Dormitator latrifons</i> (Richardson)	<i>Poeciliia gilli</i> (Kner) Poecilido no identificado	Costa Rica Nicaragua
<i>S. agonostomus</i> Dyer, Bunkley-Williams, y Williams, 1999	Puerto Rico	<i>Dajaus monticola</i> (Bancroft)	<i>Sicydium plumieri</i> (Bloch)	

<i>S. tarpazensis</i> Díaz y González, 1990	Venezuela	<i>Poecilia reticulata</i> (Peters)		
<i>S. overstreeti</i> Fernández-Bargiela, 1988	Chile	<i>Mugil cephalus</i> (Linnaeus)		
<i>S. antonioi</i> Lunaschi, 1984	Argentina	<i>Cyphocharax platanus</i> (Günther)		
<i>S. carolae</i> Lunaschi, 1984	Argentina	<i>Australoheros facetus</i> (Jenyns)		
<i>S. tilapiae</i> Nasir y Gómez, 1976	Venezuela	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Peters)		
<i>S. chauhani</i> Lamothe-Argumedo, 1974	México	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier)	<i>Astyanax aeneus</i> (Günther)	México
<i>S. octavus</i> Szidat, 1970	Argentina	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier)		
<i>S. szidati</i> Travassos, Freitas y Kohn, 1969	Argentina	<i>Loricaria spinulifera</i> (Thomas, RappyPy-Daniel)		
<i>S. sogandaresi</i> Lumsden, 1963	Estados Unidos	<i>Poecilia latipinna</i> (Lesueur)	<i>Poecilia formosa</i> (Girard)	Estados Unidos
<i>S. beauforti</i> Hunter y Thomas, 1961	Estados Unidos	<i>Mugil cephalus</i> (Linnaeus)		
<i>S. elongatus</i> Szidat, 1954	Argentina	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes)		
<i>S. magnus</i>	Argentina	<i>Cyphocharax voga</i> (Hensel)		

Szidat, 1954

S. magniovatus

Argentina

Leporinus obtusidens

Szidat, 1954

(Valenciennes)

S. nanii

Argentina

Prochilodus

lineatus

Szidat, 1954

(Valenciennes)

1.5. Ciclo de vida de *Saccocoelioides* Szidat, 1954.

El ciclo de este haploporidos es indirecto y está basado en la especie *S. tarpazensis*, el cual se obtuvo de forma experimental (Fig. 2). Estos organismos utilizan caracoles como hospederos intermediarios y peces como hospederos definitivos. El adulto se desarrolla en el intestino de los peces donde se lleva a cabo la reproducción sexual; éstos producen huevos que son depositados en el medio acuático donde eclosionan los miracidios y son ingeridos por el hospedero intermediario. En las glándulas digestivas del hospedero intermediario los miracidios forman el siguiente estadio de manera asexual: las redias, las cuales contienen entre 7- 17 cercarias. Las cercarias emergen del caracol al medio donde se enquistan en la superficie del agua. En los quistes recién formados están las metacercarias y éstas deben ser ingeridas por el hospedero definitivo donde se completa su ciclo de vida (Díaz y González, 1990).

1.6. *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008.

Aguirre-Macedo y Violante-González (2008) describieron *Saccocoelioides lamothei* del intestino de *Dormitator latifrons* Richardson (Eleotridae) de las lagunas costeras de Tres Palos y Coyuca, en el estado de Guerrero, México. Las características que utilizaron para describir esta especie fueron: cuerpo piriforme ligeramente alargado con numerosos huevos; tegumento totalmente espinado, con espinas pequeñas, reminiscencias de manchas oculares dispersas en la parte anterior del cuerpo desde la apertura oral hasta la mitad del saco hermafrodita; ventosa ventral anterior a la parte media del cuerpo. Testículo ovalado a esférico en la parte posterior del cuerpo. Ovario ovalado a cilíndrico postecuatorial entre la ventosa ventral y el testículo. Las glándulas vitelógenas con forma y tamaño irregular, distribuidos a ambos lados del cuerpo, desde la región del ovario hasta la parte terminal del mismo. Esta especie mide entre 420 a 850 μm de largo y 240 a 510 μm de ancho (Fig. 3). *Saccocoelioides lamothei* se encuentra en el grupo del morfotipo diminuto (Curran et al., 2018).

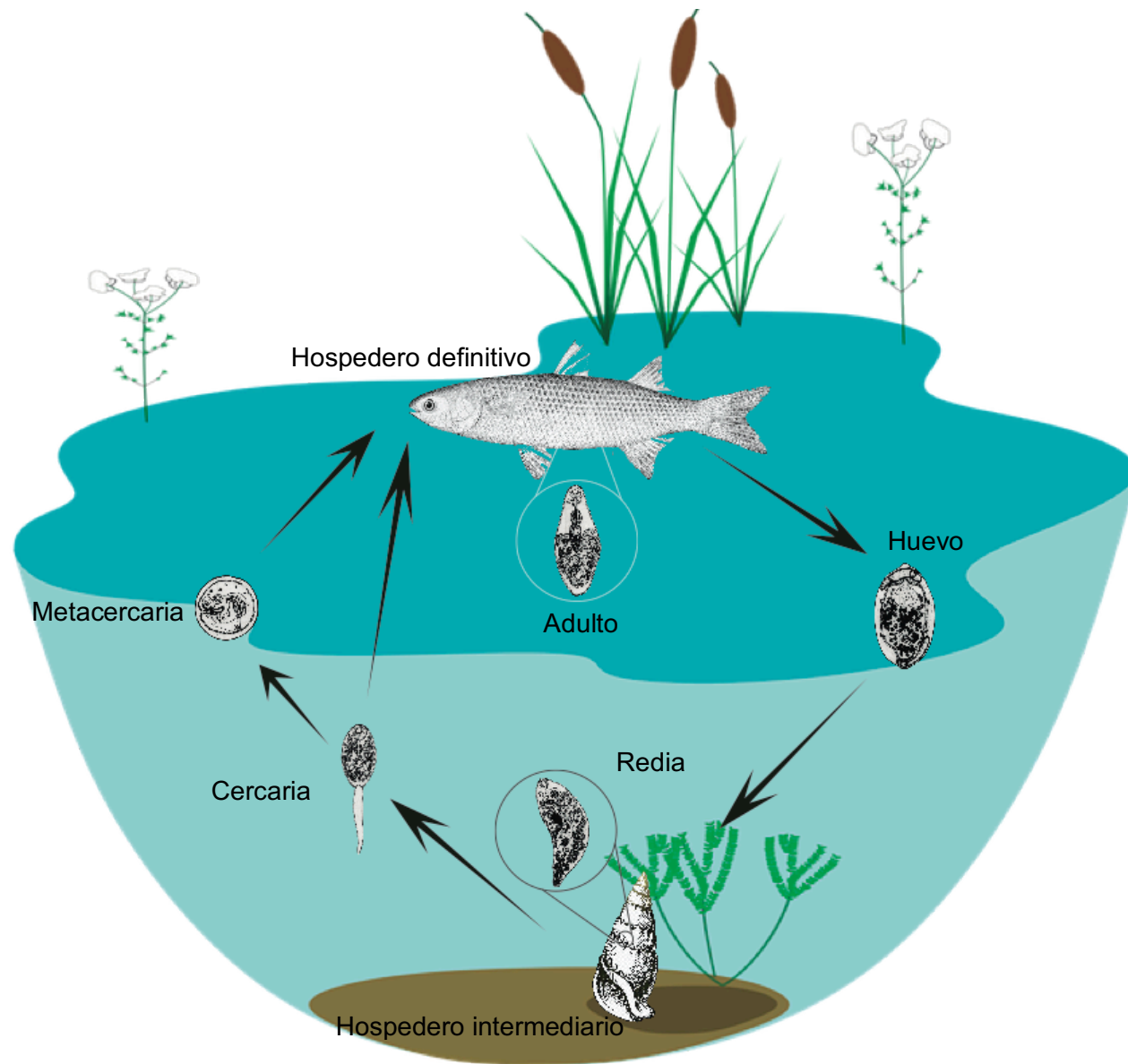
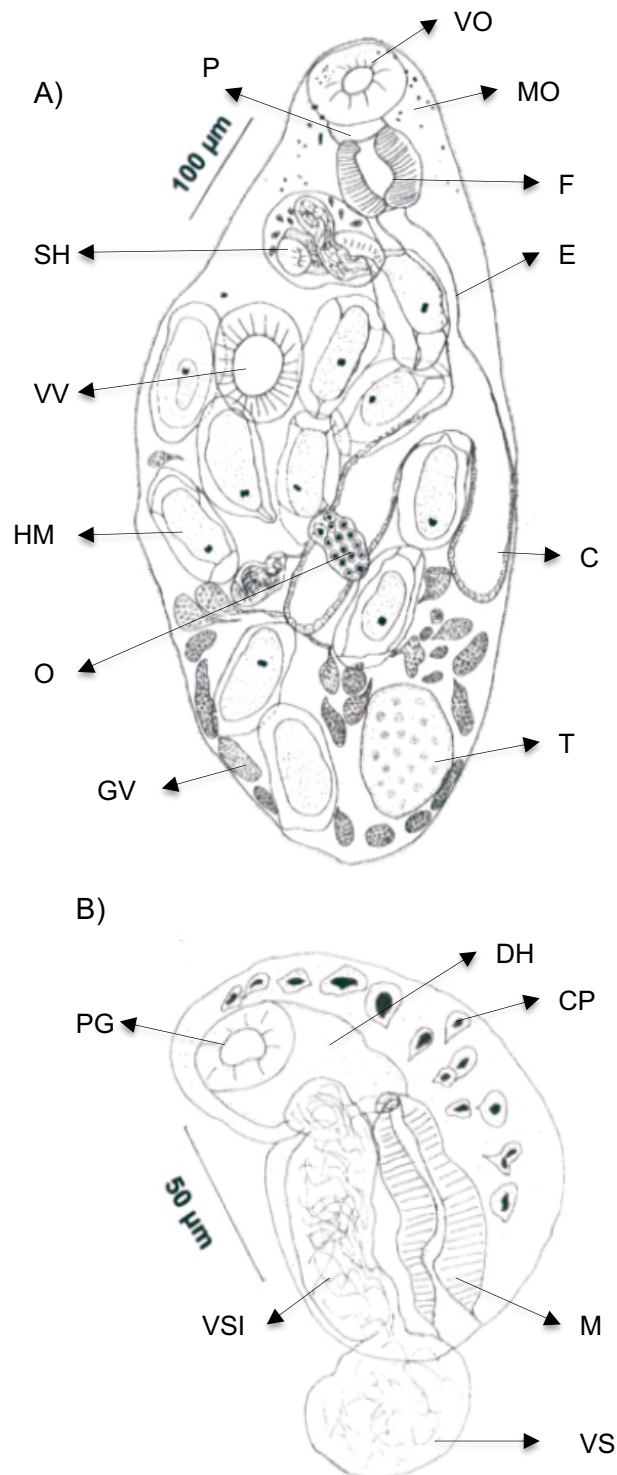


Fig. 2. Ciclo de vida de *Saccocoelioides tarpazensis* (Modificado de Díaz y González, 1990).



**Fig. 3. Esquema general de *Saccocoelioides lamothei* (A), saco hermafrodita (B).
 Abreviaturas: Ventosa oral (VO), Ventosa ventral (VV), Prefaringe (P), Faringe (F), Esófago (E), Ciegos intestinales (CI), Huevos con miracidio (HM), Ovario (O), Testículo(T), Glándulas vitelógenas (GV), Saco hermafrodita (SH), Manchas oculares (MO), Poro genital (PG), Ducto hermafrodita (DH), Células prostáticas (CP), Metratermo (M), Vesícula seminal externa (VSE), Vesícula seminal interna (VSI) (Modificado de Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008).**

1.7. Empleo de secuencias de DNA y filogenias moleculares en la familia Haploporidae.

La identificación de las especies en trematodos se basa principalmente en rasgos morfológicos y en características ecológicas. No obstante, actualmente se utilizan secuencias de DNA mitocondrial y nuclear, en combinación con caracteres morfológicos y ecológicos (Eickbush y Eickbush, 2007). En los platelmintos se han usado marcadores moleculares como genes nucleares y mitocondriales para delimitar familias, especies e incluso poblaciones. Los genes más utilizados y conservados son aquellos que codifican el DNA ribosomal. Estos genes están divididos en tres regiones (18S, 5.8S, 28S) separadas por dos regiones espaciadoras ITS1 e ITS2 (espaciador transcrito interno); estas unidades están organizadas en grandes matrices en tándem (Fig. 4) (Eickbush y Eickbush, 2007).

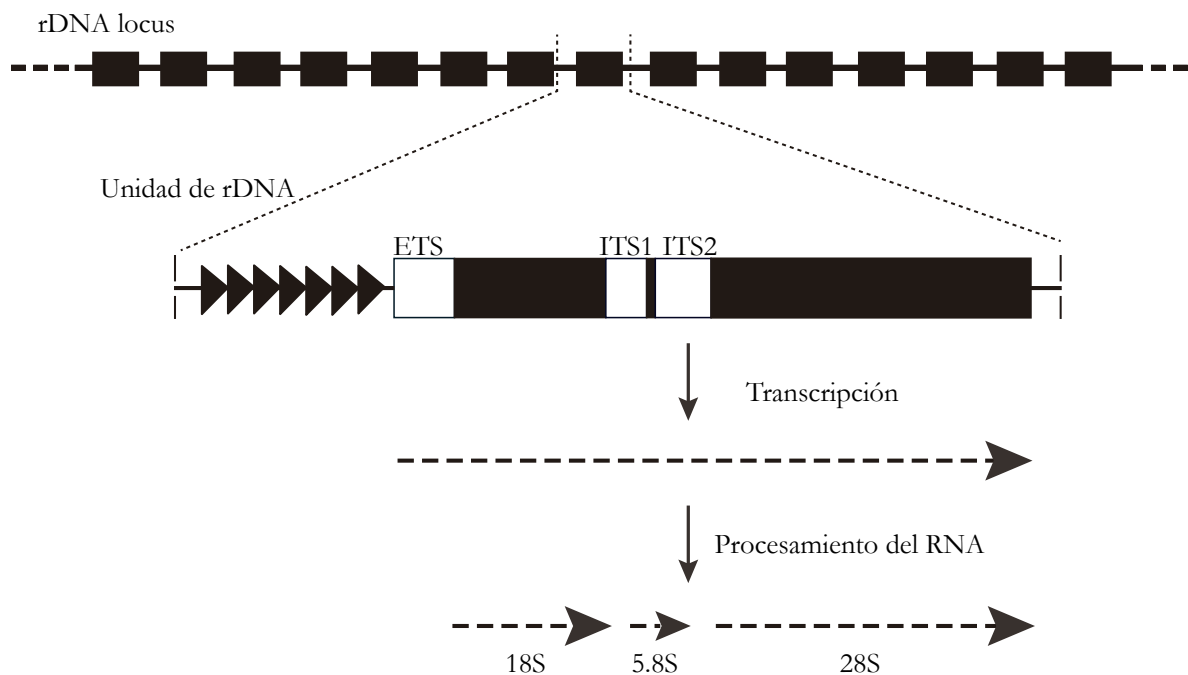


Fig. 4. Organización de los genes del DNA ribosomal en Eucariontes, mostrando las unidades repetidas en tándem (Modificado de Eickbush y Eickbush 200

El DNA mitocondrial es una molécula circular de doble hélice con un aproximado de 37 genes dependiendo del organismo: 13 genes están relacionados con la cadena respiratoria, 22 asociados a RNA de transferencia y 2 al RNA ribosomal (Fig. 5) (Gómez-Tatay et al., 2017).

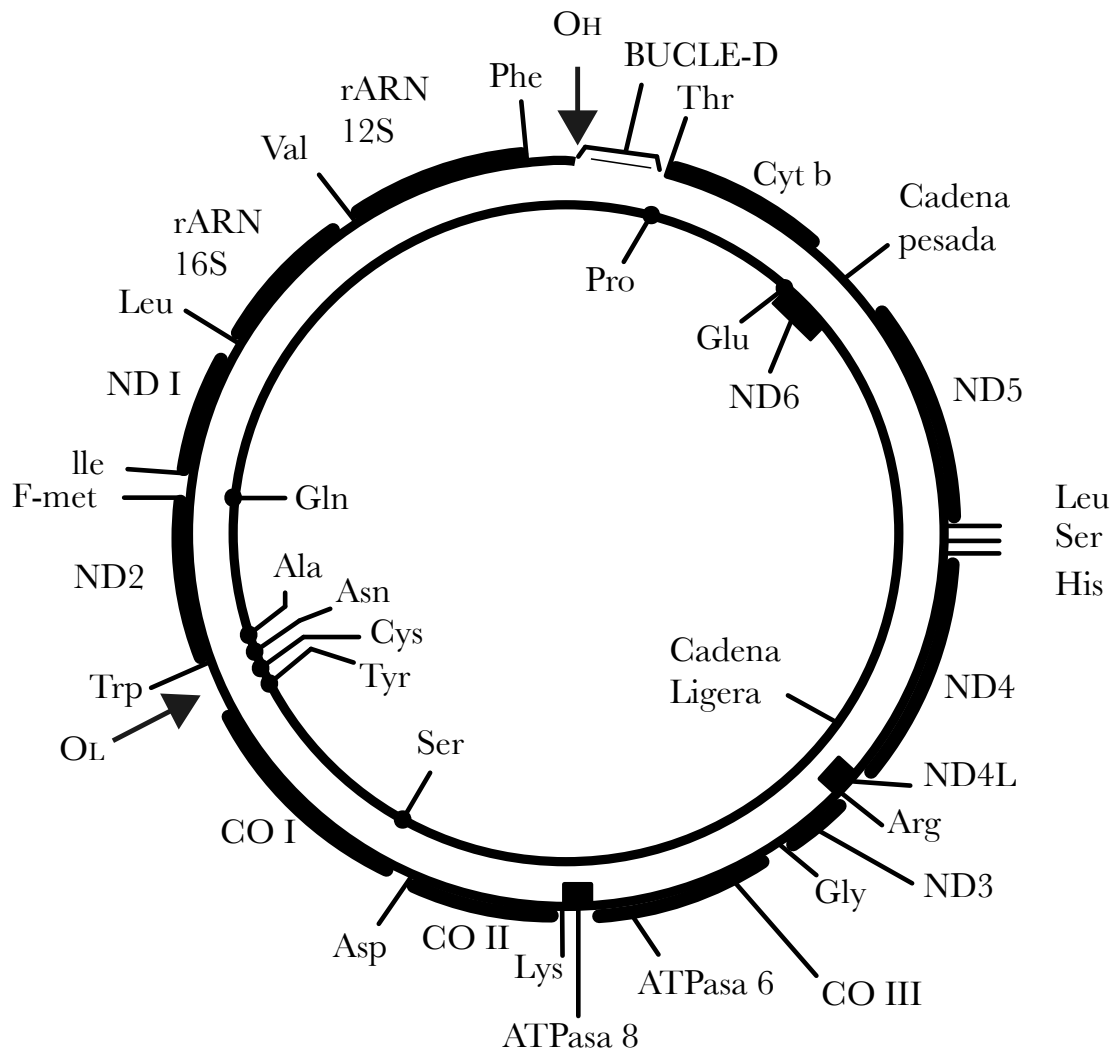


Fig. 5. Mapa genético del DNA mitocondrial (Modificado de Solano et al. 2001).

El uso de secuencias de DNA ribosomal ha ayudado a los taxónomos a reevaluar la clasificación de la Familia Haploporidae (Curran et al., 2018). Dentro de la subfamilia Chalcinotrematinae, hay pocas especies que están representadas con características morfológicas y moleculares. Actualmente, de los seis géneros sólo dos: *Intromugil* y *Saccocoelioides*, han sido analizados con secuencias de la subunidad grande (LSU) y espaciador transcrito interno 2 (ITS2) del DNA ribosomal nuclear (rDNA) (Curran et al., 2018). Sin embargo, recientemente se utilizó un marcador molecular con una alta tasa

de sustitución, el citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*) del DNA mitocondrial. La combinación de marcadores mitocondriales y nucleares, junto con características morfológicas y ecológicas fueron utilizados para delimitar especies y géneros dentro de la familia Haploporidae (Andrade-Gómez et al., 2019).

Por otra parte, en otros grupos de digeneos, el gen mitocondrial de la subunidad 1 NADH deshidrogenasa (*nad1*), fue empleado recientemente para analizar la variación genética intraespecífica y generar una red de haplotipos (Aghayan et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Realizar la caracterización taxonómica de *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008 (Haploporidae), a lo largo de su distribución geográfica empleando caracteres morfológicos, moleculares y ecológicos.

2.2. Objetivos particulares.

Determinar la variabilidad morfológica de los ejemplares de *Saccocoelioides lamothei* colectados en diferentes hospederos en México y Centroamérica.

Redefinir las características diagnósticas de la especie.

Analizar regiones del genoma mitocondrial, estimar las divergencias genéticas y generar una red de haplotipos para determinar la composición genética de las poblaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Colecta y revisión helmintológica de hospederos.

Para el desarrollo de este trabajo, se estudiaron ejemplares colectados, además ejemplares depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se colectaron peces de diferentes familias, entre los años 2010 al 2019 en ríos, lagos y lagunas de 29 localidades de México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica (Fig. 6, Cuadro 2). La captura de los hospederos se realizó utilizando 2 artes de pesca: electropesca y atarraya. Los hospederos colectados pertenecen a 13 especies correspondientes a 5 familias de peces: Eleotridae, Mugilidae, Gobiidae, Poeciliidae y Profundulidae (Cuadro 2). Los peces fueron mantenidos vivos con ayuda de aireadores y transportados a un laboratorio provisional, donde se les realizó un examen helmintológico. El intestino de los hospederos fue revisado en cajas Petri con solución salina al 0.75% bajo microscopio estereoscópico en busca de haploporidos. Cada parásito encontrado fue colocado en otra caja Petri con solución salina al 0.75%. Para su estudio morfológico, algunos ejemplares fueron fijados en formol caliente a punto de ebullición al 4% y otros fueron preservados directamente en viales con alcohol etílico al 100% para el estudio molecular de los organismos

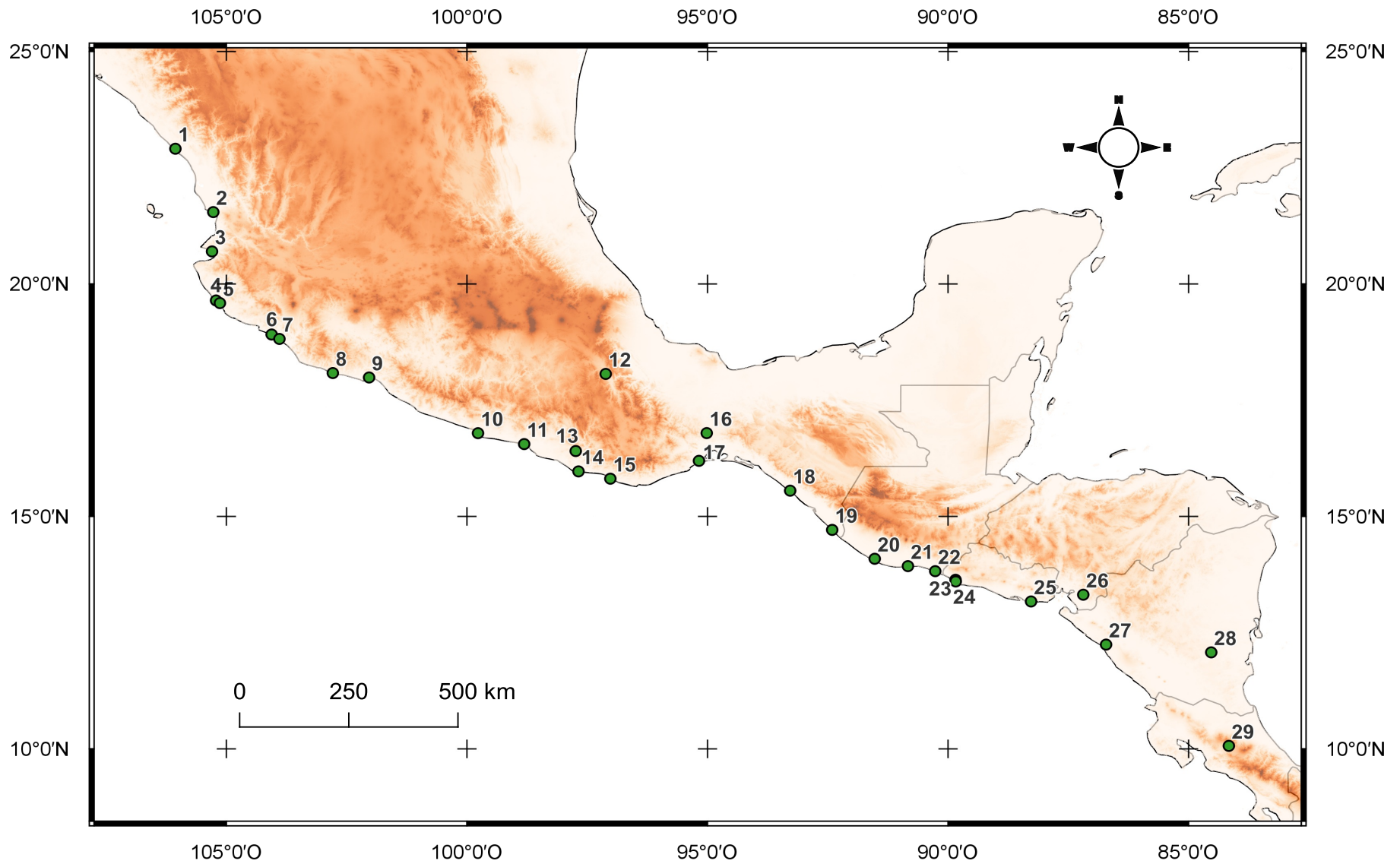


Fig. 6. Mapa de las localidades muestreadas en este estudio, números de las localidades corresponden con el Cuadro 2.

Cuadro 2. Localidades, hospederos colectados, coordenadas geográficas y genes amplificados de *Saccocoelioides*. Los números corresponden a los individuos que se obtuvieron secuencias por localidad y hospedero.

LOCALIDADES	HOSPEDEROS	FAMILIA	COORDENADAS	28S	Cox 1	Nad1
MÉXICO						
1. El Huizache, Sinaloa (Hzc)	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	22° 54' 29'' N 106° 3' 39.48'' O	1	1	3
2. La Tovar, Nayarit (Tvr)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	21° 32' 43.6'' N	1	-	4
	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	105° 16' 24.1'' O	1	-	3
3. Nuevo Vallarta, Nayarit (Nvt)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	20° 41' 57'' N	3	3	5
			105° 17' 56.7'' O			
4. Quémara, Jalisco (Qmr)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	19° 38' 40.2'' N	2	2	3
	<i>Mugil sp.</i>	Mugilidae	105° 12' 55.5'' O	2	1	2
5. Playa Punta Pérula, Jalisco (Ppp)	<i>Mugil sp.</i>	Mugilidae	19° 35' 16.7'' N	1	-	1
			105° 8' 7.526'' O			
6. Cuyutlán, Colima (Cyl)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	18° 54' 45.39'' N	2	4	5
			104° 3' 36.74'' O			
7. Estero Tecuanillo, Colima (Etc)	<i>Mugil sp.</i>	Mugilidae	18° 49' 2.348'' N	1	1	1
			103° 53' 54.704'' O			
8. Barra de Nexpa, Michoacán (Bnx)	<i>Mugil sp.</i>	Mugilidae	18° 5' 0.24'' N	2	-	4
			102° 47' 18.366'' O			

9. Playa Las Peñitas, Guerrero (Pts)	<i>Mugil sp.</i>	Mugilidae	17° 59' 16.718'' N 102° 2' 5.014'' O	12	8	12
10. Tres Palos, Guerrero (Tsp)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae		-	-	2
11. Marquelia, Guerrero (Mrq)	<i>Mugil curema</i>	Mugilidae	16° 33' 19.75'' N 98° 48' 38.89'' O	2	-	2
12. Río Salado, Oaxaca (Sld)	<i>Poeciliopsis gracilis</i> <i>Poecilia sphenops</i>	Poeciliidae	18° 3' 52.7'' N 97° 6' 58.399'' O	3 1	1 1	2 1
13. San José de las Flores, Oaxaca (Sjf)	<i>Sicydium multipunctatum</i> <i>Profundulus sp.</i>	Gobiidae Profundulidae	16° 24' 21.5'' N 97° 44' 22.599'' O	3 3	2 -	3 3
14. Chacahua, Oaxaca (Cch)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	15° 58' 4.73'' N 97° 40' 55.44'' O	6	2	10
15. Barra de Navidad, Oaxaca (Nvd)	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	15° 48' 39'' N 97° 1' 10.999'' O	2	1	2
16. Matías Romero, Oaxaca (Rmr)	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	16° 47' 30.8'' N 95° 0' 59'' O	1	1	2
17. La Ventosa, Oaxaca (Vts)	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	16° 11' 42.67'' N 95° 10' 40.789'' O	-	1	3
18. Pijijiapan, Chiapas (Chp)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	15° 33' 12'' N 93° 16' 55.999'' O	-	1	2
19. Puerto Chiapas, Chiapas (Pch)	<i>Mugil sp.</i>	Eleotridae Mugilidae	14° 42' 36.46'' N 92° 24' 30.909'' O	1	-	5

GUATEMALA						
20. Río Nahualate (Rnh)	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	14° 5' 19.039'' N	2	-	2
	<i>Poeciliopsis gracilis</i>		91° 31' 28.877'' O	2	1	2
21. Puerto San José (Psj)	<i>Mugil curema</i>	Mugilidae	13° 55' 49.375'' N	2	2	2
			90° 50' 2.984'' O			
22. Las Lisas (Lls)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	13° 49' 19.942'' N	1	1	2
			90° 16' 2.229'' O			
EL SALVADOR						
23. Río Sunza (Rsz)	<i>Sicydium</i> sp.	Gobiidae	13° 38' 14'' N	2	-	2
	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	89° 50' 40.999'' O	1	1	2
24. Río Banderas (Rbd)	<i>Awaous banana</i>	Gobiidae	13° 36' 2.618'' N	2	1	2
	<i>Dajaus monticola</i>	Mugilidae	89° 50' 26.197'' O	2	2	3
25. Bahía de San Antonio (Bsa)	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	13° 10' 12.657'' N	3	3	3
			88° 16' 29.869'' O			
HONDURAS						
26. Río Choluteca, Honduras (Rcc)	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	13° 18' 57'' N	2	1	2
			87° 11' 23.999'' O			
NICARAGUA						
27. Río Tamarindo, Nicaragua (Rtm)	<i>Sicydium</i> sp.	Gobiidae	12° 14' 33.82'' N	2	2	3
	<i>Dajaus monticola</i>	Mugilidae	86° 42' 57.26'' O	1	-	2
	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae		2	1	2

28. Río Mico, Nicaragua (Rmc)	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	12° 4' 32.016'' N 86° 31' 47.956'' O	1	1	3
COSTA RICA						
29. Río Ciruelas (Rcr)	<i>Sicydium salvini</i>	Gobiidae	10° 3' 51.576' N	2	-	2
	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	84° 9' 49.646'' O	1	1	2

3.2. Caracterización morfológica.

Los ejemplares preservados en formol al 4% se tiñeron con paracarmin de Mayer, se deshidrataron en una serie gradual de etanol y aclarados con salicilato de metilo. Se montaron en portaobjetos y cubreobjetos con bálsamo de Canadá. Este material se examinó bajo un microscopio Leica DM 1000 LED (Leica, Wetzlar, Alemania) con el fin de tomar medidas utilizando el software del microscopio Leica Application Suite. Asimismo, se esquematizó y realizó las descripciones de organismos colectados en distintos hospederos. Las medidas están dadas en micrones (μm). Se utilizaron 17 rasgos morfométricos para describir los patrones de variación de los datos mediante un análisis de componentes principales (PCA). Para el análisis se usaron 55 ejemplares de *Saccocoelioides lamothei*, incluyendo el holotipo CNHE-5920. El análisis (PCA) se realizó en el programa R versión 3.5.3.

Algunos ejemplares fueron analizados bajo un microscopio electrónico de barrido (MEB). Estos individuos fueron deshidratados en una serie gradual de etanol, secados a punto crítico con CO_2 , montadas en porta muestras con cinta de carbono, recubiertas con una mezcla de oro-paladio y observadas en un microscopio Hitachi S-2469N del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

3.3. Amplificación y secuenciación de DNA.

Para la obtención de DNA, los haploporidos preservados en alcohol etílico al 100% fueron colocados individualmente en tubos eppendorf de 0.5 ml, el cual contenía 100 μl de solución para digestión formada por 100 mM Tris HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 10% Sarkosil, 0.1 mg/ml de proteinasa K y se digirieron durante una noche a 56° C. Posterior a la digestión, el DNA se extrajo del sobrenadante con el reactivo DNazol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La amplificación de los dominios del DNA ribosomal nuclear (DNAr) D1–D3 del gen 28S se realizó usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes oligonucleótidos: Forward (5'–AGCGGAGGAAAAGAACTAA–3') y Reverse (5'–CAGCTATCCTGAGGGAAAC–3'). Adicionalmente, las regiones mitocondriales del

DNA, citocromo c oxidasa subunidad 1 (*cox1*) y subunidad 1 de nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (*nad1*) fueron amplificadas. Para *cox1* se usaron: Forward (5'-TGTAACGACGGCCAGTTTWCITTRGATCATAAG-3') y Reverse (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'). Los oligonucleótidos para *nad1* fueron Forward y (5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3') y Reverse (5'-CTTCAGCCTCAGCATAAT-3').

Cada reacción de PCR (12.5 μ l) contenía 0.5 μ l de cada oligonucleótido (Forward y Reverse), 0.125 μ l de My Taq DNA Polymerase (Bioline USA Inc.), 2.5 μ l de My Taq Reaction Buffer (Bioline USA Inc.), 7.5 μ l de agua y 2 μ l de DNA genómico. Los parámetros del ciclo de PCR para las amplificaciones de cada gen incluyeron: desnaturalización del DNA a 94° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C durante un minuto; la temperatura de alineamiento para los genes 28S y *nad1* fue de 50° C, mientras que para *cox1* fue de 40° C, todos ellos por un minuto y extensión a 72° C durante un minuto y posterior a los 35 ciclos, un último ciclo de extensión a 72° C durante 10 minutos.

Para corroborar el amplificado de los productos de PCR, se tomaron 2 μ l de la reacción PCR y se le añadió 6 μ l de agua y 2 μ l de colorante BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) el cual facilita la visualización de las muestras de DNA. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% con 4 μ l de SYBR™ Safe DNA Gel Stain en un buffer de Tris-Boratos EDTA (TBE 1X) (Fig. 7). Los productos de PCR positivos fueron preparados para la reacción de secuenciación

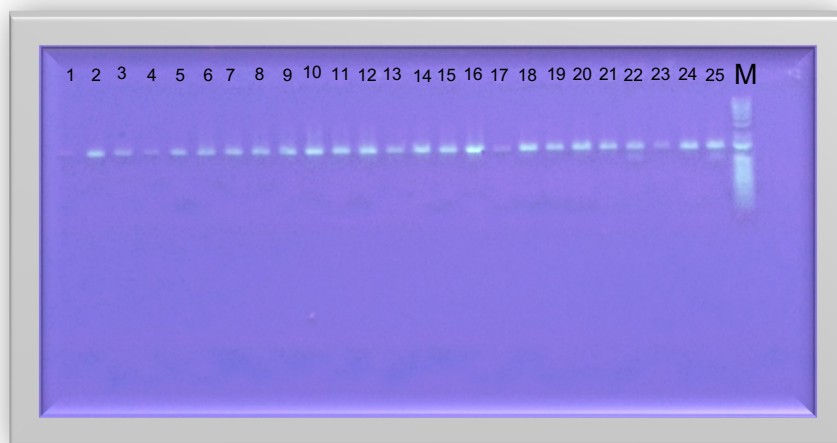


Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR del gen *nad1*.

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los oligonucleótidos iniciales para *cox1* y *nad1*; para la región 28S se usaron dos oligonucleótidos internos: 503 (5'–CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG–3') y 504 (5'–CGTCTTGAAACACGGACTAAGG–3'), con ABI Big Dye (Applied Biosystems, Boston, Massachusetts). Las secuencias forward y reverse (electroferogramas) de cada gen, fueron ensambladas y revisadas utilizando el software Codoncode Aligner versión 5.0.2 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts).

3.4. Alineamientos y análisis filogenéticos.

Las secuencias generadas en el presente estudio de los genes 28S y *cox1* se alinearon con secuencias de GenBank. Las secuencias obtenidas corresponden a las especies del género que cuentan con secuencias disponibles: 15 secuencias que representan a 12 especies de *Saccocoelioides* para el gen 28S y 10 secuencias que representan 7 especies de *Saccocoelioides* del gen *cox1* (Cuadro 3).

Las secuencias de GenBank se alinearon con las obtenidas durante este trabajo utilizando el programa Seaview versión 4.3.0 con el software MUSCLE. Se realizaron análisis filogenéticos con dos métodos probabilísticos, Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (ML) en CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). EL análisis de ML se realizó con la herramienta RAXML-HPC2 en XSEDE versión 8.2.12 con 1000 pseudoreplicas de bootstraps. La estimación de los árboles filogenéticos para cada gen con IB se realizó con la herramienta MrBayes en XSEDE versión 3.2.2. Se llevó a cabo una corrida con cuatro cadenas de Markov (MCMC) con 10 millones de generaciones y un muestreo cada 1000 generaciones. Los árboles de inicio fueron eliminados en un 25%. Los árboles fueron editados en el programa FigTree versión 1.3.1. (Rambaut, 2006).

Para estimar las divergencias genéticas entre las especies de *Saccocoelioides* y entre las muestras de *Saccocoelioides lamothei* se utilizaron distancias “*p*” no corregidas con el programa MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013).

Cuadro 3. Números de accesos de GenBank para los genes 28S y cox1 de las especies del género *Saccocoelioides*.

ESPECIE	HOSPEDERO	LOCALIDAD	28S	Cox1
<i>Saccocoelioides lamothei</i>	<i>Dormitator latifrons</i>	Tres Palos, Guerrero	KU061120	MK749571
<i>Saccocoelioides lamothei</i>	<i>Dormitator latifrons</i>	Tres Palos, Guerrero	KU061121	MK749572
<i>Saccocoelioides lamothei</i>	<i>Dormitator latifrons</i>	Chacahua, Oaxaca	KU061124	-
<i>Saccocoelioides lamothei</i>	<i>Poecilia gillii</i>	Río Tempisque, Costa Rica	MG925110	-
<i>Saccocoelioides chauhani</i>	<i>Astyanax aeneus</i>	Catemaco, Veracruz	KU061117	MK749589
<i>Saccocoelioides olmecae</i>	<i>Dormitator maculatus</i>	Tamiahua, Veracruz	KU061128	MK749584
<i>Saccocoelioides macrospinosus</i>	<i>Mugil curema</i>	Alvarado, Veracruz	MK749169	-
<i>Saccocoelioides macrospinosus</i>	<i>Poeciliopsis catemaco</i>	Catemaco, Veracruz	-	MK749566
<i>Saccocoelioides orosiensis</i>	<i>Poecilia gillii</i>	Río Ciruelas, Costa Rica	-	MK749590
<i>Saccocoelioides orosiensis</i>	<i>Poecilia sphenops</i>	Tlacotalpan, Veracruz	-	MK749602
<i>Saccocoelioides tkachi</i>	<i>Astyanax aeneus</i>	Palo de Arquito, Nicaragua	-	MK749577
<i>Saccocoelioides tkachi</i>	<i>Astyanax aeneus</i>	Río Tempisque, Costa Rica	MG925122	-
<i>Saccocoelioides tkachi</i>	<i>Astyanax aeneus</i>	Río Pérez, Nicaragua	-	MK749578
<i>Saccocoelioides cichlidorum</i>	<i>Archocentrus nigrofasciatus</i>	Río Animas, Costa Rica	MG925106	-
<i>Saccocoelioides cichlidorum</i>	<i>Paraneetroplus maculicauda</i>	Río Torsuani, Nicaragua	-	MK749574

<i>Saccocoelioides magnus</i>	<i>Cyphocarynx voga</i>	Río de la Plata, Argentina	MG925112	-
<i>Saccocoelioides elongatus</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	Río de la Plata, Argentina	MG925108	-
<i>Saccocoelioides orosiensis</i>	<i>Poecilia gillii</i>	Río Tempisque, Costa Rica	MG925116	-
<i>Saccocoelioides nanii</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	Los Talas, Argentina	MG925114	-
<i>Saccocoelioides sogandaresi</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Texas, Estados Unidos	MG925120	-
<i>Saccocoelioides beauforti</i>	<i>Mugil cephalus</i>	Carolina del Norte, Estados Unidos	MG925104	-

3.5. Construcción de red de haplotipo.

La red de median-joining se estimó con el programa NETWORK 4.2.0., (Bandelt et al., 1999) con base en las secuencias del gen *nad1*. Este método comienza con árboles de expansión mínimos combinados dentro de una sola red y para reducir la longitud del árbol, se agregan vectores (secuencias consenso). Además, se empleó el programa TCS versión 1.21 (Clement et al., 2000) para inferir las redes de haplotipos utilizando parsimonia (Templeton et al., 1992) con una confianza de 95%.

El mapa de distribución de los haplotipos se realizó en el programa Qgis 3.6 con base en los datos de georreferenciación de los sitios de colecta.

4. RESULTADOS

Tres morfotipos de *Saccocoeloides lamothei* fueron encontrados parasitando tres familias de peces en vertientes del Océano Pacífico en cinco países de Centroamérica.

4.1. Clasificación taxonómica, distribución geográfica y espectro hospedatorio.

PHYLUM Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

CLASE Trematoda Rudolphi, 1808

SUBCLASE Digenea Carus, 1863

ORDEN Plagiorchiida LaRue, 1957

SUBORDEN Haploporata Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena, 2019

SUPERFAMILIA Haploporoidea Nicoll, 1914

FAMILIA Haploporidae Nicoll, 1914

SUBFAMILIA Chalcinotrematinae Overstreet y Curran, 2005

GÉNERO *Saccocoeloides* Szidat, 1954

ESPECIE *Saccocoeloides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008

Sitio de infección: Intestino

Hospedero tipo: *Dormitator latifrons* (Eleotridae).

Otros hospederos: *Dajaus monticola*, *Mugil cephalus*, *Mugil curema*, *Mugil* sp. (Mugilidae), *Poecilia gillii*, *Poecilia mexicana*, *Poecilia sphenops*, *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae), *Awaous banana*, *Sicydium multipunctatum*, *Sicydium salvini*, *Sicydium* sp. (Gobiidae) y *Profundulus* sp. (Profundulidae)

Localidad tipo: Tres Palos, Guerrero, México.

Otras localidades: Sinaloa: El Huizache; Nayarit: La Tovar y Nuevo Vallarta; Jalisco: Quémaro y Playa Punta Pérula; Colima: Cuyutlán y Estero Tecuanillo; Michoacán: Barra de Nexpa; Guerrero: Playa las Peñitas y Marquelia; Oaxaca: Río Salado, San José de las Flores, Chacahua, Barra Navidad, Matías Romero y Ensenada la Ventosa; Chiapas: Pijijiapan y Puerto Chiapas; Guatemala: Río Nahualate, Puerto San José y Las Lisas; El Salvador: Río Sunza, Río Banderas y Bahía de San Antonio; Honduras: Río Choluteca; Nicaragua: Río Tamarindo; Costa Rica: Río Ciruelas.

4.2. Caracterización morfológica.

El primer morfotipo corresponde con *Saccocoelioides lamothei* colectado en Tres Palos, Guerrero, del pez electrodo *Dormitator latifrons* por Aguirre-Macedo y Violante-González en 2008. La descripción morfológica y el esquema se basan en el holotipo de la especie (Fig. 8A). Cuerpo totalmente espinado, espinas cortas. Prefaringe corta. Faringe ovalada a esférica. Manchas oculares a los lados del cuerpo, entre la faringe y la ventosa oral. Ventosa oral subterminal. Ventosa ventral pre-ecuatorial. Esófago alargado hasta la altura de la ventosa ventral. Ciegos intestinales saculares, alargados, terminando anteriores al testículo. Testículo ovalado a esférico en la parte posterior del cuerpo. Ovario ovalado, irregular, situado entre el testículo y la ventosa ventral. Saco hermafrodita elongado, entre la faringe y la ventosa ventral. Poro genital anterior a la ventosa ventral. Vesícula seminal interna y externa con forma de saco alargado. Receptáculo seminal ovalado, en la parte terminal de los ciegos intestinales. Huevos operculados, numerosos, algunos conteniendo miracidios. Vitelógenas irregulares, desde la parte media del cuerpo hasta la parte terminal del mismo.

Durante este trabajo fueron reconocidos 2 morfotipos adicionales. El morfotipo 2 fue colectado en *Mugil curema* en el Puerto San José, Costa Rica (Fig. 8B). Las características de este morfotipo se basan en 15 individuos. Cuerpo espinado con un menor número de espinas en la parte posterior (Fig. 9A). Manchas oculares a los costados del cuerpo entre la faringe y la ventosa. Prefaringe alargada. Faringe esférica. Ventosa oral subterminal y ventosa ventral anterior a la parte media del cuerpo. Esófago alargado alcanzando la ventosa ventral. Ciegos saculares y alargados; terminando en la parte anterior del testículo. Testículo localizado en la parte posterior del cuerpo entre el extremo final de los ciegos y la parte posterior la vesícula excretora. Ovario ovalado, se encuentra entre la ventosa ventral y el testículo. Saco hermafrodita ovalado a esférico, anterior a la parte media del cuerpo. Poro genital anterior a la ventosa ventral. Vesícula seminal externa ovalada. Numerosos huevos operculados y ovals. Vitelógenas numerosas, formadas por folículos irregulares, desde la región posterior del cuerpo hasta el ovario. Vesícula excretora con forma de Y; poro excretor terminal.

El morfotipo 3 fue colectado en Río Tamarindo, Nicaragua de *Sicydium* sp. (Fig. 8C). Las características de este morfotipo se basan en 23 individuos. Cuerpo enteramente espinado, con menor abundancia de espinas desde la ventosa ventral hasta la parte terminal del cuerpo (Fig. 9B). Ventosa oral subterminal. Manchas oculares a los costados del cuerpo entre la faringe y la ventosa oral. Faringe ovalada, casi del diámetro de la ventosa ventral. Prefaringe ausente. Ventosa ventral pre-ecuatorial. Esófago extendido hasta la porción media del cuerpo. Ciegos intestinales saculares, que terminan en el extremo posterior del testículo. Testículo ovalado a esférico, posterior a la ventosa ventral y anterior a la parte final de los ciegos. Ovario ovalado, irregular, entre la ventosa ventral y contiguo al testículo. Saco hermafrodita en la parte media del cuerpo, ovalado. Poro genital anterior a la ventosa ventral. Vitelógenas escasas, irregulares, distribuidas a los costados del cuerpo, entre el saco hermafrodita y la parte anterior del testículo. Pocos huevos operculados; miracidios no observados. Vesícula excretora con forma de Y, con una concreción en su interior. Poro excretor terminal.

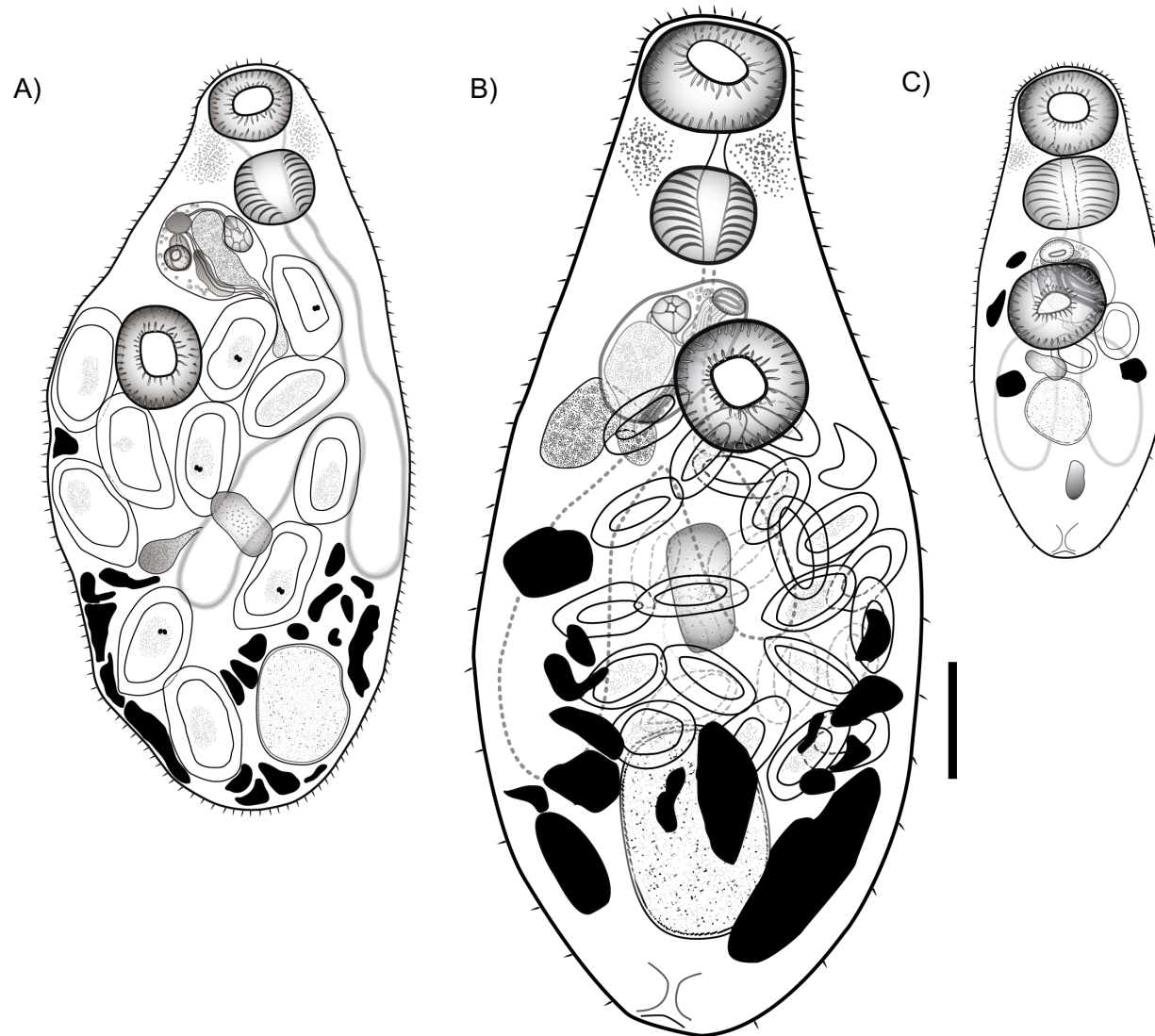


Fig. 8. Morfotipos de *Saccocoelioides lamothei* A) Morfotipo 1 corresponde al holotipo del hospedero tipo *Dormitator latifrons*), B) Morfotipo 2 de *Mugil curema* en Puerto San José, Guatemala, C) Morfotipo 3 de *Sicydium* sp. en Río Tamarindo, Nicaragua.

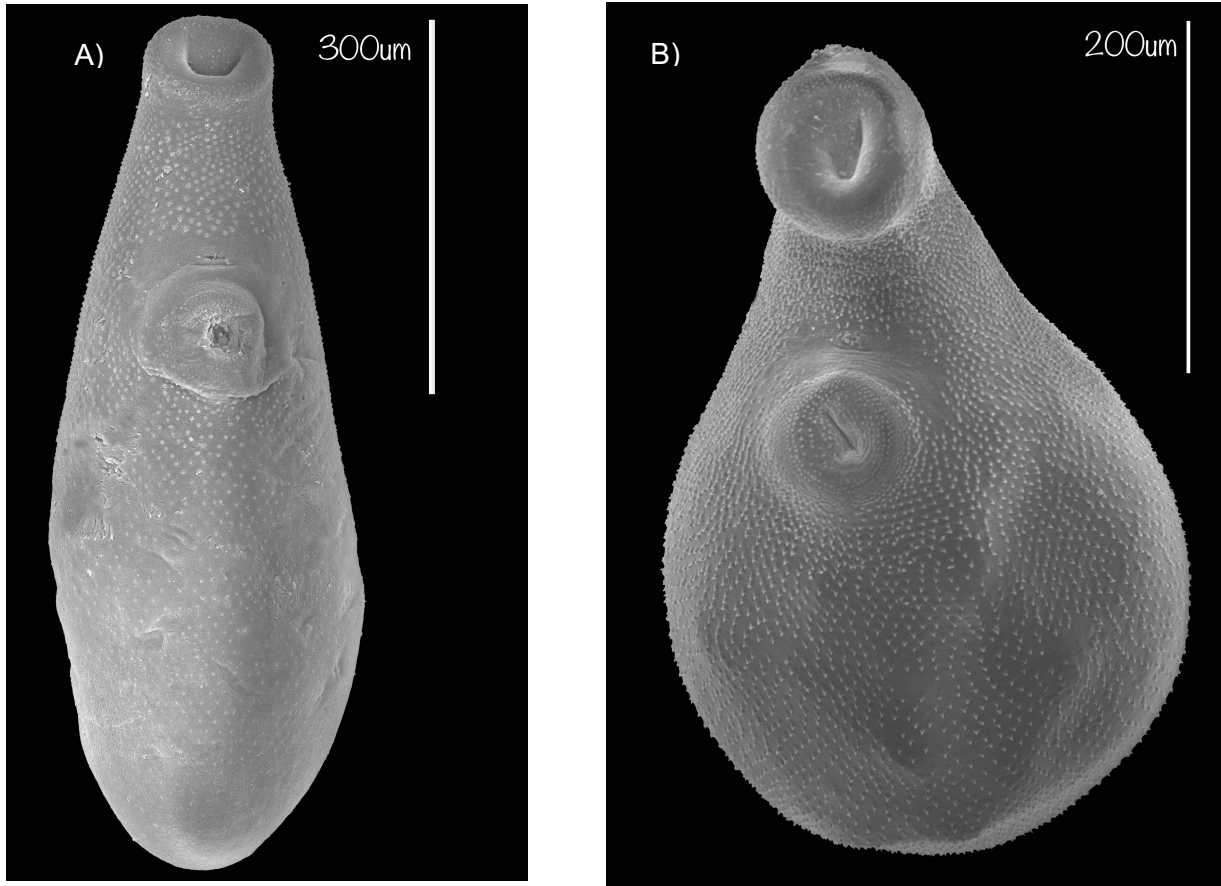


Fig. 9. Microscopía electrónica de barrido de *Saccocoelioides lamothei* (A) Morfotipo 2 de *Múgil curema* en Puerto San José, Guatemala y (B) Morfotipo 3 de *Sicydium multipunctatum* en San José de las Flores, Oaxaca.

4.3. Análisis de componentes principales (PCA).

Las variables morfométricas consideradas en el análisis de componentes principales (PCA) se presentan en el Cuadro 5. En el análisis, el primer y segundo eje explicaron el 85.49% y 5.5% de la varianza total, respectivamente, siendo el largo y el ancho del cuerpo los dos componentes principales. El diagrama muestra tres polígonos, uno correspondiente a los ejemplares de *Saccocoelioides lamothei* que parasitan a peces de la familia Eleotridae y dos polígonos superpuestos que corresponden a ejemplares de *S. lamothei* recolectados en peces de las familias Mugilidae y Gobiidae, respectivamente (Fig. 10).

4.4. Comentarios.

El contraste de la morfología referida en la descripción de los ejemplares tipo con la de los organismos colectados en este trabajo de diferentes especies de peces de distintas localidades en México y Centroamérica sugieren que existe una amplia variación morfológica en *Saccocoelioides lamothei* (Cuadro 4; Fig. 8). A partir de la variación detectada, pudieron establecerse tres morfotipos: el primero corresponde a la localidad tipo, Tres Palos, Guerrero, junto con ejemplares colectados en Chacahua, Oaxaca, del hospedero *Dormitator latifrons* (Eleotridae). El segundo morfotipo está representado por los ejemplares colectados en Puerto Chiapas, México y Puerto San José, Guatemala, en los hospederos *Mugil curema* y *Mugil* sp. (Mugilidae). El tercer morfotipo fue colectado del intestino de dos géneros de peces de la familia Gobiidae en localidades de Oaxaca México, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica.

Las variaciones morfológicas encontradas en el morfotipo 1 correspondiente a los ejemplares de eleotridos son constantes y lo definen claramente (cuerpo totalmente espinado). Por otro lado, las características morfológicas entre el morfotipo 2 y 3 son similares y se sobrelapan entre sí, haciendo complicada su diferenciación. Sin embargo, se logran diferenciar entre sí por el tamaño del cuerpo. El morfotipo 2 es más largo y ancho que el morfotipo 3.

A continuación, se describen las principales diferencias entre los morfotipos:

- La posición del testículo en el morfotipo 1 es subterminal. En el morfotipo 2 y 3 el testículo se encuentra en la parte media posterior del cuerpo.
- El cuerpo de los ejemplares del morfotipo 1 está totalmente espinado. En el morfotipo 2 y 3 las espinas son menos numerosas después de la parte media del cuerpo.
- El ancho del cuerpo es mayor en el morfotipo 1 a diferencia del morfotipo 2 y 3.
- El largo del cuerpo es mayor en el morfotipo 2 a diferencia del morfotipo 1 y 3.
- Asimismo, el morfotipo 2 presenta la faringe más pequeña (93 μ de largo y 95 μ de ancho), a diferencia de los otros dos morfotipos (112 μ de largo y 97 μ de ancho en el morfotipo 1; 106 μ de largo y 117 μ de ancho en el morfotipo 3) (Cuadro 4).

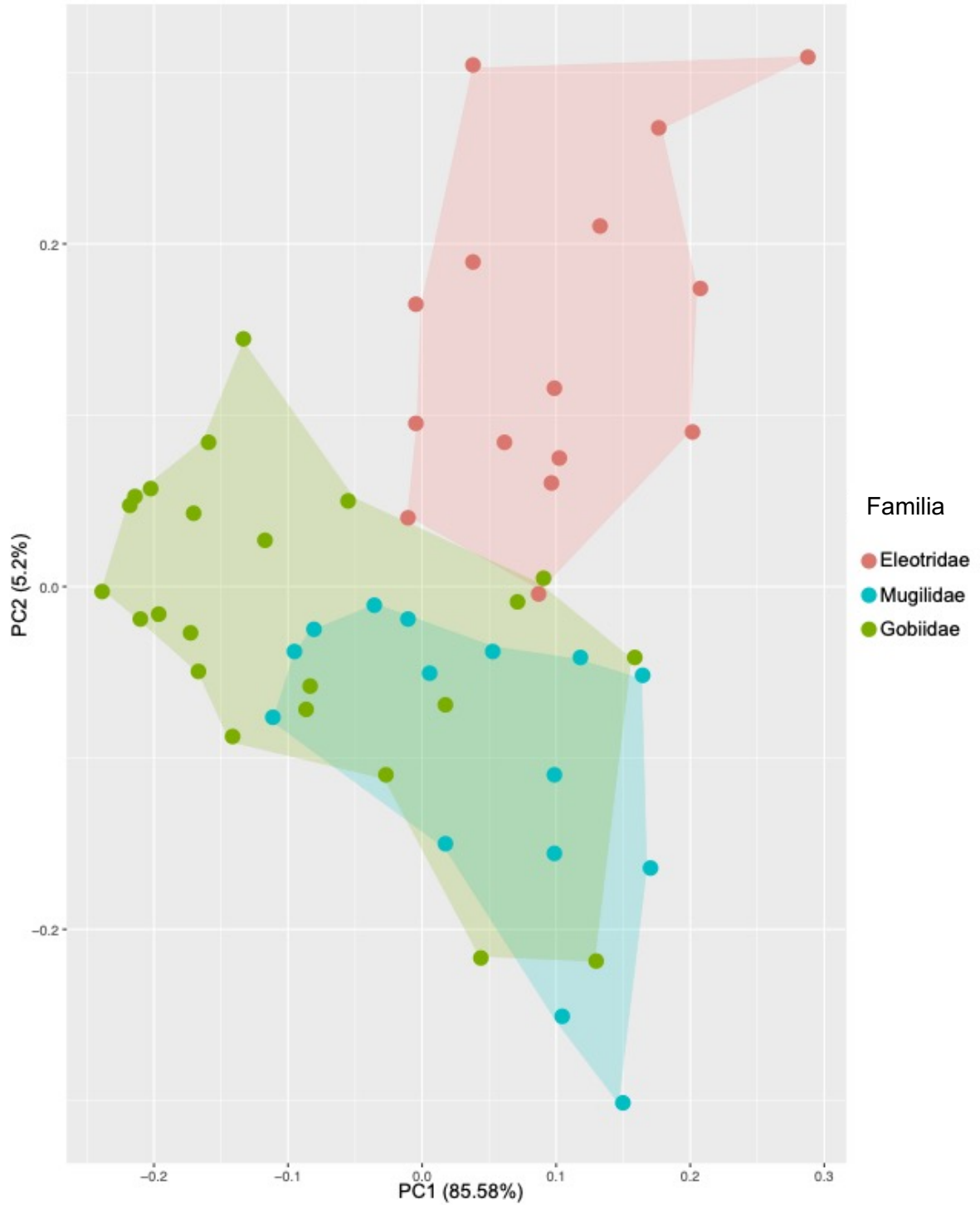


Fig. 10. Diagrama de dispersión del análisis de componentes principales aplicado a los datos de las 17 variables morfométricas medidas a partir de 53 ejemplares de *Saccocoelioides lamothei*. Las familias de hospederos están marcadas con diferentes colores.

Cuadro 4. Medidas comparativas de los tres morfotipos de *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo y Violante-González, 2008.

<i>Saccocoelioides lamothei</i>				
Hospedero	<i>Dormitator latifrons</i> (Eleotridae)	<i>Dormitator latifrons</i> (Eleotridae)	<i>Mugil curema</i> y <i>Mugil</i> sp. (Mugilidae)	<i>Sicydium multipunctatum</i> , <i>S. salvini</i> , <i>Sicydium</i> sp. Y <i>Awaous banana</i> (Gobiidae)
	Aguirre- Macedo	Presente estudio	Presente estudio	Presente estudio
	y Violante- González, 2008			
	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3	
n	9	6	15	23
Localidad	Tres Palos y Coyuca, Guerrero Oaxaca	Chacahua, Oaxaca	Puerto San José, Guatemala y Puerto Chiapas, México	San José de las Flores, Oaxaca; Río Ciruelas, Costa Rica; Río Sunza y Río Banderas, El Salvador; Río Tamarindo, Nicaragua.
Cuerpo				
Largo	420-850	647-809	533-906	371-876
Ancho	240-510	340-473	206-441	134-438
Ventosa oral	62-155	73-106	68-100	51-129
	77-127	98-127	91-119	54-135
Ventosa ventral	71-112	97-131	78-130	62-123
	82-107	102-151	96-143	61-185
Prefaringe	7.5-12	8.5-23	12-29	6-26
Faringe	52-112	55-77	54-93	52-106
	55-97	81-115	52-95	46-117
Saco hermafrodita	100-215	99-143	96-181	59-170
	60-130	36-95	51-107	40-107
Testículo	90-152	104-207	107-213	52-164
	67-137	78-166	75-144	48-134
Ovario	42-62	31-79	42-77	28-80
	25-42	11-51	27-63	17-63

Vitelógenas	Irregulares en tamaño y forma desde el ovario a nivel testicular	Irregulares en tamaño y forma desde el ovario a nivel testicular	Irregulares en tamaño y forma desde el ovario a nivel testicular	Irregulares en tamaño y forma desde la parte posterior del saco hermafrodita a nivel testicular
Huevos	80-135 50-78	95-121 53-80	55-94 33-58	47-92 38-69

4.5. Análisis filogenéticos.

En el presente trabajo se generaron 78 secuencias del gen 28S, 47 secuencias de *cox1* y 119 secuencias del gen *nad1*. Se realizaron análisis filogenéticos con dos métodos de inferencia filogenética: Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia bayesiana (IB).

El alineamiento del gen 28S incluyó secuencias disponibles en GenBank de 11 especies del género *Saccocoelioides*, las cuales se usaron como grupos externos. Además, se incluyeron cuatro secuencias disponibles de *Saccocoelioides lamothei*. El alineamiento final se conformó por 93 terminales y 1, 271 caracteres. Los análisis filogenéticos obtenidos con IB y ML, mostraron topologías similares (Fig. 11). Los árboles filogenéticos revelaron que todas las secuencias generadas en este estudio (mostradas en color morado) se encuentran junto con los ejemplares de *Saccocoelioides lamothei* previamente identificados. El clado resultante tuvo un alto soporte de probabilidad posterior bayesiana y de bootstrap respectivamente (1.0/99%). Las hipótesis recuperadas con ambos métodos fueron congruentes con las reportadas previamente en otros estudios. Las distancias genéticas estimadas con el gen 28S entre *Saccocoelioides lamothei* y las especies congénéricas oscilaron entre 0.74 y 5.07%. Por su parte, las distancias genéticas intraespecíficas en *S. lamothei* variaron entre 0 y 0.32% (Cuadro 5). La monofilia de las nuevas secuencias y las secuencias previamente identificadas como *S. lamothei* en combinación con la baja divergencia genética entre las secuencias, sugiere que todas las nuevas secuencias pertenecen a *S. lamothei*, expandiendo su rango de distribución y espectro hospedatorio a lo largo de las costas del Pacífico en México y Centroamérica.

El alineamiento del gen *cox1* incluyó secuencias para el género disponibles en GenBank. Ocho corresponden a diferentes especies de *Saccocoelioides* y dos secuencias de *Saccocoelioides lamothei*. El alineamiento final comprendió 57 terminales conformada por 588 caracteres. El análisis filogenético de *cox1* inferido con los métodos de ML e IB generaron árboles filogenéticos similares en topología. En ambos análisis se formó un clado donde se encontraron las secuencias de la localidad tipo junto con las secuencias generadas en este estudio (indicados en color morado; Fig. 12). El clado tuvo un alto soporte de probabilidad posterior Bayesiana y de bootstrap, respectivamente (1.0/100) (Fig. 12). Las distancias genéticas estimadas para el gen *cox1* entre las especies del género *Saccocoelioides* oscilaron entre 9.7 y 15.05%. Las distancias genéticas intraespecíficas variaron entre 0 y 6.62% (Cuadro 5).

El alineamiento final para el marcador molecular *nad1* incluyó 57 terminales y 485 caracteres. Dentro del alineamiento, como grupo externo se emplearon dos secuencias de *S. olmecae*. Los análisis filogenéticos fueron realizados con los métodos de ML e IB. Las secuencias de *Saccocoelioides lamothei* generadas forman un clado con un alto soporte de probabilidad posterior Bayesiana y de bootstrap (0.92) (Fig. 13). Las distancias genéticas intraespecíficas con el gen *nad1* oscilaron entre 0 y 0.7%.

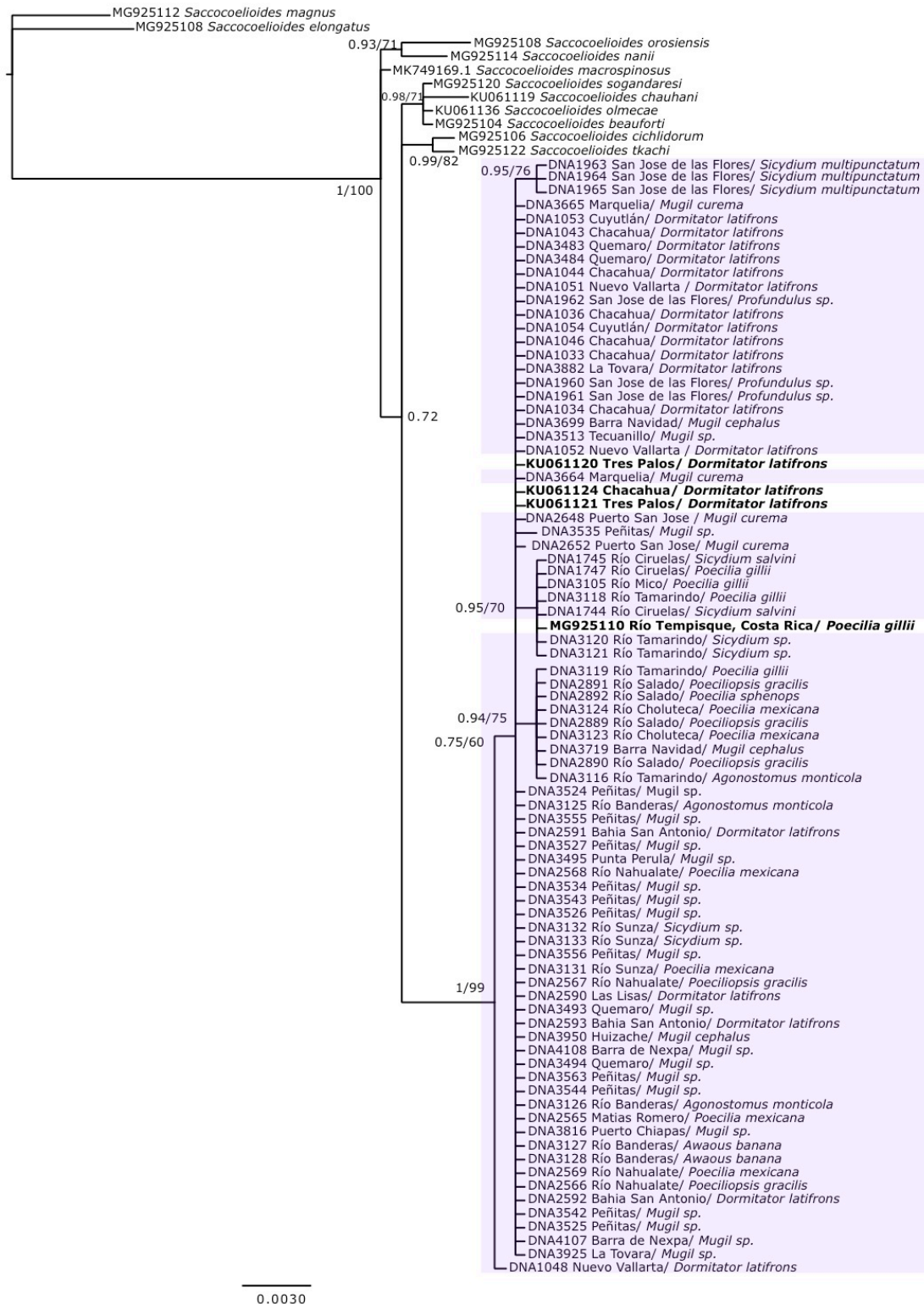


Fig. 11. Hipótesis filogenética de Inferencia Bayesiana obtenido con el alineamiento del gen 28S. Los números cercanos a los nodos representan las probabilidades posteriores y los valores de bootstrap. En color morado se muestra las secuencias obtenidas en este estudio.

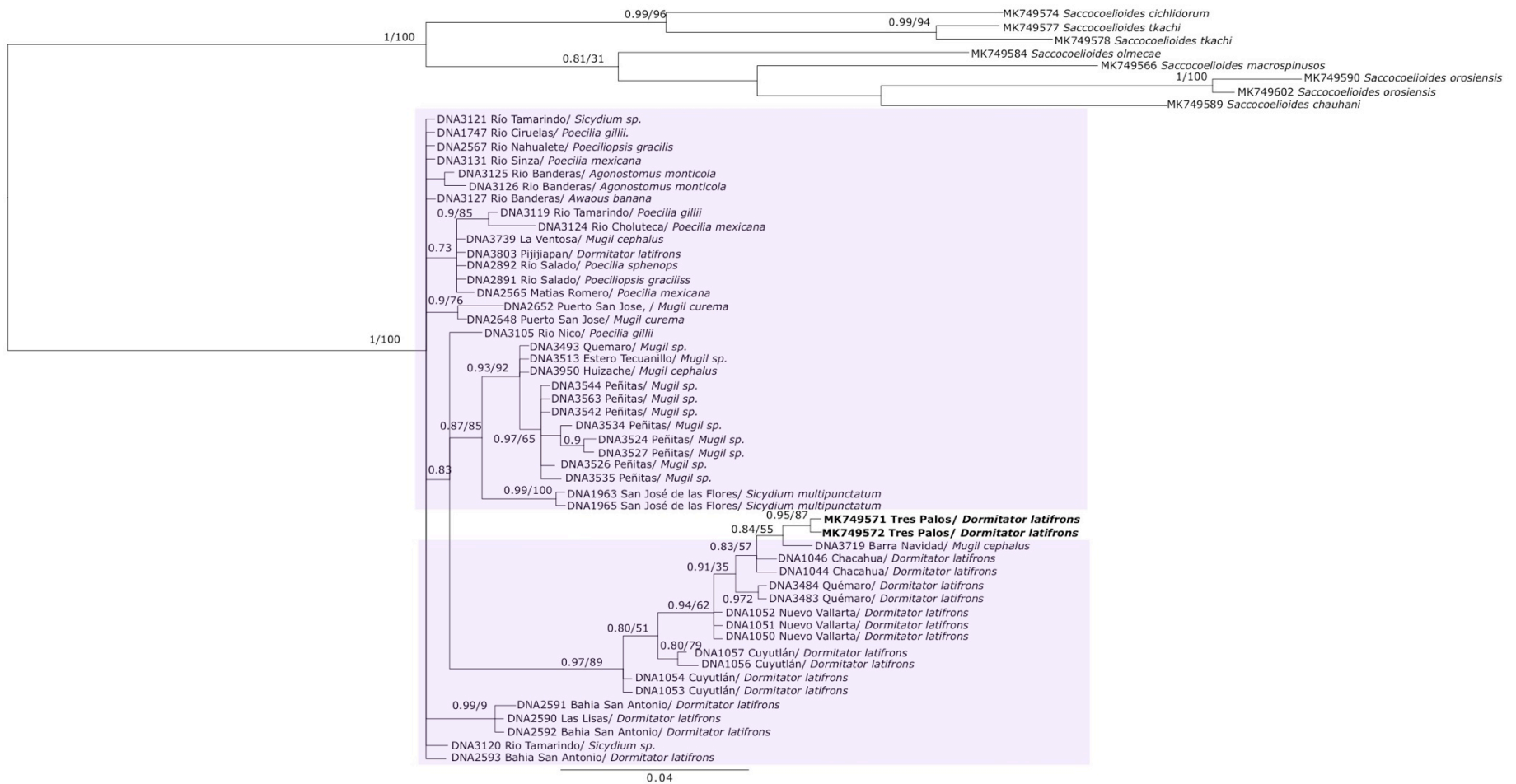


Fig. 12. Hipótesis filogenética obtenida del análisis del gen mitocondrial *cox1* usando el método de Inferencia Bayesiana. Los números cercanos a los nodos internos muestran los valores de probabilidades posteriores y los valores de bootstrap. En color morado se muestran las secuencias obtenidas en este estudio.

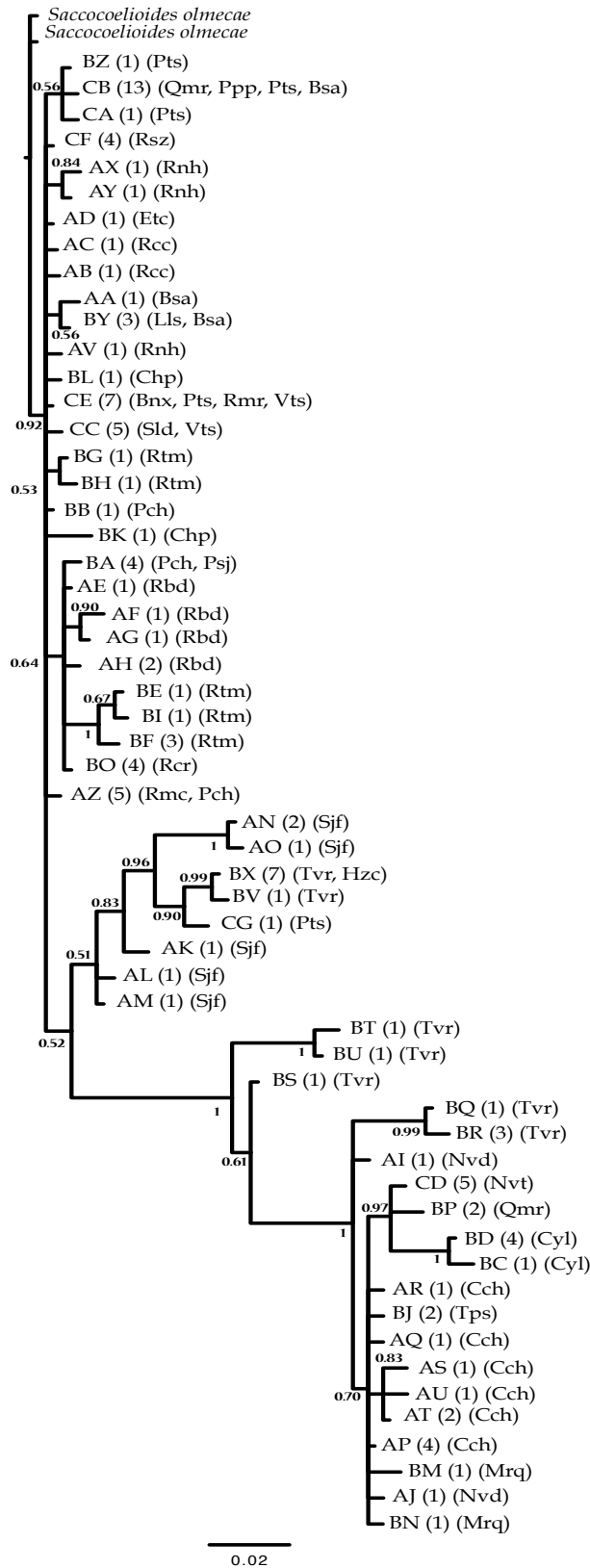


Fig. 13. Hipótesis filogenética de Inferencia Bayesiana obtenido con el alineamiento de haplotipos únicos del gen *nad1*. Los números cercanos a los nodos representan las probabilidades posteriores. Los números entre paréntesis son la n del haplotipo, seguido por código de las localidades (Cuadro 2).

Cuadro 5. Distancias genéticas estimadas entre las especies del género *Saccocoelioides* con el marcador 28S (por debajo de la diagonal) y el gen *cox1* (por encima de la diagonal). En negritas se representa la divergencia genética intraespecífica

	<i>S. magnus</i>	<i>S. elongatus</i>	<i>S. nanii</i>	<i>S. sogandaresi</i>	<i>S. beauforti</i>	<i>S. olmecae</i>	<i>S. cichlidorum</i>	<i>S. tkachi</i>	<i>S. macrospinosus</i>	<i>S. orosiensis</i>	<i>S. chauhani</i>	<i>S. lamothei</i>
<i>S. magnus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. elongatus</i>	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. nanii</i>	3.7	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sogandaresi</i>	3.5	3.6	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. beauforti</i>	4.1	4.2	0.56	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. olmecae</i>	3.6	3.7	0.49	0	0	-	13.43	12.23	11.03	11.27-11.84	11.27-12.02	14.63-16.31
<i>S. cichlidorum</i>	3.7	3.8	0.79	0.48	0.56	0.49	-	9.7-10.7	13.19	12.3-12.9	13.19	13.2-17.2
<i>S. tkachi</i>	3.6	3.7	0.71	0.40	0.49	0.41	0.24	-	12.9	10.2-11.2	11.75	15.05-18.03
<i>S. macrospinosus</i>	3.4	3.4	0.32	0.16	0.19	0.16	0.47	0.40	-	10.07-10.53	11.03	14.8-16.55
<i>S. orosiensis</i>	3.8	3.8	0.7	0.72	0.83	0.73	1.03	0.95	0.55	-	10.07-9.74	13.2-17.07
<i>S. chauhani</i>	3.8	3.9	0.73	0.24	0.28	0.24	0.73	0.65	0.41	0.81	-	12.9-16.07
<i>S. lamothei</i>	3.6-4.9	3.6-5.07	1.01-1.72	0.75-1.34	0.89-1.3	0.76-1.34	0.83-1.3	0.83-1.4	0.74-1.34	1.01-1.82	1.05-1.63	0-0.32 / 0-6.62

4.6. Red de haplotipos.

La red de haplotipos fue construida con 119 ejemplares colectados e identificados en este estudio como *Saccocoelioides lamothei*. Esta base de datos incluyó un total de 485 caracteres, detectándose 57 haplotipos (Fig. 14). La mayoría de los haplotipos tienen una distribución geográfica restringida, es decir, cinco localidades mostraron un haplotipo único (AD, BJ, BO, CD, CF). En 15 localidades, se detectaron 45 haplotipos exclusivos (Anexo 1, Fig. 15). El haplotipo CB, (n=13) lo comparten poblaciones que tienen como hospederos a miembros de la familia Mugilidae y Eleotridae, siendo también el haplotipo con la mayor amplitud geográfica, al encontrarse en cuatro localidades de los estados de Jalisco, Guerrero y en Bahía de San Antonio, El Salvador. El siguiente haplotipo en número y amplitud geográfica es CE, (n=7) distribuido en cuatro localidades de Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Fig. 15). Este haplotipo tiene como hospederos a miembros de la familia Mugilidae y Poeciliidae (Fig. 14). Finalmente, pocos haplotipos fueron compartidos entre familias de hospederos y localidades, siendo cinco haplotipos (BX, CC, AZ, BA, BY), los que estuvieron representados en dos localidades (Fig. 14, 15).

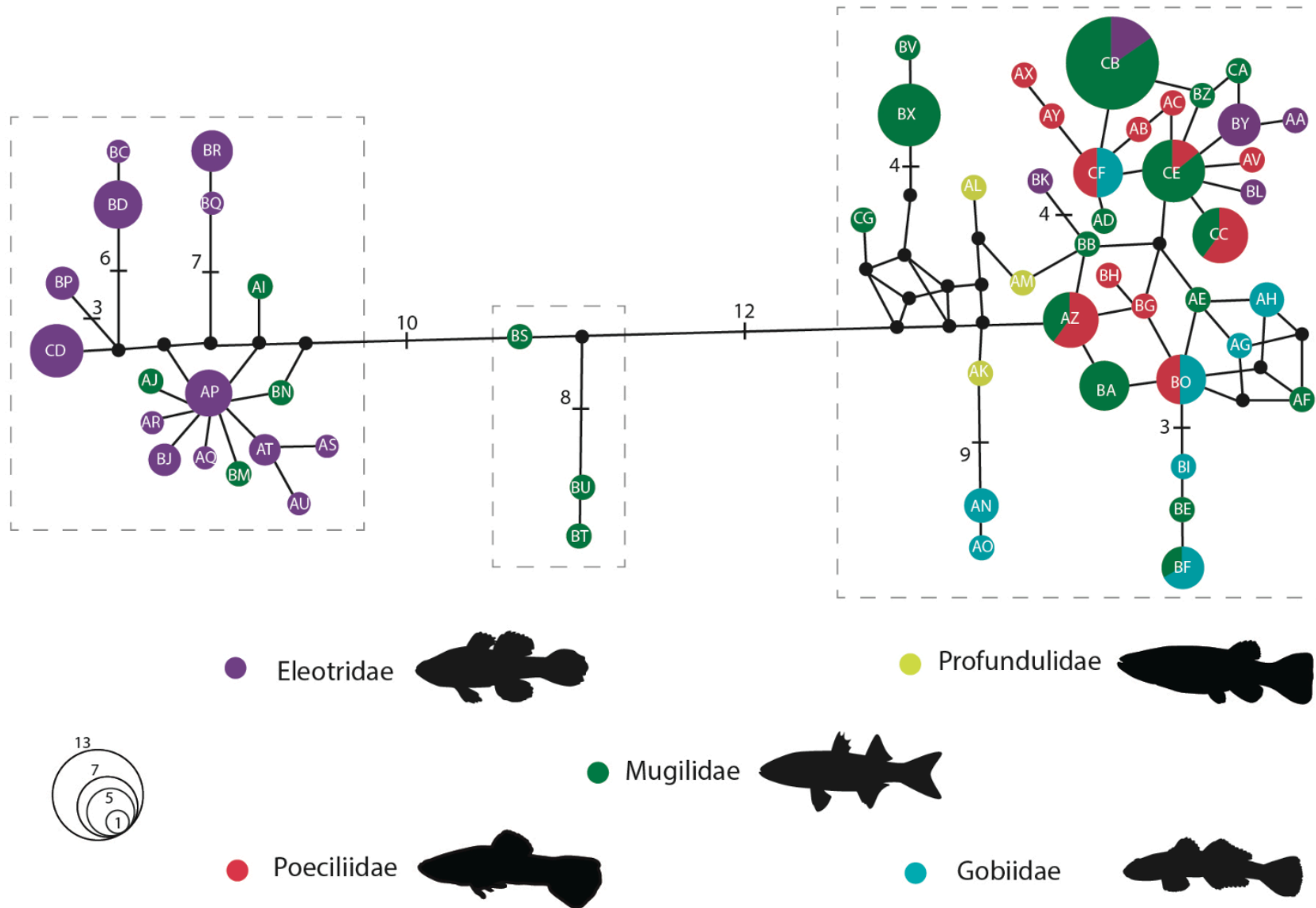


Fig. 14. Red de haplotipos obtenida con las secuencias del gen *nad1* para *Saccocoelioides lamothei*. El tamaño de los círculos representa el número de individuos de cada haplotipo y las divisiones dentro de los círculos representan la proporción de individuos de cada familia de hospederos, indicadas con colores diferentes. Las letras dentro de los círculos corresponden a los nombres de los haplotipos (Anexo 1). Los puntos negros pequeños indican haplotipos perdidos o no muestreados. Los números señalan los pasos mutacionales por encima de tres.

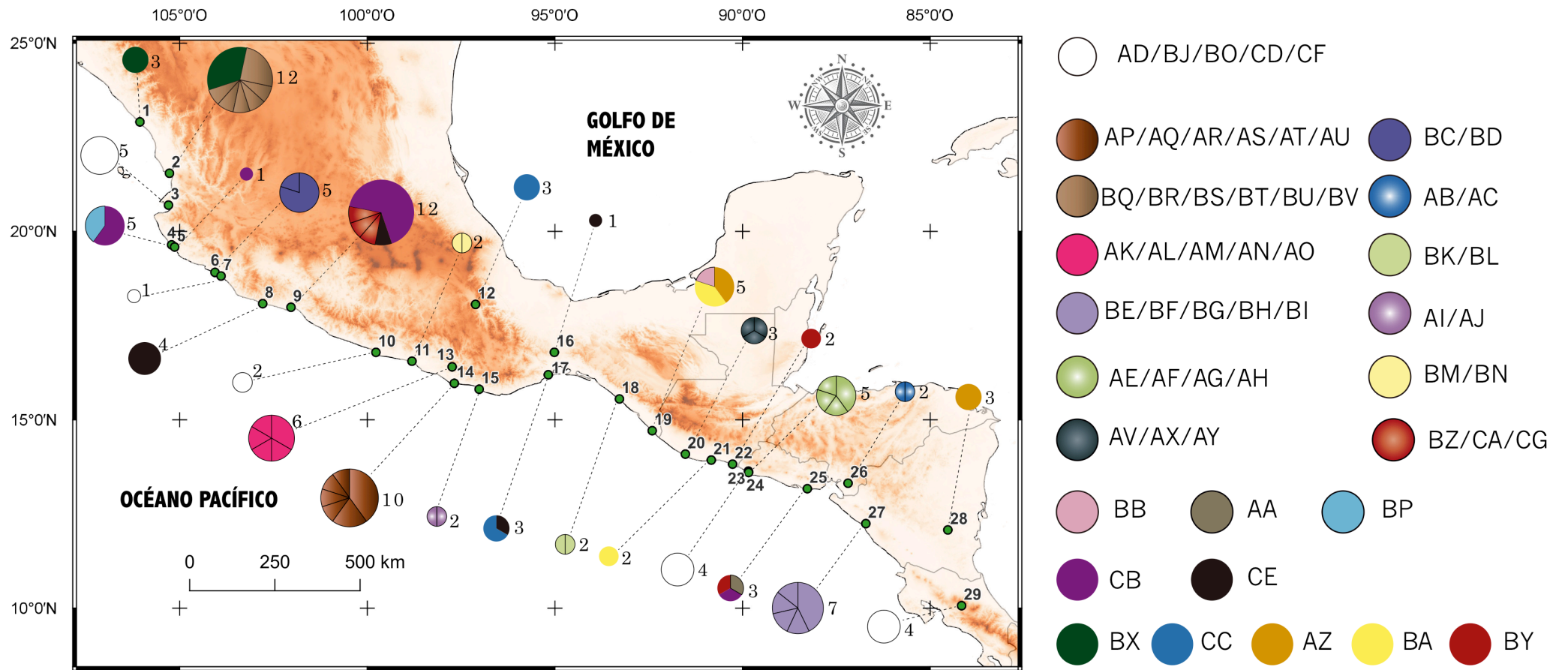


Fig. 15. Mapa de haplotipos. Los círculos en el mapa indican las proporciones de los haplotipos en cada localidad. Los círculos blancos representan los haplotipos únicos en localidades. El tamaño de los círculos representa el número de individuos que lo conforman.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Caracterización morfológica.

La especie *Saccocoelioides lamothei* fue descrita por Aguirre-Macedo y Violante-González (2008) del hospedero *Dormitator latifrons* (Eleotridae) de la Laguna de Tres Palos, Guerrero, México. Las principales características morfológicas utilizadas para diagnosticarla fueron: 1) posición terminal del testículo; 2) distribución de glándulas vitelógenas desde el nivel del ovario hasta el nivel postesticular y 3) presencia de manchas oculares en la parte anterior del cuerpo. Los resultados morfológicos obtenidos en este estudio sugieren que *S. lamothei* no puede ser diferenciado con base en los caracteres morfológicos propuestos por Aguirre-Macedo y Violante-González (2008) en la descripción original. La posición del testículo, que los autores señalan como terminal, en los ejemplares de los morfotipos 2 y 3 se observa en posición subterminal. Además, la distribución las glándulas vitelógenas, que se ubican desde el nivel del ovario hasta la región postesticular, en el material estudiado inician desde la ventosa ventral hasta la región postesticular. El análisis de componentes principales agrupa a los individuos con base en la familia del hospedero al que parasitan, con algunos caracteres que se superponen. Esto sugiere que la variación morfológica depende del hospedero que infecten, aspecto similar al observado en haploporidos del mediterráneo (Blasco-Costa et al. 2010).

Con base en los ejemplares colectados en este trabajo se amplía la distribución de *Saccocoelioides lamothei* en vertientes del Océano Pacífico, desde Sinaloa, México hasta Costa Rica en Centroamérica. Esta especie tiene una amplia distribución geográfica hasta ahora reportada. Por otro lado, también *S. lamothei* es la especie del género que presenta un amplio rango hospedatoria, parasitando a cinco familias de peces (Eleotridae, Poeciliidae, Mugilidae, Gobiidae y Profundulidae).

5.2. Caracterización molecular.

Los árboles filogenéticos inferidos con Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana mostraron que los ejemplares de este trabajo identificados como *Saccocoelioides lamothei* forman un clado con los distintos marcadores moleculares utilizados. La divergencia genética estimada entre 12 especies del género *Saccocoelioides* osciló entre 0.2 - 5.7%, siendo similar a lo reportado por Andrade-Gómez et al. (2019). Los autores reportaron una divergencia genética de 0 - 4.8%. La divergencia genética intraespecífica entre las secuencias de *S. lamothei* osciló entre 0 - 0.32% para el gen 28S. La divergencia genética intraespecífica encontrada fue similar a la reportada previamente para *S. tkachi* (0 - 0.2%) y *S. orosiensis* (0 - 0.4%) (Andrade-Gómez et al. 2019). Por otro lado, la distancia genética estimada con el gen *cox1* entre siete especies de *Saccocoelioides* osciló entre 9.7 - 17%, este rango fue similar al reportado por Andrade-Gómez et al. (2019). La distancia genética intraespecífica entre los individuos de *S. lamothei* osciló entre 0 - 6.62% para el gen *cox1*. La distancia genética intraespecífica para el gen *cox1* encontrada en este estudio fue mayor a la reportada previamente en otras especies; por ejemplo, la divergencia intraespecífica de *S. tkachi* osciló entre 0 - 3.1% y *S. macrospinosus* osciló entre 0 - 3.3% (Andrade-Gómez et al. 2019). Este estudio confirma que el gen *cox1* es un buen marcador molecular para delimitar especies y poblaciones dentro de *Saccocoelioides*.

Asimismo, los ejemplares se analizaron a través de una red de haplotipos, encontrando un total de 57, divididos en tres haplogrupos separados por pocos pasos mutacionales (menos de 12). El haplotipo más frecuente fue el CB, el cual está compartido entre cuatro localidades (Quémaro y Playa Punta Pérula en Jalisco; Playa Las Peñitas en Guerrero y Bahía de San Antonio en El Salvador), sugiriendo flujo génico entre estas poblaciones. Dicho flujo génico puede deberse a la fisiología de los hospederos de la familia Mugilidae, ya que estos peces son catádromos, es decir, su historia de vida abarca ambientes marinos, estuarinos y dulceacuícolas (Whitfield et al., 2012). Además, los mugilidos están ampliamente distribuidos en zonas tropicales y templadas (Miller, 2005). Ambas características apoyan la propuesta de Andres et al. (2018) sobre el papel que los mugilidos han tenido en la diversificación de los haploporidos, ya que actúan como puentes ecológicos entre hábitats marinos, estuarinos y dulceacuícolas. La alta vagilidad de los mugilidos favorece la dispersión de sus parásitos, puesto que estos peces son capaces de migrar largas distancias y han sido reportados en aguas dulceacuícolas a 100 km de las costas (Whitfield et al.,

2012). Este aspecto concuerda con lo observado por Blasco-Costa et al. (2013) quienes mencionan que los trematodos de peces tienen una dispersión limitada y son sus hospederos quienes determinan el potencial de dispersión.

La amplia vagilidad de los mugilidos influye de manera determinante en la distribución de los haploporidos, el proceso conocido como “cambio de hospedero” [en el que la fauna parasitaria de los hospederos tiene una mayor probabilidad de diversificarse y/o adquirir nuevas especies de hospederos de acuerdo con Poulin (2016)], podría explicar la presencia de ejemplares de *S. lamothei* en peces de otras familias como Profundulidae y Gobiidae.

Por otro lado, la introducción antropogénica de peces nativos de las regiones del sur de México como los poeciliidos en tierras altas, también propicia la introducción de sus parásitos (Rubio-Godoy et al., 2016); a este proceso artificial podría atribuirse la colecta de ejemplares de *S. lamothei* en Río Salado y Matías Romero, Oaxaca.

La combinación de los árboles filogenéticos inferidos con los métodos de ML e IB, con los datos morfológicos de los ejemplares colectados, muestran que todos los ejemplares estudiados pertenecen a la misma especie, *Saccocoelioides lamothei*, la cual ahora se reporta con la mayor amplitud geográfica y hospedatoria del género e incluso de la familia. El patrón de distribución de *Saccocoelioides lamothei* a lo largo de las costas del Océano Pacífico puede haber sido formado por una combinación de factores ambientales y la biología de los hospederos definitivos.

6. CONCLUSIONES.

- Los ejemplares analizados en este trabajo fueron identificados como *Saccocoelioides lamothei*.
- La especie *Saccocoelioides lamothei* muestra un amplio potencial de colonización ya que fue encontrado parasitando a hospederos de cinco familias diferentes (Eleotridae, Poeciliidae, Mugilidae, Gobiidae y Profundulidae).
- *Saccocoelioides lamothei* tienen la distribución geográfica más amplia del género, encontrándose en vertientes del Océano Pacífico desde Sinaloa, México hasta Costa Rica en Centroamérica e introducida en ríos en tierras altas de México.

- Los análisis morfológicos en combinación con los análisis moleculares sugieren que *S. lamothei* presenta variación morfológica inducida por el hospedero que parasita.
- Los trabajos morfológicos con este grupo de haploporidos debe ser complementado con caracteres moleculares (genes nucleares y mitocondriales) para tener una identificación mas precisa.

LITERATURA CITADA.

Aghayan, S., Gevorgian, H., Ebi, D., Atoyán, H. A., Addy, F., Mackenstedt, U., Romig, T., y Wassermann, M. (2019) *Fasciola spp.* in Armenia: Genetic diversity in a global context. *Veterinary Parasitology*, 268: 21-31.

Aguirre-Macedo, L. M., y Violante-González, J. (2008) *Saccocoelioides lamothei* n. sp. from *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae) from coastal lagoons of Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79: 33-40.

Andrade-Gómez, L., Sereno-Urbe A. L., y García-Varela, M. (2019) Description of a new species and understanding the genetic diversity of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Haploporidae) in Middle America using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Parasitology International*, 71: 87-98.

Andrade-Gómez, L., Pinacho-Pinacho, C. D., y García-Varela, M. (2017) Molecular, Morphological, and Ecological Data of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Digenea: Haploporidae) from Middle America Supported the Reallocation from *Culuwiya cichlidorum* to *Saccocoelioides*. *Journal Parasitology*, 103(3): 257-267

Andres, M. J., Pulis, E. E., Curran, S. S., y Overstreet, R. M. (2018) On the systematics of some marine haploporids (Trematoda) with the description of a new species of *Megasolena* Linton, 1910, *Parasitology International*, 67: 805-815.

Atopkin, D. M., Bezprozvannykh, V. V., Ha, D. N., Nguyen, V. H., Nguyen, V. T., y Chalenko, K. P. (2019) A new subfamily, Pseudohaploporinae subfam. n. (Digenea: Haploporidae), with morphometric and molecular analyses of two new species: *Pseudohaploporus vietnamensis* n. g., sp. n. and *Pseudohaploporus planilizum* n. g., sp. n. from Vietnamese mullet. *Parasitology International*, 69: 17-24.

Blasco-Costa, I., Balbuena, J. A., Raga, J. A., Kostadinova, A., y Olson, P.D. (2010) Molecules and morphology reveal cryptic variation among digeneans infecting sympatric mullets in the Mediterranean. *Parasitology*, 137: 287-302.

Blasco-Costa, I., y Poulin, R. (2013) Host traits explain the genetic structure of parasites: a meta-analysis. *Parasitology*, 140: 1316-1322.

Clement, M., Posada, D., y Crandall, K. A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* (in press): Crandall, K. A. 1994. Intraspecific cladogram estimation: Accuracy at higher levels of divergence. *Systematic Biology*, 43: 222-235.

Curran, S. S., Pulis, E. E., Andres, M. J., y Overstreet, R. M. (2018) Two new species of *Saccocoelioides* (Digenea: Haploporidae) with phylogenetic analysis of the family, including species of *Saccocoelioides* from North, Middle and South America, *Journal of Parasitology*, 104: 221-239.

Díaz, M., Y González, G. (1990) Ciclo de vida de *Saccocoelioides tarpazensis* n. sp. (Trematoda: Haploporidae). *Acta Científica Venezolana*, 41: 327-336.

Eickbush, T. H., y Eickbush, D. G. (2007) Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. *Genetics*, 175 (2): 477-485.

García-Prieto, L., Mendoza-Garfias, B., y Pérez-Ponce de León, G. (2014) Biodiversidad de Platyhelminthes parásitos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 164-170.

Gérard, C., Hervé, M., Gay, M., Bourgau, O., Feuteun, E., Acou, A., y Réveillaie, E. (2017) Metazoan parasite communities in *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758) and *Alosa fallax* (Lacépède, 1803) (Clupeidae) from North-East Atlantic coastal waters and connected rivers. *Parasitology Research*, 116: 2211-2230.

Gómez-Tatay, L., Hernández-Andreu, J. M., y Aznar, J. (2017) Mitochondrial Modification Techniques and Ethical Issues. *Journal Clinical Medicine*, 6 (3): 25.

Kostadinova, A., y Pérez-del-Olmo, A. (2014) The Systematics of the Trematoda. En Toledo R., Fried B. (Eds) *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 766: 21-44.

Lunaschi, L. (2017) Clase Trematoda, En Navone, G. *Macroparásitos: diversidad y biología*. 1ª edición. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 42-67.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., y Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees: En *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA 1-8.

Miller, R. R. (2005) *Freshwater Fishes of Mexico*. The University of Chicago Press. Chicago.

Overstreet, R. M., y Curran, S. S. (2005) Family Haploporidae Nicoll, 1914, En Jones, A., Bray, R. A., y Gibson, D. I. (Eds) *Keys to the Trematoda*. Vol. 2. Wallingford, UK: CAB International, 129-167.

Pérez-Ponce de León, G., y Hernández-Mena, D. I. (2019) Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear

rDNA sequences before entering the age of the 'next-generation' Tree of Life. *Journal Helminthology*, 93 (3): 260-276.

Poulin, R. (2016) Greater diversification of freshwater than marine parasites of fish. *International Journal for Parasitology*, 46(4): 275-279.

Rambaut, A. (2006) Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0. Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Rubio-Godoy, M., Razo-Mendivil, U., García-Vásquez, A., Freeman, M. A., Shinn, A. P., y Paladini, G. (2016) To each his own: no evidence of gyrodactylid parasite host switches from invasive poeciliid fishes to *Goodea atripinnis* Jordan (Cyprinodontiformes: Goodeidae), the most dominant endemic freshwater goodeid fish in the Mexican Highlands. *Parasites & Vectors*, 9: 604

Solano, A., Playán, A., López-Pérez, M. J., y Montoya, J. (2001) Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Publica México*, 43: 151-161.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., y Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Templeton, A. R., Crandall, K. A., y Sing, C. F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.

Whitfield, A., Panfili, J., y Durand, J. D. (2012) A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus 1758 (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 641-681.

ANEXO 1. INDIVIDUOS Y CÓDIGOS DE LOS HAPLOTIPOS.

LOCALIDADES	Hospedero	n	Individuo	Haplotipo
MÉXICO			<i>Nad1</i>	
1. El Huizache, Sinaloa (Hzc)	<i>Mugil cephalus</i>	3	Hzc3943 Hzc3950 Hzc3951	BX BX BX
2. La Tovar, Nayarit (Tvr)	<i>Dormitator latifrons</i> <i>Mugil cephalus</i>	4 8	Tvr3881 Tvr3882 Tvr3883 Tvr3884 Tvr3885 Tvr3886 Tvr3887 Tvr3900 Tvr3901 Tvr3904 Tvr3905 Tvr3925	BQ BR BR BR BS BT BU BX BV BX BX BX BX
3. Nuevo Vallarta, Nayarit (Nvt)	<i>Dormitator latifrons</i>	5	Nvt1048 Nvt1049 Nvt1050 Nvt1051 Nvt1052	CD CD CD CD CD
4. Quémaro, Jalisco (Qmr)	<i>Dormitator latifrons</i> <i>Mugil sp.</i>	3 2	Qmr3483 Qmr3484 Qmr3485 Qmr3493 Qmr3494	BP BP CB CB CB
5. Playa Punta Pérula, Jalisco (Ppp)	<i>Mugil sp.</i>	1	Ppp3495	CB
6. Cuyutlán, Colima (Cyl)	<i>Dormitator latifrons</i>	5	Cyl1054 Cyl1053 Cyl1055 Cyl1056 Cyl1057	BC BD BD BD BD
7. Estero Tecuanillo, Colima (Etc)	<i>Mugil sp.</i>	1	Etc3513	AD
8. Barra de Nexpa, Michoacán (Bnx)	<i>Mugil sp.</i>	4	Bnx4110 Bnx4107 Bnx4108 Bnx4109	CE CE CE CE
9. Playa Las Peñitas, Guerrero (Pts)	<i>Mugil sp.</i>	12	Pts3526 Pts3524 Pts3527 Pts3542 Pts3534	CE BZ CG CA CB

			Pts3535 Pts3525 Pts3543 Pts3544 Pts3555 Pts3556 Pts3563	CB CB CB CB CB CB CB
10. Tres Palos, Guerrero	<i>Dormitator latifrons</i>	2	Tsp1756 Tsp1757	BJ BJ
11. Marquelia, Guerrero (Mrq)	<i>Mugil curema</i>	2	Mrq3664 Mrq3665	BM BN
12. Río Salado, Oaxaca (Sld)	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	2	Sld2890 Sld2891	CC CC
	<i>Poecilia sphenops</i>	1	Sld2892	CC
13. San José de las Flores, Oaxaca (Sjf)	<i>Profundulus</i> sp.	3	Sjf1960 Sjf1961 Sjf1962	AK AL AM
	<i>Sicydium multipunctatum</i>	3	Sjf1964 Sjf1963 Sjf1965	AO AN AN
14. Chacahua, Oaxaca (Cc)	<i>Dormitator latifrons</i>	10	Cch1033 Cch1034 Cch1035 Cch1037 Cch1036 Cch1043 Cch1044 Cch1046 Cch1045 Cch1047	AP AP AP AP AQ AR AS AU AT AT
15. Barra de Navidad, Oaxaca (Nvd)	<i>Mugil cephalus</i>	2	Nvd3699 Nvd3719	AI AJ
16. Matías Romero, Oaxaca (Rmr)	<i>Poecilia mexicana</i>	1	Rmr2564	CE
17. La Ventosa, Oaxaca (Vts)	<i>Mugil cephalus</i>	3	Vts3739	CE
			Vts3729	CC
			Vts3738	CC
18. Pijijiapan, Chiapas (Chp)	<i>Dormitator latifrons</i>	2	Chp3802 Chp3803	BK BL
19. Puerto Chiapas, Chiapas (Pch)	<i>Mugil</i> sp.	5	Pch3804	AZ
			Pch3805	AZ
			Pch3806	BA
			Pch3831	BA
			Pch3816	BB
GUATEMALA				
20. Río Nahualate (Rnh)	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	2	Rnh2566 Rnh2567	AV AX
	<i>Poecilia mexicana</i>	1	Rnh2569	AY
21. Puerto San José (Psj)	<i>Mugil curema</i>	2	Psj2648	BA

			Psj2652	BA
22. Las Lisas (Lls)	<i>Dormitator latifrons</i>	2	Lls2589 Lls2590	BY BY
EL SALVADOR				
23. Río Sunza (Rsz)	<i>Poecilia mexicana</i>	2	Rsz3130	CF
			Rsz3131	CF
	<i>Sicydium</i> sp.	2	Rsz3132	CF
			Rsz3133	CF
24. Río Banderas (Rbd)	<i>Agonostomus monticola</i>	2	Rbd3125	AE
			Rbd3126	AF
	<i>Awaous banana</i>	3	Rbd3127	AG
			Rbd3128	AH
			Rbd3129	AH
25. Bahía de San Antonio (Bsa)	<i>Dormitator latifrons</i>	3	Bsa2591 Bsa2592 Bsa2593	AA BY CB
HONDURAS				
26. Río Choluteca, Honduras (Rcc)	<i>Poecilia mexicana</i>	2	Rcc3123 Rcc3124	AB AC
NICARAGUA				
27. Río Tamarindo, Nicaragua (Rtm)	<i>Agonostomus monticola</i>	2	Rtm3116	BE
			Rtm3117	BF
	<i>Poecilia gillii</i>	2	Rtm3118	BG
			Rtm3119	BH
	<i>Sicydium</i> sp.	3	Rtm3120	BF
			Rtm3122	BF
			Rtm3121	BI
28. Río Mico, Nicaragua (Rmc)	<i>Poecilia gillii</i>	3	Rmc3104 Rmc3105 Rmc3106	AZ AZ AZ
COSTA RICA				
29. Río Ciruelas (Rcr)	<i>Sicydium salvini</i>	2	Rcr1744	BO
			Rcr1745	BO
	<i>Poecilia gillii</i>	2	Rcr1746	BO
			Rcr1747	BO

ANEXO 2. Host-induced phenotypic plasticity in *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008 (Digenea: Haploporidae) a parasite of freshwater, brackish and marine fishes from Middle America.

Research Article

Cite this article: González-García MT, Andrade-Gómez L, Pinacho-Pinacho CD, Sereno-Uribe AL, García-Varela M (2021). Host-induced phenotypic plasticity in *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008 (Digenea: Haploporidae) a parasite of freshwater, brackish and marine fishes from Middle America. *Parasitology* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002334>

Received: 22 October 2020
Revised: 27 November 2020
Accepted: 2 December 2020


Key words:

Definitive hosts; molecular markers; phenotypic plasticity; taxonomy; Trematoda

Author for correspondence:

Martín García-Varela,
E-mail: garciav@ib.unam.mx

Host-induced phenotypic plasticity in *Saccocoelioides lamothei* Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008 (Digenea: Haploporidae) a parasite of freshwater, brackish and marine fishes from Middle America

Marcelo Tonatiah González-García¹, Leopoldo Andrade-Gómez^{1,2}, Carlos Daniel Pinacho-Pinacho³, Ana Lucia Sereno-Uribe¹ and Martín García-Varela¹ 

¹Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Ciudad de México, México; ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C. P. 04510, Ciudad de México, México and ³Investigador Cátedras CONACyT, Instituto de Ecología, A.C., Red de Estudios Moleculares Avanzados, Km 2.5 Ant. Carretera a Coatepec, Xalapa, Veracruz 91070, México

Abstract

Saccocoelioides is a genus of trematodes associated with fishes from the Americas. In the current research, morphologically distinct specimens of *Saccocoelioides* spp. were collected from six countries in Middle America. Specimens were sequenced using three molecular markers, the domains D1–D3 of the large subunit (LSU) from the nuclear rDNA, the cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) from mitochondrial DNA. A total of 74 new sequences were compared and aligned with other sequences available in GenBank. Maximum likelihood and Bayesian inference analyses were inferred from the LSU and *cox1* datasets, revealing unequivocally that all the specimens correspond to *S. lamothei*. A haplotype network was built with 119 sequences of the *nad1* gene. The network detected 57 distinct haplotypes divided into three haplogroups. To explore morphological differences among samples of *S. lamothei*, 17 morphological features were measured from 53 specimens from three fish families: Eleotridae, Mugilidae and Gobiidae. Principal component analysis yielded three main polygons that corresponded with each family analysed, suggesting host-induced phenotypic plasticity. The current evidence suggests that *S. lamothei* infects at least five fish families along the Pacific coasts of Mexico, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua and Costa Rica.

Introduction

Phenotypic plasticity is the ability of a single species to produce multiple distinct phenotypes in response to the environmental conditions (Miner *et al.*, 2005). In parasites, with complex life cycles, different environmental conditions include (1) the host's immune system, (2) different host species and (3) the geographical distribution of the definitive hosts. All of these factors are correlated with the phenotypic plasticity, mainly in the body size or fecundity of parasites (Poulin, 2007).

Trematodes species are characterized mainly using morphological features, such as body size, proportion, shape and location of internal organs. Understanding the phenotypic plasticity in populations is essential and key to defining, recognizing and delineating species (Hildebrand *et al.*, 2015). Parasite taxonomy has heeded the call to shift toward 'integrative taxonomy', i.e. the use of multiple and complementary sources (Dayrat, 2005). The recent application of molecular markers in species identification has uncovered an extraordinary genetic richness in parasites, revealing many times more species than presently described (Poulin, 2011; Pérez-Ponce de León and Nadler, 2011). In addition, integrative taxonomy has helped to define, recognize, delineate and better understand the intraspecific variation that can be attributed to differences in the development and phenotypic plasticity of parasites (Hildebrand *et al.*, 2015; Poulin and Presswell, 2016).

Saccocoelioides Szidat, 1954 is the most diverse genus of trematodes belonging to the subfamily Chalcinotrematinae, and includes 24 recognized species, of which 14 are distributed in South America, seven in Middle America, two in North America and one in Puerto Rico; all these species are associated with freshwater, brackish and marine fishes from 10 families (Curran *et al.*, 2018; Andrade-Gómez *et al.*, 2019; Gallas and Utz, 2019). The genetic library of species of *Saccocoelioides* has increased significantly in the last few years. Curran *et al.* (2018) and Andrade-Gómez *et al.* (2019) evaluated the systematics of the genus

Saccocoelioides by combining nuclear and mitochondrial molecular markers, and ecological and morphological characteristics, detecting an extraordinary diversity in the Americas. Currently, Middle America harbours seven species of *Saccocoelioides*, *S. macrospinosus* Andrade-Gómez *et al.*, 2019; *S. orosiensis* Curran *et al.*, 2018; *S. tkachi* Curran *et al.*, 2018; *S. olmecae*, Andrade-Gómez *et al.*, 2016; *S. cichlidorum* (Aguirre-Macedo and Scholz, 2005) Andrade-Gómez *et al.*, 2017; *S. chauhani* Lamothe-Argumedo, 1974; and *S. lamothei* Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008.

Saccocoelioides lamothei was described from the Pacific fat sleeper fish, *Dormitator latrifons* Richardson, 1844, from coastal lagoons of Guerrero state, Mexico (Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008), and was subsequently reported as being associated with four fish species from three families (Poeciliidae, Profundulidae and Gobiidae) along the Pacific coasts of Middle America (Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008; Pinacho-Pinacho *et al.*, 2015; Andrade-Gómez *et al.*, 2016, 2017, 2019; Curran *et al.*, 2018). Curran *et al.* (2018) noted that the biodiversity of *Saccocoelioides* in Middle America is far from well-known and that parasitological studies that combine morphological and molecular data are necessary to documenting its diversity in this biogeographical region.

The aim of the present study was to combine morphological and molecular characteristics to investigate the specific status of *Saccocoelioides* spp. in association with five fish families: Eleotridae, Mugilidae, Gobiidae, Poeciliidae and Profundulidae distributed along the Pacific coasts of Mexico, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua and Costa Rica in Middle America. Sequences of three molecular markers were generated: the domains D1–D3 of the large subunit (LSU) from nuclear ribosomal DNA, the cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) from mitochondrial DNA.

Materials and methods

Specimen collection

Digeneans were collected from 2010 through 2019 from the intestines of their definitive hosts in 29 localities from Middle America, 19 from Mexico, three from Guatemala, three from El Salvador, two from Nicaragua, one from Honduras and one from Costa Rica (see Fig. 1; Table 1). Fishes were collected with seine nets, cast nets and electrofishing, kept alive and transported to the laboratory. Each fish was euthanized and immediately examined. The collected digeneans were preserved either in 100% ethanol for DNA extraction or in hot (steaming) 4% formalin for morphological examination. Fishes were identified following the keys of Miller *et al.* (2005).

Amplification, sequencing of DNA, phylogenetic analyses and haplotype network

Each specimen of *Saccocoelioides* spp. was placed individually in tubes and digested overnight at 56°C in a solution containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na₂ EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl and 0.1 mg/ml proteinase K. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant using the DNAzol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. The domains D1–D3 of the LSU of nuclear ribosomal DNA plus two partial regions of mitochondrial DNA, cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) were amplified using polymerase chain reaction (PCR). Domains D1–D3 from LSU were amplified using forward 5'–AGCGGAGAAAAGAACTAA–3' (Nadler *et al.*, 2000) and

reverse 5'–CAGCTATCCTGAGGGAAAC–3' primers (García-Varela and Nadler, 2005). Two new primers were designed for the fragment of the *cox1*, forward primer SaccoF, 5'–TGTA AACGACGGCCAGTTTWCITTRGATCATAAG–3' and reverse primer SaccoR, 5'–TAAAGAAAGAACATAATGAAAA TG–3'. Finally, the gene *nad1* was amplified using forward 5'–AGATTCGTAAGGGGCCTAATA–3' (Morgan and Blair, 1998) and reverse 5'–CTTCAGCCTCAGCATAAT–3' primers (Kostadinova *et al.*, 2003). PCR reactions (25 µL) consisted of 1 µL of each primer (10 µM), 2.5 µL of 10× buffer, 1.5 µL of 2 mM MgCl₂, 0.5 µL of dNTPs (10 mM), 16.375 of water, 2 µL of genomic DNA and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling condition amplifications included denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, annealing at 40°C for *cox1* and 50°C for *nad1* and LSU for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by postamplification incubation at 72°C for 10 min. The sequencing reactions were performed using the initial primers *cox1*, *nad1* and LSU plus two internal primers: forward 5'–CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG–3' and reverse 5'–CGT CTTGAAACACGGACTAAGG–3' primers (García-Varela and Nadler, 2005), for LSU with ABI Big Dye (Applied Biosystems, Boston, MA, USA) terminator sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using an ABI 3730 capillary DNA sequencer. Contigs were assembled and base-calling differences resolved using CodonCode Aligner v 9.0.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Sequences obtained in the current research for LSU and *cox1* were aligned with sequences of *Saccocoelioides* spp., downloaded from GenBank (Table 1). In addition, sequences obtained for *nad1* of *Saccocoelioides* spp., and *S. lamothei* from type host and type locality, were aligned.

Sequences of each molecular marker were aligned separately using the software SeaView v.4 (Gouy *et al.*, 2010) and adjusted with the Mesquite program (Maddison and Maddison, 2011). The nucleotide substitution model was selected for each molecular marker using jModelTest v0.1.1 (Posada, 2008) and applying the Akaike information criterion; for the LSU dataset, the selected model was TVM + I, and for *cox1* TrN + I + G. The phylogenetic analyses were performed with LSU and *cox1* using maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods, using the online interface Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010). The ML analyses were carried out with RAxML v.7.0.4 (Silvestro and Michalak, 2011), and 10 000 bootstrap replicates were run to assess nodal support. The BI analyses were inferred with MrBayes v.3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012), with two simultaneous runs of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) for 10 million generations, sampled every 1000 generations, a heating parameter value of 0.2 and a 'burn-in' of 25%. Trees were drawn using FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2012). The genetic divergence among taxa was estimated using uncorrected 'P' distances with the program MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013).

In order to examine the relationships among *Saccocoelioides* spp., the *nad1* haplotype frequency was estimated, an unrooted statistical network was constructed using the program NETWORK version 5.0 (www.fluxus-engineering.com) keeping the $\epsilon = 0$. This method starts with minimum spanning trees combined within a single network and then, to reduce tree length, median vectors (consensus sequences) are added. Such vectors can be interpreted as possibly extant unsampled sequences or extinct ancestral sequence (Bandelt *et al.*, 1999). In addition, the median-joining algorithm was employed to build the network.

Morphometrics analysis

Unflattened specimens preserved in formalin were stained with Mayer's paracarmine, dehydrated in a graded ethanol series,

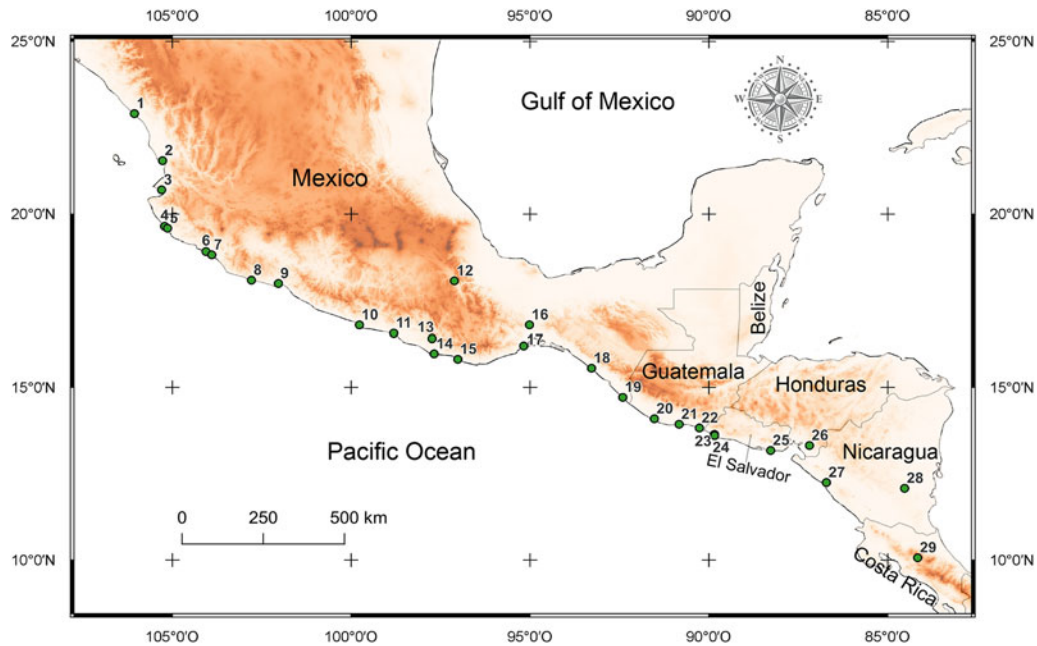


Fig. 1. Map indicating the 29 localities for *Saccocoelioides* spp., in Middle America; localities correspond with Table 1.

cleared with methyl salicylate and mounted on permanent slides with Canada balsam. Specimens collected in the present study were compared with the specimens of *S. lamothei* deposited at the Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. All the specimens were examined using a bright-field Leica DM1000 LED compound microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and new specimens were deposited in CNHE.

Drawings were made using a drawing tube attached to the microscope. A total of 17 morphological features (BL, body length; BW, maximum body width; OSL, oral sucker length; OSW, oral sucker width; VSL, ventral sucker length; VSW, ventral sucker width; P, prepharynx; PHL, pharynx length; PHW, pharynx width; HSL, hermaphroditic sac length; HSW, maximum hermaphroditic sac width; TL, testis length; TW, testis width; OL, ovary length; OW, ovary width; EL, egg length; EW, egg width) were measured of 53 individuals with the Leica Application Suite microscope software. All measurements are in micrometres (μm). A principal component analysis (PCA) was implemented to explore and describe the patterns of morphological variation of the specimens. PCA was conducted using R-packages ggplot2, ggfortify, cluster and alpha implemented in R (R Core Team, 2016). For the analysis, 21 specimens identified as *S. lamothei* from CNHE (4349, 4350, 4906, 6671, 9370–9373), and 32 newly collected individuals from *Saccocoelioides* spp. were selected. PCA included the 17 characteristics; BL, BW, OSL, OSW, VSL, VSW, P, PHL, PHW, HSL, HSW, TL, TW, OL, OW, EL, EW.

Results

Phylogenetic trees

The LSU dataset included 1271 characters and the best model obtained was TVM+I. The alignment included a total of 91 sequences, 74 new sequences of *Saccocoelioides* spp., plus six sequences of *S. lamothei* (KU061120–KU061124, MG925110) and one sequence each of *S. chauhani* (KU061119), *S. macrospinosus* (MK749169), *S. olmecae* (KU061136), *S. orosiensis* (MG925108), *S. tkachi* (MG925122), *S. cichlidorum* (MG925106), *S. sogandaresi* (MG925120), *S. magnus* Szidat, 1954 (MG925112), *S. elongatus*

Szidat, 1954 (MG925108), *S. nanii* Szidat, 1954 (MG925114) and *S. beauforti* Hunter and Thomas, 1961 (MG925104) (see Table 1). The phylogenetic analyses inferred with ML and BI yielded several clades. The base of the tree was formed by a polytomy that contained two species from South America, *S. magnus* and *S. elongatus*. Another clade was formed by *S. orosiensis* and *S. nanii* and an unresolved branch belonging to *S. macrospinosus*. Other clade was formed by four species (*S. sogandaresi*, *S. chauhani*, *S. olmecae* and *S. beauforti*). A clade was formed by *S. tkachi* and *S. cichlidorum* which was supported with a good bootstrap value and Bayesian posterior probabilities (Fig. 2). The remaining new sequences of *Saccocoelioides* spp. formed a clade that included six sequences previously identified as *S. lamothei*, two (KU061120–KU061121) from the type host and type locality; others from Chachagua, Oaxaca, Mexico (KU01122–KU01124) and one (MG925110) from Río Tempisque, Costa Rica. This clade received strong support from the bootstrap and Bayesian posterior probabilities (100/1) (Fig. 2).

The genetic divergence estimated using the LSU dataset from rDNA among the new sequences of *Saccocoelioides* spp. and *S. lamothei* ranged from 0 to 0.31%. The monophyly of the new sequences and the six sequences previously identified as *S. lamothei*, in combination with the low genetic divergence among the sequences, suggests that all new sequences belong to *S. lamothei*, expanding its distribution range and host spectrum along the Pacific coasts of Middle America.

A second dataset for the *cox1* gene included 588 characters, and the best selected model was TrN+I+G. The alignment included 57 terminals, 47 new sequences of *S. lamothei*, plus 10 sequences of the genus *Saccocoelioides*, two of *S. lamothei* (MK749571–72) from the type host and type locality, two of *S. orosiensis* (MK749590 and MK749602), two of *S. tkachi* (MK749577–78) and one of *S. cichlidorum* (MK749574), *S. olmecae* (MK749584), *S. macrospinosus* (MK749566) and *S. chauhani* (MK749589) (Table 1). The phylogenetic analyses inferred with ML and BI from the *cox1* dataset showed that the specimens collected in this study formed a clade with specimens previously identified as *S. lamothei* with strong support from the bootstrap and Bayesian posterior probabilities (100/1) (Fig. 3), suggesting that all of the sequences belonged to the

Table 1. Specimens analysed in this study; localities (in parenthesis are localities sampled in this study and correspond with Fig. 1); host species; host family and GenBank accession numbers of each molecular marker. Sequences in bold were generated in this study

Species	Locality	Host	Family	LSU	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	References
<i>Saccocoeloides olmecae</i>	Tamiahua, Veracruz, México 21°15'49"N, 97°27'41"W	<i>Dormitator maculatus</i>	Eleotridae	KU061128	MK749584	–	Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2016)/ Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2019)
<i>Saccocoeloides chauhani</i>	Catemaco, Veracruz, México 18°25'0"N, 95°7'0"W	<i>Astyanax aeneus</i>	Characidae	KU061117	MK749589	–	
<i>Saccocoeloides macrospinosus</i>	Catemaco, Veracruz, México	<i>Poeciliopsis catemaco</i>	Poeciliidae	–	MK749566	–	Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2019)
	Alvarado, Veracruz, México 18°46'47"N, 95°44'50"W	<i>Mugil curema</i>	Mugilidae	MK749169	–	–	
<i>Saccocoeloides orosiensis</i>	Tlacotalpan, Veracruz, México 18°36'0"N, 95°39'0"W	<i>Poecilia sphenops</i>	Poeciliidae	–	MK749602	–	
<i>Saccocoeloides orosiensis</i>	Río Ciruelas, Costa Rica 10° 3'38"N, 84°45'31"W	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	–	MK749590	–	
<i>Saccocoeloides cichlidorum</i>	Río Torsuani, Nicaragua 11° 47'06"N, 83°52'38"W	<i>Paraneetroplus maculicauda</i>	Cichlidae	–	MK749574	–	
<i>Saccocoeloides tkachi</i>	Palo de Arquito, Nicaragua 11°7'12"N, 84°36'5"W	<i>Astyanax aeneus</i>	Characidae	–	MK749577	–	
<i>Saccocoeloides tkachi</i>	Río Pérez, Nicaragua 11° 45'0.8"N, 84°14'11.5"W	<i>Astyanax aeneus</i>	Characidae	–	MK749578	–	
<i>Saccocoeloides tkachi</i>	Río Tempisque, Costa Rica 10°47'21"N, 85°33'03"W	<i>Astyanax aeneus</i>	Characidae	MG925122	–	–	Curran <i>et al.</i> (2018)
<i>Saccocoeloides cichlidorum</i>	Río Animas, Costa Rica 11° 02'54"N, 85°35'09"W	<i>Archocentrus nigrofasciatus</i>	Cichlidae	MG925106	–	–	
<i>Saccocoeloides orosiensis</i>	Río Tempisque, Costa Rica	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	MG925116	–	–	
<i>Saccocoeloides magnus</i>	Río de la Plata, Argentina 34° 48'48"S, 57°58'25"W	<i>Cyphocarynx voga</i>	Characidae	MG925112	–	–	
<i>Saccocoeloides elongatus</i>	Río de la Plata, Argentina	<i>Prochilodus lineatus</i>	Prochilodontidae	MG925108	–	–	
<i>Saccocoeloides nanii</i>	Los Talas, Argentina 34° 53'56"S, 57°48'17"W	<i>Prochilodus lineatus</i>	Prochilodontidae	MG925114	–	–	
<i>Saccocoeloides sogandaresi</i>	Texas, United States 27° 30'29"N, 97°50'08"W	<i>Poecilia latipinna</i>	Poeciliidae	MG925120	–	–	
<i>Saccocoeloides beauforti</i>	North Carolina, United States 34°11'05"N, 77° 48'52"W	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	MG925104	–	–	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	Río Tempisque, Costa Rica 10°47'21"N, 85°33'03"W	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	MG925110	–	–	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(10) Tres Palos, Guerrero, México 16°48'0"N, 99°47'0"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	KU061120–21	MK749571–72	MW287784–85	Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2016)/ Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2019)/ This study

<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(13) Chacahua, Oaxaca, México 15°58'4.73"N, 97°40'55.44"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	KU061122–24 MW282051–53	MW287346–47	MW287786–95	Andrade-Gómez <i>et al.</i> (2016)/ This study
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(1) El Huizache, Sinaloa, México 22°54'29"N, 106°3'39.48"W	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	MW282054	MW283184	MW287796–98	This study
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(2) La Tovara, Nayarit, México 21°32'43.6"N, 105°16'24.1"W	<i>Dormitator latifrons</i> <i>Mugil cephalus</i>	Eleotridae Mugilidae	MW282055 MW282056	–	MW287799–802 MW287803–10	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(3) Nuevo Vallarta, Nayarit, México 20°41'57"N, 105°17'56.7"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	MW282057–58	MW283185–87	MW287811–15	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(4) Quémaro, Jalisco, México 19°38'40.2"N, 105°12'55.5"W	<i>Dormitator latifrons</i> <i>Mugil</i> sp.	Eleotridae Mugilidae	MW282059–60 MW282061–62	MW283188–89 MW283190	MW287816–18 MW287819–20	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(5) Playa Punta Pérula, Jalisco, México 19°35'16.7"N, 105°8'7.526"W	<i>Mugil</i> sp.	Mugilidae	MW282063	–	MW287821	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(6) Cuyutlán, Colima, México 18°54'45.39"N, 104°3'36.74"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	MW282064–65	MW283191–94	MW287822–26	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(7) Estero Tecuanillo, Colima, México 18°49'2.34"N, 103°53'54.70"W	<i>Mugil</i> sp.	Mugilidae	MW282066	MW283195	MW287827	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(8) Barra de Nexpa, Michoacán, México 18°5'0.24"N, 102°47'18.366"W	<i>Mugil</i> sp.	Mugilidae	MW282067–68	–	MW287828–31	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(9) Playa Las Peñitas, Guerrero, México 17°59'16.718"N, 102°2'5.01"W	<i>Mugil</i> sp.	Mugilidae	MW282069–79	MW283196–203	MW287832–43	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(11) Marquelia, Guerrero, México 16°33'19.75"N, 98°48'38.89"W	<i>Mugil curema</i>	Mugilidae	MW282080–81	–	MW287844–45	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(12) Río Salado, Oaxaca, México 18°3'52.7"N, 97°6'58.399"W	<i>Poeciliopsis gracilis</i> <i>Poecilia sphenops</i>	Poeciliidae	MW282082–84 MW282085	MW283204 MW283205	MW287846–47 MW287848	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(14) San José de las Flores, Oaxaca, México 16°24'21.5"N, 97°44'22.599"W	<i>Sicydium multipunctatum</i> <i>Profundulus</i> sp.	Gobiidae Profundulidae	MW282090–91 MW282086–88	MW283206–07 –	MW287849–51 MW287852–54	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(15) Barra de Navidad, Oaxaca, México 15°48'39"N, 97°1'10.999"W	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	MW282092–93	MW283208	MW287855–56	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(16) Matías Romero, Oaxaca, México 16°47'30.8"N, 95°0'59"W	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	MW282094	MW283209	MW287857	

(Continued)

Table 1. (Continued.)

Species	Locality	Host	Family	LSU	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	References
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(17) La Ventosa, Oaxaca, México 16°11'42.67"N, 95°10'40.79"W	<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	–	MW283210	MW287859–61	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(18) Pijijiapan, Chiapas, México 15°33'12"N, 93°16'55.999"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	–	MW283211	MW287862–63	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(19) Puerto Chiapas, Chiapas, México 14°42'36.46"N, 92°24'30.91"W	<i>Mugil</i> sp.	Mugilidae	MW282095	–	MW287864–68	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(20) Río Nahualate, Guatemala 14°5'19.039"N, 91°31'28.87"W	<i>Poecilia mexicana</i> <i>Poeciliopsis gracilis</i>	Poeciliidae	MW282096–97 MW282098–99	– MW283212	MW287869–70 MW287871–72	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(21) Puerto San José, Guatemala 13°55'49.375"N, 90°50'2.98"W	<i>Mugil curema</i>	Mugilidae	MW282100–01	MW283213–14	MW287873–74	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(22) Las Lisas, Guatemala 13°49'19.942"N, 90°16'2.23"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	MW282102	MW283215	MW287875–76	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(23) Río Sunza, El Salvador 13°38'14"N, 89°50'40.99"W	<i>Sicydium</i> sp. <i>Poecilia mexicana</i>	Gobiidae Poeciliidae	MW282103–04 MW282105	– MW283216	MW287877–78 MW287879–80	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(24) Río Banderas, El Salvador 13°36'2.618"N, 89°50'26.19"W	<i>Awaous banana</i> <i>Dajaus monticola</i>	Gobiidae Mugilidae	MW282106–07 MW282108–09	MW283217 MW283218–19	MW287881–82 MW287883–85	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(25) Bahía de San Antonio, El Salvador 13°10'12.65"N, 88°16'29.87"W	<i>Dormitator latifrons</i>	Eleotridae	MW282110–12	MW283220–22	MW287886–88	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(26) Río Choluteca, Honduras 13°18'57"N, 87°11'23.999"W	<i>Poecilia mexicana</i>	Poeciliidae	MW282113–14	MW283223	MW287889–90	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(27) Río Tamarindo, Nicaragua 12°14'33.82"N, 86°42'57.26"W	<i>Sicydium</i> sp. <i>Dajaus monticola</i> <i>Poecilia gillii</i>	Gobiidae Mugilidae Poeciliidae	MW282115–16 MW282117 MW282118–19	MW283224–25 – MW283226	MW287891–93 MW287894–95 MW287896–97	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(28) Río Mico, Nicaragua 12°4'32.016"N, 86°31'47.95"W	<i>Poecilia gillii</i>	Poeciliidae	MW282120	MW283227	MW287898–900	
<i>Saccocoeloides lamothei</i>	(29) Río Ciruelas, Costa Rica 10°3'51.576"N, 84°9'49.646"W	<i>Sicydium salvini</i> <i>Poecilia gillii</i>	Gobiidae Poeciliidae	MW282121–22 MW282123	– MW283228	MW287901–02 MW287903–04	

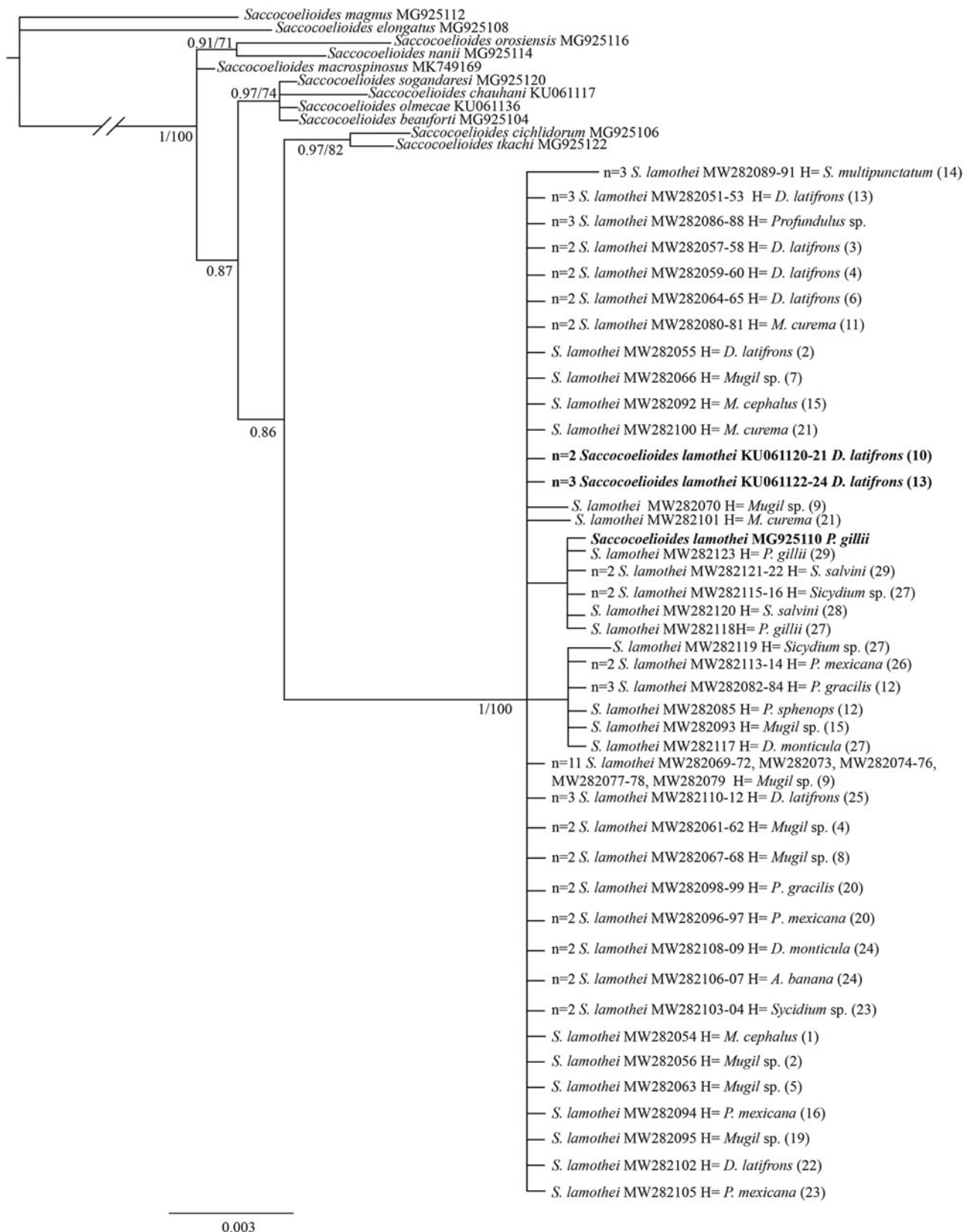


Fig. 2. Maximum likelihood tree and consensus Bayesian inference trees inferred from the LSU dataset. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies and posterior probabilities (BI). *n*, number of identical sequences; H, host name. In parenthesis, number of locality (Table 1). Sequences in bold of *Saccocoelioides lamothei* were downloaded from GenBank

same lineage. The genetic intraspecific divergence estimated with the *cox1* dataset among the new sequences and two sequences of *S. lamothei* from the type host and type locality ranged from 0 to 6.62%.

Haplotype network

A haplotype network was built using the *nad1* gene. This dataset was formed by 119 specimens with 485 characters and 57

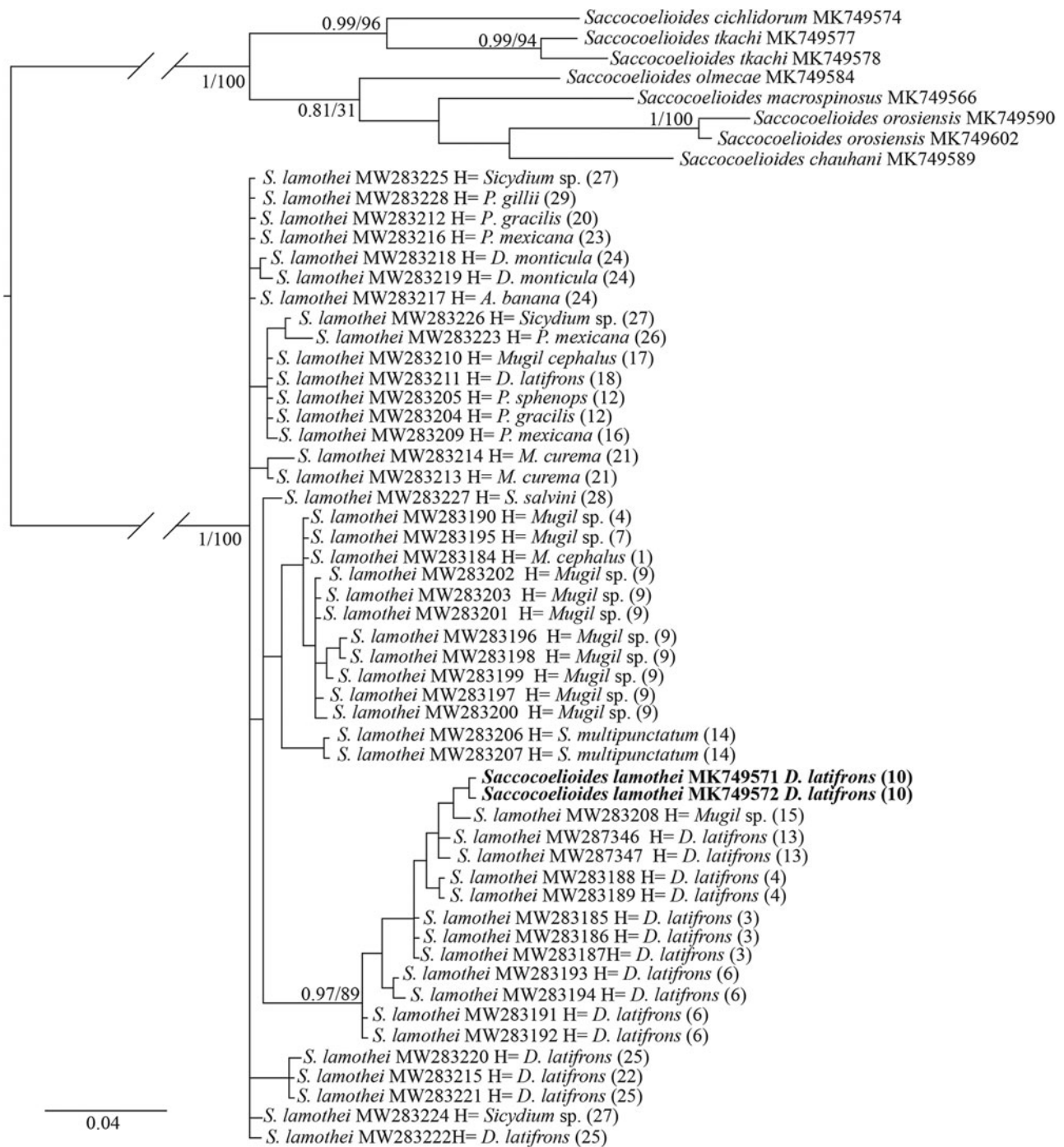


Fig. 3. Maximum likelihood tree and consensus Bayesian inference trees inferred with *cox1* dataset; numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies and posterior probabilities (BI). H, host. In parenthesis, number of locality (Table 1). Sequences in bold of *Saccocoelioides lamothei* were downloaded from GenBank.

haplotypes were detected. The haplotype network yielded three haplogroups separated by a few mutational steps (no more than 12 steps) (Fig. 4). The first haplogroup contained 17 distinct haplotypes from 32 specimens from eleotrid and mugilid fishes. The second haplogroup contained three haplotypes (BS, BU and BT) from mugilid fishes. Only the third haplogroup contained 37 distinct haplotypes from 84 individuals from five host families (see Table S1). The most frequent haplotype was CB, which was formed by 13 specimens from four localities (4, 5, 9, 25 see Fig. 5; Table S1) in two countries, Mexico and El Salvador, from eleotrid and mugilid fishes. Most of the haplotypes had a restricted geographic distribution. For instance, five localities (3, 7, 10, 23, 29) showed a unique haplotype (a single haplotype

per locality; AD, BJ, BO, CD, CF), and 15 localities (2, 4, 6, 9, 11, 13–15, 18–20, 24–27) had 45 exclusive haplotypes. The remaining nine localities (1, 5, 8, 12, 16, 17, 21, 22, 28) shared haplotypes (Fig. 5; Table S1).

Morphometric analyses

Morphometric analysis was conducted to corroborate that the morphological differences among the isolates of *S. lamothei* were associated with their different hosts. A total of 17 variables were considered from 53 specimens (Table 2). PCA was used to classify host species (Fig. 6A). The measurements of the specimens from *D. latifrons* formed a separate polygon. However,

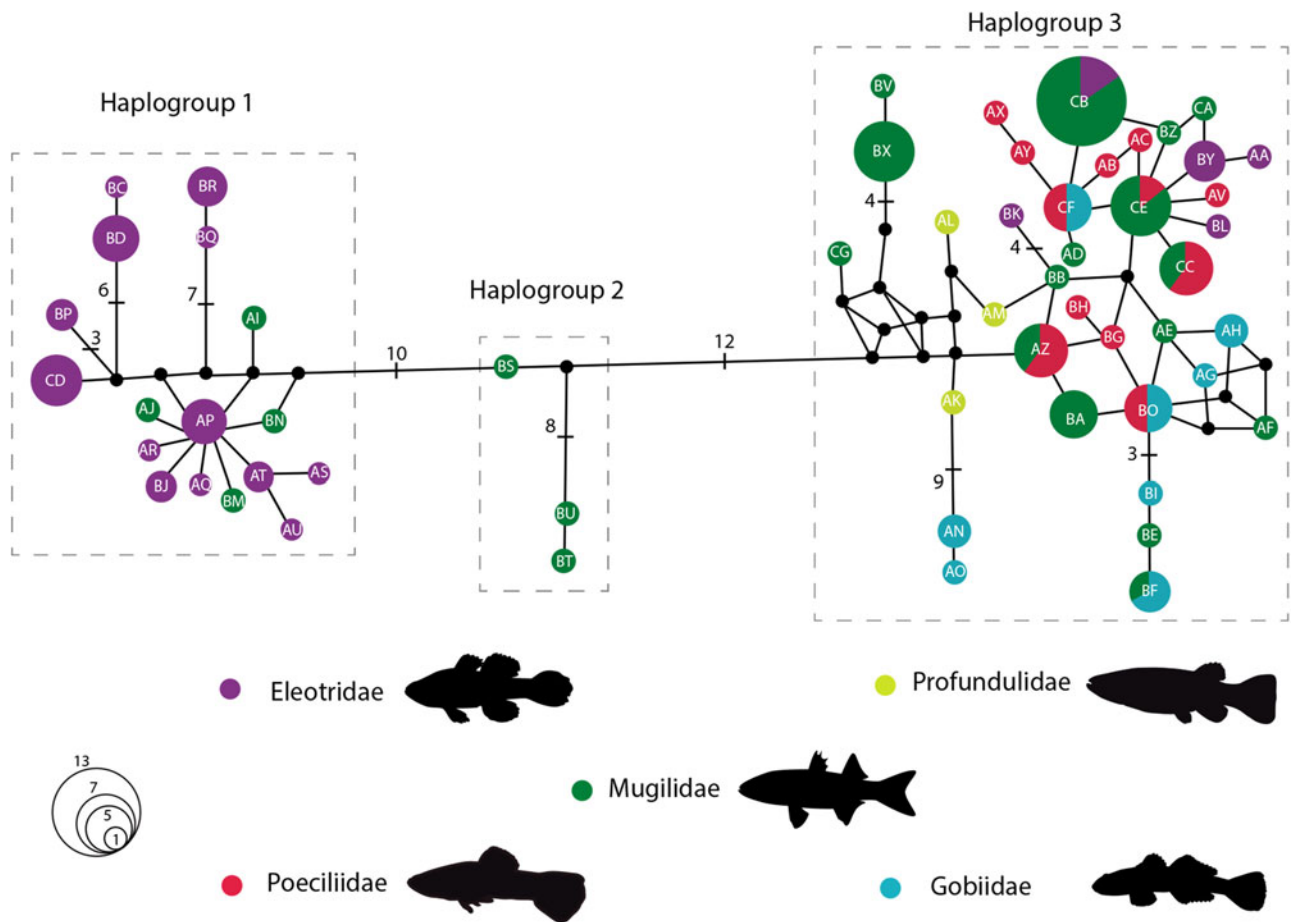


Fig. 4. Haplotype network of samples of *Saccocoeilioides lamothei*, build with the gene nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*). Each circle represents a haplotype, with size proportional to the haplotype's frequency in the populations. The haplotype name is indicated in letters and corresponds with Table S1.

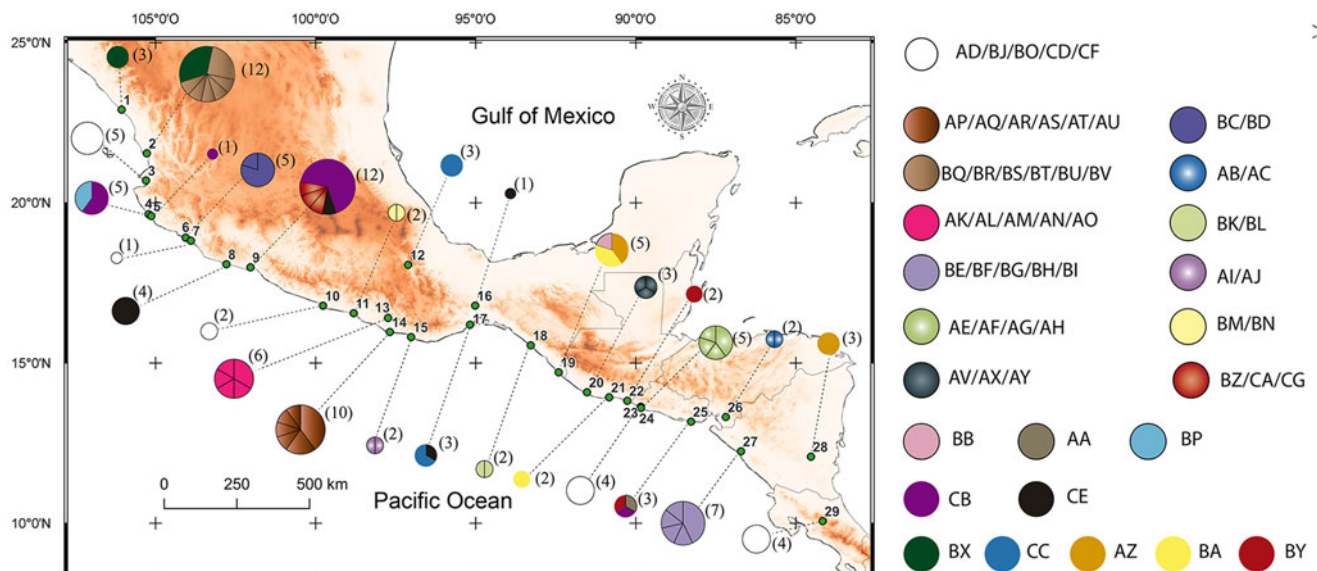


Fig. 5. Distribution of haplotypes in the localities sampled of *Saccocoeilioides lamothei*. Size corresponds to the number of specimens sampled (see Table S1).

the measurements of the other specimens from different host species overlapped with each other (Fig. 6A). Later, the measurements of specimens from each host species were clustered by host families (Eleotridae, Mugilidae and Gobiidae). PCA showed three polygons representing each definitive host family (Fig. 6B). Those three polygons relate to each morphotype found (Fig. 7).

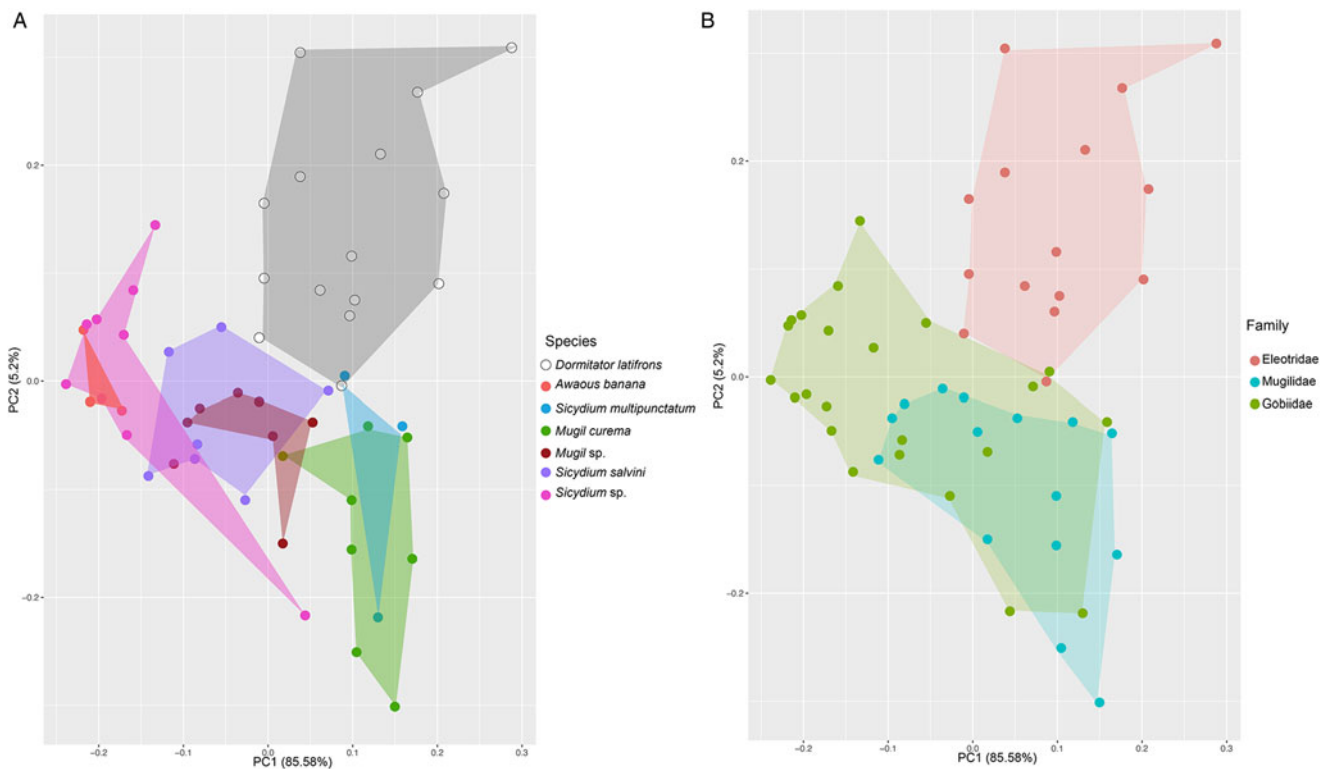
Morphological description

Saccocoeilioides lamothei Aguirre-Macedo and Violante-Gonzalez, 2008.

Based on 53 specimens studied from *Dormitator latifrons*, *Mugil curema*, *Mugil* sp., *Sicydium multipunctatum*, *Sicydium* sp.

Table 2. Comparative morphometric data for the three morphotypes of *Saccoceioides lamothei*.

Host	<i>Dormitator latifrons</i> (n = 15)	<i>Mugil curema</i> (n = 7) and <i>Mugil</i> sp. (n = 8)	<i>Sicydium multipunctatum</i> (n = 4), <i>S. salvini</i> (n = 7), <i>Sicydium</i> sp. (n = 9) and <i>Awaous banana</i> (n = 3)	
Host family	Eleotridae	Mugilidae	Gobiidae	
Locality	México: Tres Palos, Coyuca and Chachahua	México: Puerto Chiapas Guatemala: Puerto San José	México: San José de las Flores El Salvador: Río Sunza and Río Banderas Nicaragua: Río Tamarindo Costa Rica: Río Ciruelas	Total (n = 53)
BL	420–850	533–906	371–876	371–906
BW	240–510	206–441	134–438	134–510
OSL	63–155	68–100	51–129	51–155
OSW	77–127	91–119	54–135	54–135
VSL	71–131	78–130	62–123	62–131
VSW	82–151	96–143	61–185	61–185
P	7.5–23	12–29	6–26	6–29
PHL	52–112	54–93	52–106	52–112
PHW	55–115	52–95	46–117	46–117
HSL	99–215	96–181	59–170	59–215
HSW	36–130	51–107	40–107	36–130
TL	90–207	107–213	52–164	52–213
TW	67–166	75–144	48–134	48–166
OL	31–79	42–77	28–80	28–80
OW	11–51	27–63	17–63	11–63
EL	80–135	55–94	47–92	47–135
EW	50–80	33–58	38–69	33–80

**Fig. 6.** Principal component analysis conducted with 17 morphometric variables from 53 specimens of *Saccoceioides lamothei*. (A) Specimens analysed by host species. (B) Specimens analysed by host families.

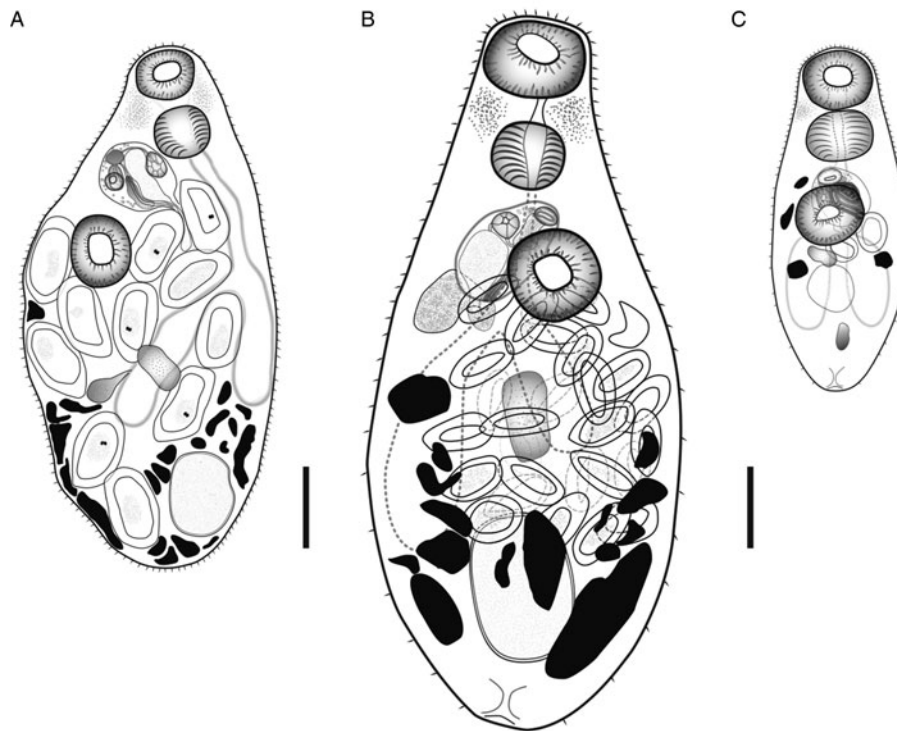


Fig. 7. Morphotypes of *Saccocoelioides lamothei*: (A) from *Dormitator latifrons*, Tres Palos, Guerrero, México; (B) from *Mugil curema*, Puerto San José, Guatemala; (C) from *Sycidium* sp., Río Tamarindo, Nicaragua. Scale bars = 100 μ m

and *Awaous banana* from 10 localities distributed in Mexico, Guatemala, El Salvador, Nicaragua and Costa Rica (Table 2).

Tegument entirely covered by minute spines, being scatter in the posterior end in mugilid and gobiid fishes (Fig. 7A–C). Eye-spot remnants present in the anterior of the body reaching half of the pharynx (Fig. 7). Oral sucker subterminal. Ventral sucker slightly anterior to middle of the body or at the middle body in gobiid fishes (Fig. 7C). Prepharynx present or absent in gobiid fishes (Fig. 7C). Pharynx oval to spherical. Oesophagus long. Caeca sac-shaped elongated, terminating in hindbody. Testis oval to subspherical, in the middle of hindbody or the posterior end of hindbody in eleotrid fishes (Fig. 7A). External seminal vesicle small, contiguous to hermaphroditic sac. Hermaphroditic sac oval to spherical, at the level of ventral sucker, or anterior to ventral sucker in eleotrid fishes (Fig. 7A). Internal seminal vesicle elongated to spherical. Genital pore opening anterior to ventral sucker. Ovary elongated at the middle of the body. Laurer's canal not observed, Mehlis' gland not observed. Uterus confined between hermaphroditic sac and testis (Fig. 7B–C) or filling the entire body in eleotrid fishes (Fig. 7A), with the metraterm entering the posterior end of hermaphroditic sac. Vitelline follicles elongated, irregular, distributed in lateral fields from the level of the hermaphroditic sac to the posterior of the testis, anterior in gobiid fishes (Fig. 7C). Eggs operculate. Miracidia observed in eleotrid fishes. Excretory vesicle Y-shaped. Excretory pore terminal (Fig. 7; see Table 2).

Taxonomic summary

Saccocoelioides lamothei Aguirre-Macedo and Violante-González, 2008.

Type-host: *Dormitator latifrons* (Eleotridae).

Other hosts: *Dajaus monticola*, *Mugil cephalus*, *M. curema*, *Mugil* sp. (Mugilidae), *Poecilia gillii*, *Poecilia mexicana*, *Poecilia sphenops*, *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae), *A. banana*, *S. multipunctatum*, *Sycidium salvini*, *Sycidium* sp. (Gobiidae) y *Profundulus* sp. (Profundulidae).

Type-locality: Tres Palos, Guerrero, México.

Other localities: México: El Huizache, Sinaloa; La Tovar and Nuevo Vallarta, Nayarit; Quémaro and Playa Punta Pérula, Jalisco; Cuyutlán and Estero Tecuanillo, Colima; Barra de Nexpa, Michoacán; Playa las Peñitas and Marquelia, Guerrero; Río Salado, San José de las Flores, Chachagua, Barra Navidad, Matías Romero and Ensenada la Ventosa, Oaxaca; Pijijiapán and Puerto Chiapas, Chiapas. Guatemala: Río Nahualate, Puerto San José and Las Lisas. El Salvador: Río Sunza, Río Banderas and Bahía de San Antonio. Honduras: Río Choluteca. Nicaragua: Río Tamarindo. Costa Rica: Río Ciruelas.

Site in host: Intestine.

Discussion

The phylogenetic analyses inferred with the LSU unequivocally placed all the new sequences from the Pacific coasts of Middle America into a monophyletic clade together with six sequences previously identified as *S. lamothei*, including specimens from the type host and type locality (see Fig. 2). The genetic divergence estimated among the 12 species of the genus *Saccocoelioides* ranged from 0.2 to 5.7% and its range was similar than found previously by Andrade-Gómez *et al.* (2019), who reported a range of genetic divergence from 0 to 4.8%. The intraspecific genetic divergence among the isolates of *S. lamothei* ranged from 0 to 0.31% for LSU. The intraspecific divergence found herein is similar to the LSU reported previously for *S. tkachi* (0–0.2%) and *S. orosienis* (0–0.4%) (Andrade-Gómez *et al.*, 2019). The phylogenetic analysis inferred with the *cox1* clearly distinguished species previously recognized within *Saccocoelioides* (see Fig. 3). The genetic divergence estimated with *cox1* dataset among the seven species of *Saccocoelioides* ranged from 9.7 to 17% and its range (from 8.3 to 17%) was similar than reported previously (Andrade-Gómez *et al.*, 2019). The *cox1* tree placed all the isolates of *S. lamothei* in a monophyletic subclade. From the 49 isolates of *S. lamothei*, 35 were recorded on four fish families (Eleotridae, Poeciliidae, Gobiidae and Mugilidae), with a sympatrical

distribution. The remaining 14 isolates were found in six localities (3, 4, 6, 10, 13 and 15; Fig. 3; Table 1) associated with the Pacific fat sleeper (*D. latifrons*) and a mullet fish (*Mugil* sp.). The fat sleeper is an amphidromous species distributed from Northern Mexico to Ecuador (Galván-Quesada et al., 2016). Meanwhile, mullets are distributed in freshwater, brackish and marine habitats in the Pacific coasts (Colín et al., 2020). The intraspecific genetic divergence among the isolates of *S. lamothei* ranged from 0 to 6.62% for *cox1* [as observed between one specimen from *Mugil* sp. in Barra de Navidad, Oaxaca, Mexico (MW283208), and one from *P. mexicana* Steindachner, 1863, in Río Choluteca, Honduras (MW283223); localities 15 and 26, respectively; Fig. 1; Table 1]. The intraspecific divergence of *cox1* found herein is higher than reported previously; for example, the intraspecific divergence of *S. tkachi* ranged from 0 to 3.1% and for *S. macrospinosus* ranged from 0 to 3.3% (Andrade-Gómez et al., 2019). The current research confirmed that the *cox1* gene is a good molecular marker that allows delineating species and populations within *Saccocoelioides*.

The haplotype network analysis of *nad1* detected 57 distinct haplotypes obtained from 119 individual sequences, which divided into three haplogroups separated by a few mutational steps (fewer than 12 steps) (Fig. 4). The three haplogroups were found in mugilid fishes from 18 localities from four countries (Mexico, Guatemala, El Salvador and Nicaragua). The distribution pattern of *S. lamothei* along the Pacific coasts of Middle America may have been formed by a combination of environmental factors and those related to the biology of the intermediate and definitive hosts, it is well known that adult mullets (*M. cephalus* and *M. curema*) have been found in sympatry (Ibañez et al., 2012; Nirchio et al., 2017; Colín et al., 2020). Both mullet species live and mature sexually in the open sea, where they migrate to different regions following marine currents (Funicelli et al., 1989; Thomson, 1997). Mulletts spawn offshore, and larval stages migrate from the open sea to the estuaries and lagoons near their nursery grounds (De Silva, 1980; Thomson, 1997). The life cycle of three species of the genus *Saccocoelioides* (*S. tilapiae* Nasir and Gómez, 1976; *S. carolae* Lunaschi, 1984; *S. tarpazensis* Díaz and González, 1990) are well known (see Martorelli, 1986; Díaz and González, 1990; Díaz et al., 2009).

Adult worms live and reproduce sexually in the digestive tracts of freshwater fishes, which serve as definitive hosts. Eggs are expelled into the environment in the feces of their host. Then, the eggs develop into miracidia, ciliate free-swimming larval forms that search for and penetrate snails of the genus *Pyrgophorus* Ancey, 1888, which serves as the intermediate host and in which the parasites develop into cercariae. Cercariae emerge from snails and are encysted on the water surface where they develop into metacercariae. Metacercariae are frequently found on aquatic vegetation that is ingested by their definitive hosts (Martorelli, 1986; Díaz and González, 1990; Díaz et al., 2009). Mulletts feed on aquatic vegetation, and their life cycle is completed in the open sea, estuaries and lagoons along the Pacific coasts of Middle America (Ibañez et al., 2012). Andres et al. (2018) noted that mugilid fishes act as 'ecological bridges' between marine, estuarine and freshwater habitats and can disperse parasites along their range of distribution.

Morphometric analyses of the 53 specimens of *S. lamothei* recovered from three host families, exhibited remarkable morphological differences (Fig. 6B). PCA considered 17 variables (Table 2) and clearly showed three polygons corresponding to specimens recovered from the families Eleotridae, Mugilidae and Gobiidae, which sympatrically inhabit the Pacific coasts of Middle America, suggesting host-induced phenotypic plasticity. For example, *S. lamothei* associated with eleotrids has the widest body (240–510 µm); those associated with mugilids have the

longest body (533–906 µm); those associated with gobiids have the smallest testis (52–164 µm) (see Table 2; Fig. 7). The phenotypic plasticity found in *S. lamothei* along its distribution range is consistent with a previous study of *Saccocoelium tensum* Looss, 1902 (a haploporid that parasitizes two mugilids, *Liza ramada* Risso, 1827 and *Liza aurata* Risso, 1810, from the Mediterranean Sea coasts of Spain) which has four morphotypes (Blasco-Costa et al., 2010). Morphological plasticity has also been documented in numerous trematode species, and its variation has been linked to its definitive hosts (Blankespoor, 1974; Pérez-Ponce de León, 1995; Blasco-Costa et al., 2010). Many morphologically distinct taxa of trematodes are assumed to represent several species or complexes of species, but they have been resolved into a single species under molecular and morphometric analyses, showing that parasites can alter their morphology depending on their host. This trait allows them to utilize a wide variety of definitive hosts.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182020002334>

Acknowledgements. We thank Luis García Prieto for providing material from the CNHE and Laura Márquez and Nelly López Ortiz from LaNabio for their help during the sequencing of the DNA fragments. LAG thanks the support of the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and CONACYT (LAG CVU. No. 640068), for granting a scholarship to complete his PhD program.

Financial support. This research was supported by grants from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207219. Specimens were collected under the Cartilla Nacional de Colector Científico (FAUT 0202) issued by the Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) to M.G.V.

Conflict of interest. None.

Ethical standards. Not applicable.

References

- Aguirre-Macedo ML and Violante-González J (2008) *Saccocoelioides lamothei* N. sp. from *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae) from coastal lagoons of Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **79**, 33–40.
- Andrade-Gómez L, Pinacho-Pinacho CD, Hernández-Orts JS, Sereno-Urbe AL and García-Varela M (2016) Morphological and molecular analyses of a new species of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Haploporidae Nicoll, 1914) in the fat sleeper *Dormitator maculatus* (Bloch) (Perciformes: Eleotridae) from the Gulf of Mexico. *Journal of Helminthology* **26**, 1–13.
- Andrade-Gómez L, Pinacho-Pinacho CD and García-Varela, M (2017) Molecular, morphological and ecological data of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Digenea: Haploporidae) from Middle America supported the reclassification from *Culuwiya cichlidorum* to *Saccocoelioides*. *Journal of Parasitology* **103**, 257–267.
- Andrade-Gómez L, Sereno-Urbe AL and García-Varela M (2019) Description of a new species and understanding the genetic diversity of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Haploporidae) in Middle America using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Parasitology International* **71**, 87–98.
- Andres MJ, Pulis EE, Curran SS and Overstreet RM (2018) On the systematics of some marine haploporids (Trematoda) with the description of a new species of *Megasolena* Linton, 1910. *Parasitology International* **67**, 805–815.
- Bandelt H, Forster JP and Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37–48.
- Blankespoor HD (1974) Host induced variation in *Plagiorchis noblei* Park, 1936 (Plagiorchiidae: Trematoda). *American Midland Naturalist* **92**, 415–433.
- Blasco-Costa I, Balbuena JA, Raga JA, Kostadinova A and Olson PD (2010) Molecules and morphology reveal cryptic variation among digeneans infecting sympatric mullets in the Mediterranean. *Parasitology* **137**, 287–302.

- Colín A, Hernández-Pérez Z, Guevara-Chumacero LM, Castañeda-Rico S, Serrato-Díaz A and Ibáñez AL (2020) Are striped mullet (*Mugil cephalus*) philopatric? *Marine Biology* **167**, 10.
- Curran SS, Pulis EE, Andres MJ and Overstreet RM (2018) Two new species of *Saccocoelioides* (Digenea: Haploporidae) with phylogenetic analysis of the family, including species of *Saccocoelioides* from North, Middle and South America. *Journal of Parasitology* **104**, 221–239.
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 407–415.
- De Silva SS (1980) Biology of juvenile grey mullet: a short review. *Aquaculture* **19**, 21–36.
- Díaz MT and González GT (1990) Ciclo de vida de *Saccocoelioides tarpazensis* n. sp. (Trematoda: Haploporidae). *Parasitologia* **41**, 327–336.
- Díaz MT, Bashirullah AK, Hernández LE and Gómez E (2009) Life cycle of *Culuwiya tilapiae* (Nasir y Gómez 1976) (Trematoda: Haploporidae) in Venezuela. *Revista Científica* **5**, 439–445.
- Funicelli NA, Meineke DA, Bryant HE, Dewey MR, Ludwig GM and Mengel LS (1989) Movements of striped mullet, *Mugil cephalus*, tagged in Everglades National Park. *Florida Bulletin of Marine Science* **44**, 171–178.
- Gallas M and Utz LRP (2019) Revalidation of *Saccocoelioides bacilliformis* (Digenea, Haploporidae) parasitizing species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) from southern Brazil. *Iheringia Série Zoológica* **109**, e2019039.
- Galvan-Quesada S, Doadrio I, Alda F, Perdices A, Reina RG, García Varela M, Hernandez N, Campos Mendoza A, Bermingham E and Dominguez-Dominguez O (2016) Molecular phylogeny and biogeography of the amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). *PLoS ONE* **11**, e0153538. doi: 10.1371/journal.pone.0153538
- García-Varela M and Nadler SA (2005) Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **91**, 1401–1409.
- Gouy M, Guindon S and Gascuel O (2010) Seaview version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 221–224.
- Hildebrand J, Adamczyk M, Laskowski Z and Zalesny G (2015) Host-dependent morphology of *Isthmiophora melis* (Schränk, 1788) Luhe, 1909 (Digenea, Echinostomatinae) morphological variation vs molecular stability. *Parasites & Vectors* **8**, 481.
- Ibáñez AL, Chang CW, Hsu CC, Wang CH, Iizuka Y and Tzeng WN (2012) Diversity of migratory environmental history of the mullets *Mugil cephalus* and *M. curema* in Mexican coastal waters as indicated by otolith Sr: Ca ratios. *Ciencias Marinas* **38**, 73–87.
- Kostadinova A, Herniou EA, Barrett J and Littlewood DTJ (2003) Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology* **54**, 159–176.
- Maddison WP and Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.7.5. Available at <http://mesquiteproject.org/>.
- Martorelli SR (1986) Estudios parasitológicos en biotipos lenticos de la República Argentina III. El ciclo biológico de *Saccocoelioides carolae* Lunaschi (Digenea) parásitos de *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842) (Pisces: Cichlidae). *Neotropical* **88**, 125–132.
- Miller RR, Minckley WL and Norris SM (2005) *Freshwater Fishes of Mexico* Chicago. Illinois: The University of Chicago Press.
- Miller AM, Pfeiffer W and Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8. doi: 10.1109/GCE.2010.5676129
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK and Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 685–692.
- Morgan JAT and Blair D (1998) Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify echinostome isolates from Australia and New Zealand. *International Journal for Parasitology* **28**, 493–502.
- Nadler SA, D'Amelio S, Fagerholm HP, Berland B and Paggi L (2000) Phylogenetic relationships among species of *Contraecaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Høst, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology* **121**, 455–463.
- Nirchio M, Oliveira C, Siccha-Ramírez ZR, de Sene VF, Sola L, Milana V and Rossi AR (2017) The *Mugil curema* species complex (Pisces, Mugilidae): a new karyotype for the Pacific white mullet mitochondrial lineage. *Comparative Cytogenetic* **11**, 225–237.
- Pérez-Ponce de León G (1995) Host-induced morphological variability in adult *Posthodiplostomum minimum* (Digenea: Neodiplostomidae). *Journal of Parasitology* **81**, 818–820.
- Pérez-Ponce de León G and Nadler SA (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterization parasites cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* **138**, 1688–1709.
- Pinacho-Pinacho CD, García-Varela M, Hernández-Orts JS, Mendoza-Palmero CA, Sereno-Urbe AL, Martínez-Ramírez E, Andrade-Gómez L, Hernández-Cruz E, López-Jiménez CA and Pérez-Ponce de León G (2015) Checklist of the helminth parasites of genus *Profundulus* Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes: Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America. *Zookeys* **523**, 1–30.
- Posada D (2008) Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253–1256.
- Poulin R (2007) *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2nd Edn. Princeton: Princeton University Press.
- Poulin R (2011) Uneven distribution of cryptic diversity among higher taxa of parasitic worms. *Biology Letters* **7**, 241–244.
- Poulin R and Presswell B (2016) Taxonomic quality of species descriptions varies over time and with the number of authors, but unevenly among parasitic taxa. *Systematic Biology* **65**, 1107–1116.
- Rambaut A (2012) FigTree v1.4.0. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh, UK.
- R Core Team (2016) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Core Team. Available at <https://www.R-project.org/>.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539–542.
- Silvestro D and Michalak I (2011) RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* **12**, 335–337.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Thomson JM (1997) The Mugilidae of the world. *Memoirs of the Queensland Museum* **41**, 457–562.