



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE

FACULTAD DE CIENCIAS

“DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR
DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *APLECTANA*
(Nematoda: Cosmocercidae), PARÁSITAS DE ANFIBIOS
DE MÉXICO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROCIO BAUTISTA GUZMÁN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. VIRGINIA LEÓN RÈGAGNON

2006



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

<p>1. Datos del alumno Bautista Guzmán Rocío 57 49 35 41 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 097430049</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Virginia León Règagnon</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 M. en C. Luís García Prieto</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Rosario Mata López</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. David Osorio Sarabia</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Maria Berenit Mendoza Garfias</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Diferenciación morfològica y molecular de dos especies del gènere <i>Aplectana</i> (Nematoda: Cosmocercidae), parásitas de anfibios de México. 57 p 2006</p>

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tila María Pérez Ortiz directora del instituto de Biología, por permitirme el uso de las instalaciones.

Al Dr. Marcos Rafael Lamothe por permitirme trabajar en el Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología y por todo el tiempo dedicado a la investigación.

A la Dra. Virginia León Régagnon por la dirección y apoyo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por sus comentarios y sugerencias, así como por su amistad. Mil Gracias.

Al M. en C. Luis García Prieto por las correcciones, comentarios y sugerencias sobre la realización de este trabajo y sobre todo por su amistad. Mil Gracias.

A la Dra. Rosario Mata López por todo su apoyo y amistad brindada durante la realización de este trabajo, así como por las correcciones, sugerencias y paciencia pero principalmente por ser parte de este trabajo. Mil Gracias.

A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias por las fotografías tomadas en el Microscopio Electrónico de Barrido, así como por las correcciones, sugerencias e interés en este trabajo. Gracias.

Al M. en C. David Osorio Sarabia por ser parte de mis sinodales y por el apoyo, comentarios y sugerencias sobre este trabajo. Gracias.

A Elizabeth, Alejandro, Arlett, Luz y Rogelio por ayudarme en el trabajo de laboratorio, en la colecta de hospederos y por su ayuda en la revisión de los mismos, así como por su amistad. Gracias

A Rosario, Virginia y Tony por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Elizabeth Martínez y Rogelio Rosas por su apoyo y comentarios tan atinados, así como por toda la ayuda proporcionada en el trabajo de campo. Gracias.

A la M. en C. Lorena Garrido por sus consejos y amistad brindada durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Florencia Bertoni por su ayuda en el trabajo de laboratorio, sugerencias y comentarios.

A los compañeros y amigos del Laboratorio de Helminología: Arlett, Alejandro, Armando, Elizabeth, Florencia, Luz, Lorena, Rosario, Rogelio, Jorge C., Jorge F. y Yolanda por todo su apoyo y por los momentos que compartieron conmigo. Gracias.

A todos mis amigos: Luz, Arlett, Lupe, Julio, Eli, Javier, Carlos, Julio W, Ariadna, Vianca, Margarito, Fabis, Erma, Carolina, Cuca, Drakis, Maniac, Ulises, Pollo, Choco, Edith, Dulce, Lorena, Alberto, Aaxin, Tony, Adriana, Imuris, Cesar y todos los que formaron parte de la Banca de la Liga Extraordinaria por esos momentos tan agradables e inolvidables que hemos vivido.

Al proyecto PAPIIT UNAM IIV-201403 a cargo de la Dra. Virginia León Régagnon por el apoyo económico brindado para la elaboración de esta tesis.

DEDICATORIAS

A la mayor inspiración que puedo tener en la vida Mi Familia.

*A mis padres José Bautista y Alejandra Guzmán por todo su amor,
amistad, alegría, confianza e inspiración Mil Gracias.*

*A ti mamá por ser mi amiga y parte de este sueño, por todos los consejos tan
acertados pero sobre todo por ser tan linda persona, por todo tu amor y alegría
de vivir.*

*A mi mayor inspiración y motivo para continuar, a ti papá por todo tu apoyo y
confianza, por hacer realidad este momento y por ser tan buen padre y amigo.*

A mis hermanos por todo el amor y admiración que les tengo.

*A mi hermana Angélica por todo su apoyo y por su perseverancia que tanto
admiro.*

*A Víctor porque gracias a ti estoy aquí, por todos tus consejos y por tu apoyo
en todo este tiempo.*

A Mari por su alegría y por todo su amor, amistad y apoyo.

*A José por su sabiduría que tanto admiro, por todos sus consejos pero sobre
todo por ser mi mejor amigo.*

A mi sobrino Alan por toda su luz y alegría, gracias por existir.

A Enrique por su amistad, apoyo y por todo su amor durante este tiempo.

Gracias

*A mis inseparables amigas Luz y Arlett por toda su amistad, gracias por ser
parte de este momento, pero sobre todo por ser mis amigas.*

ÍNDICE.	Pag.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades sobre nematodos.....	1
1.2. Taxonomía de nematodos.....	3
2. Género <i>Aplectana</i>.....	6
2.1. Morfología.....	6
2.2. Ciclo biológico.....	7
3. Antecedentes taxonómicos.....	8
4. Objetivos.....	14
4.1. Objetivo general.....	14
4.2. Objetivos particulares.....	14
5. Material y métodos.....	15
5.1. Recolecta de hospederos.....	15
5.2. Examen helmintológico.....	15
5.3. Fijación y conservación.....	15
5.4. Estudio morfométrico.....	16
5.5. Microscopía Electrónica de Barrido.....	16
5.6. Estudio molecular.....	16
5.7. PCR.....	17
5.8. Purificación y secuenciación.....	17
6. Resultados.....	19
6.1. Redesccripción morfológica.....	19
6.2. Estudio molecular.....	42
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	48
9. Bibliografía.....	49
Apéndice.....	52
1.	
2.	

Resumen.

Los nematodos son uno de los grupos más abundantes. En la actualidad se han descrito aproximadamente 15000 especies tanto de ambientes terrestres, marinos y de vida libre, de ahí la gran importancia que tienen tanto a nivel ecológico como evolutivo.

Travassos en 1925, propuso a la subfamilia Cosmocercidae incluyendo en ella al género *Aplectana*. Actualmente este género está representado por 40 especies en todo el mundo, teniendo como hospederos a anfibios principalmente Anuros.

En México se han registrado 6 especies: *Aplectana mexicana*, *A. waltoni*, *A. hamatospicula*, *A. hoffmani*, *A. itzocanensis* y *A. incerta*; estas especies han sido diferenciadas con bases exclusivamente morfológicas, por lo que algunas enfrentan problemas para su determinación, y se ha propuesto la sinonimia de algunas de ellas.

Con el fin de determinar si *A. itzocanensis* y *A. incerta* representan dos especies distintas, se realizó un estudio comparativo con base en caracteres morfológicos y moleculares.

Se utilizó material recolectado en la Carretera San Juan de los Llanos – Ometepec, Guerrero durante el mes de junio de 2002, en donde se recolectaron 20 individuos de *Smilisca baudinii* (Hylidae). Posteriormente, se recolectaron 34 sapos *Bufo marinus* en Paso Canoa, Oaxaca en septiembre de 2003. Con bases morfológicas determinamos que los parásitos de *S. baudinii* pertenecen a la especie *A. incerta* y los de *B. marinus* a *A. itzocanensis*.

Con el fin de corroborar la validez de los caracteres taxonómicos utilizados, se llevó a cabo un análisis molecular comparando las secuencias de nucleótidos del gen mitocondrial COI, obteniendo 353 pb en individuos de ambas especies. En el análisis molecular se encontró que *A. itzocanensis* y *A. incerta* presentan una divergencia con respecto del grupo externo de 17.41% - 21.21%, mientras que la divergencia entre las secuencias de *A. itzocanensis* con respecto a *A. incerta* fue de 11.11% y la mínima 7.34%.

Observamos que a pesar de que los caracteres morfológicos utilizados son pocos, éstos se encuentran claramente establecidos para diferenciar a ambas especies, lo cual está respaldado por las diferencias moleculares encontradas, por lo que consideramos a ambas especies del género *Aplectana* válidas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre nematodos

Los nematodos son uno de los grupos más abundantes de la Tierra, donde ocupan casi todos los hábitats imaginables. En la actualidad se han descrito aproximadamente 15000 especies; generalmente los encontramos como parásitos de vertebrados y plantas, aunque también se incluyen numerosas especies de vida libre, tanto terrestres como de agua dulce y marinas. Por ello son uno de los grupos con mayor importancia tanto a nivel ecológico como evolutivo (Cheng, 1978).

Dentro del hospedero, los nematodos pueden localizarse en los ojos, boca, lengua, estómago, tubo digestivo, pulmones, hígado, etc. La mayoría son de tamaño pequeño e incoloros, excepto por aquellas especies que se encuentran en el tubo digestivo, los cuales presentan coloraciones un tanto amarillentas o rojizas (Cheng, 1978).

Morfológicamente, el cuerpo de los nematodos es generalmente alargado, cilíndrico y adelgazado en sus extremos, aún cuando encontramos nemátodos fusiformes, filiformes y piriformes. El cuerpo está dividido en dos regiones que son la cefálica y la caudal. La región cefálica se sitúa en la parte anterior del cuerpo, mientras que el extremo caudal se localiza en la región posterior, después del ano en las hembras o de la cloaca en los machos (Lamothe y García, 1988).

Al hablar de los nemátodos, así como de otros parásitos, no podemos dejar de mencionar su morfología interna, ya que en ella se basan gran parte de los caracteres de importancia taxonómica. Los nemátodos son organismos pseudocelomados, bilateralmente simétricos, el sistema digestivo es completo y está constituido por la boca, la faringe, el intestino y el ano cerca del extremo posterior. El cuerpo se encuentra cubierto por una cutícula no celular que es secretada por una capa interna (hipodermis); los músculos de la pared corporal forman una capa gruesa. El sistema excretor consiste de canales laterales o glándulas ventrales que se abren cerca de la terminación anterior, a través de un poro excretor ventral.

La mayoría de los nematodos son dióicos, aunque se conocen algunas especies hermafroditas y en ciertos grupos existen hembras partenogenéticas. El aparato reproductor masculino está compuesto por uno o dos testículos, generalmente cortos; de ellos sale un conducto eferente que se une formando uno deferente, el cual se encuentra ensanchado para constituir la vesícula seminal, la cual se continúa con el conducto eyaculador, hasta unirse con el recto para formar la cloaca; ésta se abre en el poro cloacal, situado en el extremo posterior del cuerpo. Las hembras presentan un número variable de ovarios, por lo cual se les divide en monodelfas (aquellas que presentan un sólo ovario), didelfas (dos ovarios) y polidelfas (más de dos ovarios). Los ovarios se continúan con los oviductos que desembocan en el receptáculo seminal, donde ocurre la fecundación; posteriormente se encuentran los úteros, la vagina y el poro genital femenino o vulva que se ubica en la línea media ventral del cuerpo (Lamothe y García, 1988).

En este grupo existe un cierto grado de dimorfismo sexual, representado principalmente porque las hembras son de mayor tamaño que los machos y el extremo posterior de éstos está curvado ventralmente y provisto de estructuras como espículas, alas y papilas (Cheng, 1978).

El ciclo biológico de los nematodos presenta varios estadios larvales, alcanzando la madurez sexual generalmente después de la cuarta muda (Anderson, 1992).

1.2. Taxonomía de nematodos

La taxonomía es una ciencia integrativa que se encarga de clasificar a cada especie, que dentro del contexto de la sistemática, trata de formular un sistema de clasificación, generalmente basado en los caracteres morfológicos de las especies. Este sistema debe por tanto expresar el camino evolutivo y las relaciones filogenéticas de los organismos vivos y de los fósiles (MacManus y Bowles, 1996).

En este grupo, como en muchos otros, los organismos presentan problemas para ser identificados correctamente con base en su morfología, lo que ha llevado a muchos investigadores a buscar métodos más eficaces. En el caso de los nematodos, se han aplicado técnicas de análisis estadísticos sobre datos morfométricos que son una fuente muy importante de información en la búsqueda de resolver problemas taxonómicos. Sin embargo, las controversias taxonómicas son numerosas y muchas de ellas están lejos de ser solucionadas. Esto se debe a que en muchos casos las especies no han sido descritas con suficiente detalle, o han sido descritas con base en muy pocos ejemplares, sin tomar en consideración los estados de desarrollo o el dimorfismo sexual o la variabilidad dentro de la especie.

Debido a que en muchas ocasiones la morfología no ha sido suficiente para diferenciar a una especie, con frecuencia se ha recurrido a otras fuentes de caracteres relacionados con su fisiología, o al estudio de sus formas de desarrollo y la relación con sus huéspedes (Lamothe, 1987).

Este conjunto de caracteres nos proporciona una gran ayuda para realizar identificaciones con base en los rasgos diagnósticos de una especie determinada; sin embargo, muchas veces no son suficientes para diferenciar a un organismo, por lo que hoy en día muchos investigadores recurren a otras fuentes, como los caracteres moleculares que les proporcionan información adicional (MacManus y Bowles, 1996).

En un principio se empezó a utilizar información derivada del análisis cromosómico (citogenética), ensayos inmunológicos, electroforesis de proteínas y posteriormente el ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico)

para resolver problemas taxonómicos, evolutivos y biogeográficos, entre otros (Carranza, 2004).

En los últimos años se ha visto que los diferentes genes mitocondriales y nucleares, codificantes y no codificantes presentan tasas y patrones evolutivos muy diferentes que son de gran utilidad para resolver problemas en sistemática, biogeografía, ecología, etc. Por lo que recientemente el uso de las herramientas moleculares en la taxonomía han contribuido a esclarecer problemas morfológicos (Martínez, 2001).

Una de las principales características de los marcadores moleculares es su grado de utilidad para inferir relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos, proporcionándonos una aproximación más directa (Carranza, 2004). Tal es el caso de estudios filogenéticos basados en el gen 18S (rARN), que en su mayoría han resultado congruentes con los datos morfológicos, ciclos de vida y biogeográficos, además de ser uno de los marcadores más utilizados ya que son moléculas altamente conservadas en todos los organismos (Liu et al., 1997).

Dentro de las regiones no codificantes, se han utilizado las regiones ITS-1 e ITS-2; Almeyda–Artigas et al. (2000) han utilizado la región ITS-2 como un marcador molecular eficaz para distinguir nematodos congénicos y a menudo indistinguibles morfológicamente, así como también se ha utilizado exitosamente en varios grupos de digéneos de divergencia reciente (Anderson y Barker, 1998).

El 28S es otro gen que ha comenzado a utilizarse para la delimitación de especies en helmintos (León-Règagnon et al., 1999, 2005).

Los genes mitocondriales han aportado una valiosa información, tal es el caso del gen citocromo oxidasa I (COI), debido a su nivel de variación alto nos puede ayudar a diferenciar entre especies de un mismo género. Algunas de las principales ventajas de utilizar el gen mitocondrial COI, es el hecho de contar con primers universales, además de poseer un mayor rango a nivel filogenético que otros genes mitocondriales, presenta además un patrón hereditario estrictamente materno, y se caracteriza por ser un fragmento corto (Hebert et al., 2003a). En los últimos años, el ADN mitocondrial se ha utilizado ampliamente en estudios filigenéticos de animales, debido a que su tasa de cambio es (evolutiva) mucho más rápida que la del ADN nuclear (Hebert et al., 2004).

Hebert et al. (2003a) observaron que la divergencia entre las especies de taxa congénicos es de un 6.8% en algunos grupos. Aún cuando en este estudio el COI sirvió para identificar a especies muy cercanas, este valor no es igual en todos los grupos de organismos. Se ha observado que el gen mitocondrial COI, ha sido de gran utilidad para diferenciar especies muy cercanas de pájaros de Norte América, encontrando hasta un 2% de divergencia genética entre especies hermanas. Se ha visto que el promedio mostrado en cuanto a la divergencia genética en las especies congénicas es del 6.5% en este gen (Hebert et al., 2004).

En resumen, el gen COI ha permitido construir filogenias a niveles intraespecíficos y es una importante herramienta para solucionar problemas taxonómicos (Hebert et al., 2003b).

2. Género *Aplectana*

Clasificación.

Phylum Nematoda (Rudolphi, 1808)

Clase Secernentea (Von Linstown, 1905)

Orden Ascaridida (Skrjabin y Schulz, 1940)

Familia Cosmocercidae (Railliet, 1916)

Subfamilia Cosmocercinae (Railliet, 1916)

Genero *Aplectana* Railliet y Henry, 1916

2.1. Morfología

Los nematodos de este género son pequeños, presentan el cuerpo largo y delgado, con los extremos atenuados, principalmente el posterior, el cual se adelgaza hasta terminar en una punta fina; poseen una cutícula estriada transversalmente.

Este género se caracteriza por presentar tres labios; la cavidad bucal es pequeña y no está armada, el poro excretor es anterior y presentan un bulbo esofágico. La faringe es corta, el esófago es largo, terminando en el bulbo. El anillo nervioso está situado en la mitad del esófago. La vulva se encuentra cerca de la parte media del cuerpo.

Los machos presentan la extremidad posterior curvada. Exhiben, en la parte posterior del cuerpo, las espículas, que usualmente son iguales. El aparato genital de las hembras en la mayoría de las especies es anfidelfo (el útero es opuesto), mientras que en otros es prodelfo, la vulva se encuentra cerca de la parte media del cuerpo, el extremo posterior de las hembras es cónico y puntiagudo.

Son principalmente parásitos de anfibios y reptiles; se encuentran parasitando el tubo digestivo de sus hospederos (Yamaguti, 1961; Cheng, 1978).

2.2. Ciclo biológico

Aplectana presenta un ciclo de vida directo, la infección puede darse por penetración vía cutánea en ranas adultas y/o por ingestión de renacuajos infectados.

En el intestino del hospedero, las hembras producen huevos grandes que larvan en el útero. Los huevos salen con las heces y son depositados en el agua, en donde se desarrollan las larvas del primer, segundo y tercer estadio. Esta última es la que penetra la piel de las ranas iniciando una migración hacia el recto.

La larva que se encuentra en el agua también puede ser ingerida por los renacuajos en los que se van a desarrollar los adultos, el parásito puede ser retenido a través de la metamorfosis o una rana puede adquirir el parásito cuando ingiere un renacuajo infectado (Anderson, 1992).

3. Antecedentes taxonómicos

El género *Aplectana* Railliet y Henry, 1916, fue erigido para contener a *Ascaris acuminata* Schrank, 1788. Travassos en 1925, propuso a la subfamilia Cosmocercidae incluyendo en ella a los géneros *Cosmocerca*, *Aplectana* y *Schrankia* (Travassos, 1931).

Bravo-Hollis (1943), al realizar observaciones del material depositado en la Colección Nacional de Helminthos (CNHE) del Instituto de Biología de la UNAM, mencionó que *Aplectana* y *Oxysomatium* son dos géneros que se han prestado a confusión debido a que ambos tienen muchas características en común, lo cual ha provocado que los investigadores caigan en el error de considerar a especies de un género como miembros del otro. Esta autora propuso entonces que las especies que presentan un gubernaculum son las pertenecientes al género *Aplectana* y las demás las incluyó en *Oxysomatium*. Adicionalmente, Bravo-Hollis (1943) señaló varios caracteres más que son de utilidad para diferenciar a cada uno de los géneros. *Aplectana* presenta flancos laterales, labios con 2 papilas, aparato genital anfidelfo y ocasionalmente prodelfo, machos con numerosas papilas y espículas no muy largas y a veces con vaina. Por su parte, *Oxysomatium* carece de flancos laterales, los labios presentan 2 a 10 papilas, aparato genital anfidelfo, machos con papilas no muy numerosas, espículas largas y algunas veces puede estar presente un gubernaculum corto.

Actualmente el género *Aplectana* está representado por 40 especies en todo el mundo, teniendo como hospederos principales a anfibios, entre ellos sapos y ranas (Baker, 1987) (Tabla 1).

En México se han registrado seis especies: *Aplectana mexicana* Caballero, 1933, *A. waltoni* (Walton, 1940), *A. hamatospicula* Walton, 1940, *A. hoffmani* (Bravo-Hollis, 1943), *A. itzacanensis* (Bravo-Hollis, 1943) y *A. incerta* (Caballero, 1949) (Tabla 2). Estas especies han sido diferenciadas con bases exclusivamente morfológicas, que en la mayor parte de ellas se encuentran claramente establecidas. En la Tabla 3 se muestran las características diferenciales de estas especies. Sin embargo, Baker (1985) señala que algunas especies enfrentan problemas para su diferenciación.

Tal es el caso de *Aplectana itzocanensis*, quien exhibe semejanzas con *A. hoffmani*, particularmente en el aspecto de la boca, bulbo esofágico, ovopositor, útero, gubernaculum, en la longitud de la faringe, número y disposición de las papilas postanales, en la presencia de papilas en el labio superior de la cloaca y en las papilas de la región vulvar de la hembra, por lo cual resulta difícil diferenciarlas. Para ello, Bravo-Hollis (1943) utilizó caracteres como la longitud del esófago y de los huevos, que son mayores en *A. itzocanensis*, además de tener una longitud del cuerpo menor que *A. hoffmani*. El macho de *A. hoffmani* tiene 9 pares de papilas preanales ventrales y de 9 a 12 laterales y las espículas son iguales; *A. itzocanensis* sólo presenta 5 pares de papilas preanales ventrales y espículas subiguales. Baker (1985) retoma la descripción que realizó Bravo-Hollis (1943), en la cual menciona que *A. itzocanensis* y *A. hoffmani* son coparásitos de *Scaphiopus multiplicatus* de Puebla; este autor considera que los caracteres que se utilizaron para distinguir a estas especies, como la longitud de los machos (2.7 – 3.8 mm en *A. hoffmani* y 2.2 – 2.8 mm en *A. itzocanensis*) son poco robustos y que las diferencias observadas pueden ser el resultado de la variación intraespecífica. Por lo anterior, sugiere que *A. hoffmani* sea considerado como sinónimo de *A. itzocanensis*.

Baker (1985), también realizó una redesccripción de *Aplectana itzocanensis* y *Aplectana incerta*, en donde menciona que *A. itzocanensis* se distingue de *A. incerta* por la longitud de las espículas, (0.172 – 0.203 contra 0.135 - 0.143mm, respectivamente). Otra diferencia que señala es que el tamaño de los huevos es menor en *A. itzocanensis* (0.070 – 0.082mm por 0.042 – 0.051mm) que en *A. incerta* (0.092 – 0.123mm por 0.054 – 0.062mm). A pesar de que estas diferencias son escasas, son constantes, por lo tanto este autor consideró que ambas especies continúan siendo válidas.

Con base en lo anterior, en este trabajo planteamos la realización de un estudio comparativo, para corroborar si realmente *A. itzocanensis* y *A. incerta* representen dos especies distintas. Debido a que solo algunos datos morfológicos pueden ayudarnos a diferenciarlas, recurriremos a la utilización de caracteres moleculares, los cuales nos permitirán obtener mayor información de estos organismos, ayudando a definir la relación de estas especies con precisión.

Debido a que no hay antecedentes con respecto a la utilización de análisis moleculares para este género, proponemos el uso de genes mitocondriales como es el caso del marcador molecular COI (citocromo oxidasa subunidad I), el cual se ha empleado con éxito para diferenciar entre especies de un mismo género (Carranza, 2004; Hebert et al., 2003b).

Tabla 1. Composición del género *Aplectana* de acuerdo con Baker (1987). En negritas se resaltan las especies registradas para México.

Especie	Hospedero	Distribución	Sinonimia
1.- <i>A. acuminata</i> Scharane, 1788	<i>Bufo bombinator</i> <i>Salamandra</i>	Europa	<i>A. multipapillosa</i> <i>A. caucasica</i>
2.- <i>A. akhrami</i> Islam y Khanum, 1979	<i>Bufo stomaticus</i>	Pakistan	<i>Neosomatiana, Akhrami</i>
3.- <i>A. brumpti</i> Travassos, 1931	<i>Bufo viridis</i> <i>Rana temporaria</i>	Europa	<i>A. miranda,</i> <i>A. corti A. ivaniteky</i>
4.- <i>A. brygooi</i> Baker, 1980	<i>Bufo</i> sp.	Madagascar	
5.- <i>A. capensis</i> Baker, 1981	<i>Breviceps rosei</i>	África	
6.- <i>A. chamacleonis</i> Baylis, 1929	<i>Rana angolensis</i>	África	
7.- <i>A. chilensis</i> Lent y Freitas, 1948	<i>Rhinoderma darwini</i>	Chile	
8.- <i>A. courdurieri</i> Chabaud y Brygoo, 1958	<i>Ptychodena mascareniensis</i>	Madagascar	
9.- <i>A. crossodactyli</i> Baker, 1980	<i>Crossodactylus gaudichaudii</i>	Brasil	<i>Neyraplectana travassosi</i>
10.- <i>A. cricifer</i> Travassos, 1925	<i>Bufo cricifer</i>	Brasil	
11.- <i>A. degraaffi</i> Baker, 1981	<i>Breviceps sylvestris</i>	África	
12.- <i>A. delirae</i> Fabio, 1971	<i>Bufo cricifer</i>	Brasil	
13.- <i>A. elenae</i> Baker y Vaucher, 1986	<i>Leptodactylus elenae</i>	Paraguay	
14.- <i>A. hamatospicula</i> Walton, 1940	<i>Bufo taladei</i> <i>Hyla eximia</i>	Cuba, México Florida	
15.- <i>A. hoffmani</i> Bravo-Hollis, 1943	<i>Scaphiopus multiplicatus</i> <i>Bufo marinus</i>	México	
16.- <i>A. hylae</i> Wang, 1980	<i>Hyla chinensis</i>	China	
17.- <i>A. hylambatis</i> Baylis, 1927	<i>Leptocelis aubryi, Bufo</i> sp.	Paraguay	<i>Oxysomatium banariensis,</i> <i>A. pudenda</i>
18.- <i>A. incerta</i> Caballero, 1949	<i>Bufo marinus</i>	México	
19.- <i>A. itzocanensis</i> Bravo-Hollis, 1943	<i>Bufo marinus</i>	México	
20.- <i>A. leesi</i> Hristouki y Riggio, 1975	<i>Discoglossus pictus</i>	Europa	
21.- <i>A. linstowi</i> Yorke y Naplestone, 1926	<i>Bufo viridis</i>	Europa	<i>Nematoxys unguiculatus</i> <i>A. kutassi, A. brumpti</i>
22.- <i>A. lopesi</i> Silva, 1955	<i>Ololygon fuscavara</i> <i>Physalaemus signifer</i>	Brasil	
23.- <i>A. maantoshii</i> Stewart, 1914	<i>Bufo stomaticus</i> <i>Rana tigerina</i>	Europa	<i>A. agubernaculum</i> <i>A. asiatica</i> <i>Oxysomatium stomatici</i>
24.- <i>A. membranosa</i> Schneider, 1866	<i>Rana</i> sp., <i>Bufo ictericus</i>	Brasil	
25.- <i>A. meridionales</i> Lent y Freitas, 1948	<i>Pleurodema borellii</i>	Argentina	
26.- <i>A. mexicana</i> Caballero, 1933	<i>Dermophis mexicanus</i>	México	
27.- <i>A. micropenis</i> Travassos, 1925	<i>Hylodes nasus</i>	Brasil	
28.- <i>A. papillifera</i> Araujo, 1977	<i>Dromicus typhlus</i>	Brasil	
29.- <i>A. paraelenae</i> Baker y Vaucher, 1986	<i>Leptodactylus elenae</i>	Paraguay	
30.- <i>A. paucipapillosa</i> Wang, 1980	<i>Rana spinosa</i>	China	
31.- <i>A. praeputialis</i> Skrjabin, 1916	<i>Bufo</i> sp.	África	
32.- <i>A. pusilla</i> Miranda, 1924	<i>Amphisbaena</i> sp.	Brasil	
33.- <i>A. raillieti</i> Travassos, 1925	<i>Amphisbaena alba</i>	Brasil	
34.- <i>A. ranae</i> Walton, 1931	<i>Rana magna</i>	Filipinas	
35.- <i>A. rysauyi</i> Barus y Cocotero, 1969	<i>Cadea blanoides</i>	Cuba	
36.- <i>A. vellardi</i> Travassos, 1926	<i>Bufo marinus</i>	Brasil	
37.- <i>A. travassosi</i> Gomes y Matta, 1967	<i>Thoropa miliaris</i>	Brasil	
38.- <i>A. vercammeni</i> Le-Van-Hoa, 1962	<i>Bufo</i> sp.	Europa	
39.- <i>A. waltoni</i> Walton, 1940	<i>Bufo simus</i>	México	
40.- <i>A. zwifeli</i> Moravec, 1986	<i>Phrynomantis humicola</i>	Nueva Guinea	

Tabla 2. Registro del género *Aplectana* en México.

Especie	Autor	Hospedero	Hábitat	Distribución
<i>A. mexicana</i>	Caballero (1933)	<i>Dermophis mexicanus</i>	Cloaca	Chiapas
<i>A. waltoni</i>	Walton (1940)	<i>Bufo simus</i>	Intestino	Coyoacán, D.F.
<i>A. hamatospicula</i>	Walton (1940)	<i>Hyla eximia</i>	Intestino	Coyoacán, D.F.
<i>A. itzocanensis</i>	(Bravo-Hollis, 1943)	♣ <i>Spea multiplicata</i>	Intestino grueso	Izúcar de Matamoros, Puebla
	Galicia (1998)	<i>Bufo marinus</i> <i>Bufo valliceps</i>	Intestino	Neblinas, Queretaro
	Goldberg y Bursey (2002)	<i>Bufo kelloggi</i> <i>Bufo mazatlanensis</i> <i>Leptodactylus melanonotus</i> <i>Pachymedusa dacnicolor</i> <i>Rana magnaocularis</i> <i>Smilisca baudinii</i>	Intestino	Sonora
	Espinoza (2006)	<i>Bufo marinus</i>	Intestino	Cerro de Oro y Temascal, Oaxaca
<i>A. hoffmani</i>	Bravo-Hollis, (1943)	♣ <i>Spea multiplicata</i> <i>Bufo marinus</i>	Intestino grueso	Izúcar de Matamoros, Puebla
<i>A. incerta</i>	Caballero (1949)	<i>Bufo marinus</i>	Intestino grueso	Río Huixtla Huixtla, Chiapas
	Guillén (1992)	<i>Bufo marinus</i> <i>Rana berlandieri</i> <i>Rana vaillanti</i>	Intestino	Los Tuxtlas, Veracruz
	Galicia (1998)	<i>Bufo marinus</i>	Intestino	Los Tuxtlas, Veracruz
	Paredes (2000)	<i>Rana vaillanti</i>	Cloaca	Laguna Escondida Los Tuxtlas, Veracruz
	Galicia et al. (2000)	<i>Bufo marmoreus</i>	Intestino	Jalisco
	Báez (2001)	<i>Eleuterodactylus rhodopsis</i>	Intestino	Los Tuxtlas, Veracruz
	Cabrera (2002)	<i>Rana forreri</i>	Intestino	Laguna Tres Palos, Guerrero
Goldberg y Bursey (2002)	<i>Smilisca baudinii</i>	Intestino	Sonora	

♣ Registrado originalmente como *Scaphiopus multiplicatus*

Tabla 3.
Características diagnósticas de las especies del género *Aplectana* registradas en México. Medidas expresadas en mm.

Estructura	♣ <i>A. incerta</i>		♣ <i>A. itzacanensis</i>		<i>A. hoffmani</i>		<i>A. hamatospicula</i>		<i>A. waltoni</i>	<i>A. mexicana</i>	
Sexo	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Macho
Tamaño del cuerpo	L= 2.68 - 3.88 A= ♦	2.34 - 2.53 ♦	3.50-6.92 ♦	2.55-3.70 ♦	4.75-5.67 0.324-0.378	2.754-3.834 0.270-0.280	3.41-4.2	2.09-3.095 0.109-0.122	3.811-4.446 0.181-0.183	2.75-3.0	2.5 0.166
Faringe	L=0.044 - 0.047	0.039 - 0.042	0.051-0.063	0.045-0.049	0.042	0.045	0.050-0.052	0.045-0.050	0.044-0.054	0.024	♦
Esófago	L=0.520- 0.523 A= ♦	0.461-0.518 ♦	0.641-0.694 ♦	0.514-0.578 ♦	0.680-0.700 0.049-0.050	0.540-0.600 0.037-0.043	0.472-0.525 ♦	0.435-0.480 ♦	0.363-0.413 ♦	0.500 ♦	♦ ♦
Bulbo esofágico	L=0.091-0.092 A= ♦	0.076-0.082 ♦	0.113-0.134 ♦	0.083-0.102 ♦	0.125 0.125-0.133	0.114-0.119 0.094-0.098	0.044-0.050 0.09-0.1	0.044-0.050 0.08-0.09	0.036-0.054 0.072-0.09	0.083 ♦	♦ ♦
Distancia del poro excretor al ext anterior	L=0.410-0.448	0.363-0.406	0.417-0.536	0.359-0.438	0.450-0.566	0.400-0.480	0.480-0.508	0.461-0.470	0.410-0.435	0.540	0.436
Ancho del anillo nervioso	0.230-0.235	0.234-0.236	0.279-0.284	0.208-0.226	0.258-0.283	0.233-0.258	0.254-0.280	0.127-0.145	♦	♦	♦
Distancia del ano al extremo posterior	L=0.188-0.250	0.154-0.188	0.254-0.359	0.193-0.262	0.280-0.340	0.184-0.200	0.162-0.220	0.236-0.245	0.163-0.181	♦	♦
Tamaño de los huevos	L=0.099-0.123 A=0.054-0.062		0.070-0.082 0.042-0.051		0.100-0.124 0.062-0.075		0.085-0.109 0.055-0.065			0.083 0.041	
Tamaño de las espículas		1=0.135-0.143 2= ♦		0.172-0.203 ♦		0.200 0.209		0.236 0.245	0.190 0.218		0.200 0.200
Tamaño de gubernáculum		L=0.052-0.063		0.067-0.080		0.067		♦	♦		0.056
Arreglo papilar	5 pares preanales, 2 postanales y 7 papilas adanales.		5 pares preanales, 6 postanales y 7 papilas adanales.		9 pares preanales, 6 pares de papilas postanales y 7 papilas adanales.		Papila caudal sésil, con 4 pares preanales y 7 postanales		6 pares de papilas preanales y 7 pares postanales		3 pares preanales, 5 pares postanales

♦ No se presenta esta medida en la descripción original ; en el caso de *A. incerta* y *A. itzacanensis*; dicha información tampoco fue proporcionada en su redescrípción.

L=longitud y A=ancho

1 y 2=primera y segunda espícula

♣ Redescrípciones realizadas por Baker (1985).

4. Objetivos

4.1. Objetivo General:

- ❖ Analizar la validez taxonómica de *Aplectana itzocanensis* y *Aplectana incerta* mediante el uso de caracteres morfológicos y moleculares.

4.2. Objetivos Particulares:

- ❖ Realizar una comparación morfológica entre las especies en estudio.
- ❖ Obtener secuencias de ADN del gen COI (citocromo c oxidasa subunidad I) de cada especie y realizar un estudio comparativo.
- ❖ Evaluar la validez de los caracteres taxonómicos tradicionalmente utilizados para diferenciar a las especies, a la luz de la evidencia molecular.

5. Material y Métodos

5.1. Recolecta de hospederos

Se recolectaron 20 individuos de *Smilisca baudinii* durante el mes de junio de 2002, en la Carretera San Juan de los Llanos – Ometepec, Guerrero (16° 39' 29" N, 98° 28' 09" W). En septiembre de 2003 se recolectaron 34 *Bufo marinus* en Paso Canoa, Oaxaca, en el municipio de San Lucas Ojitlán, exdistrito de Tuxtepec, (18° 0' N, 96° 16' W).

Los anfibios se capturaron manualmente o con la ayuda de redes, depositándolos en sacos de lona para su posterior transporte al Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología de la UNAM.

Se sacrificó a los hospederos por descerebración.

5.2. Examen helmintológico

Posteriormente se realizó un examen helmintológico general que consistió en la revisión externa e interna de cada uno de los ejemplares; el examen externo consistió en revisar la piel y la cavidad bucal de los anfibios, para después examinarlos internamente, lo cual consistió en revisar la cavidad corporal, corazón, estómago, vejiga, hígado, intestino y músculo. Cada órgano se colocó en cajas Petri con solución salina al 0.65%, donde fueron desgarrados con la ayuda de agujas de disección y revisados bajo el microscopio estereoscópico.

5.3. Fijación y conservación

Los nematodos encontrados fueron fijados con alcohol al 70% para el estudio morfológico y al 100% para el análisis molecular.

5.4. Estudio morfométrico

Para su estudio morfológico y determinación taxonómica, los ejemplares recolectados así como algunos de la serie tipo *Aplectana incerta*, *A. itzocanensis* y *A. hoffmani* (No. de catálogo, 2158, 2121, 2123 respectivamente) depositados en la Colección Nacional de Helminfos (CNHE), del Instituto de Biología de la UNAM, se montaron en preparaciones temporales. Los nemátodos fueron aclarados con lactofenol de Hamann para realizar las observaciones correspondientes bajo el microscopio óptico. Para la descripción de cada taxón se midieron las estructuras de los parásitos con un ocular calibrado colocado en un microscopio óptico; las medidas están dadas en milímetros. Los organismos medidos se esquematizaron con ayuda de una cámara clara adaptada a un microscopio óptico, enfatizando las estructuras diagnósticas de cada especie.

5.5. Microscopía Electrónica de Barrido

Algunos ejemplares de ambas fuentes se procesaron para su estudio en Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), estos fueron lavados en alcohol al 70% haciendo dos cambios de 24hr. cada uno, para posteriormente deshidratarlos en alcoholes graduales 80%, 90% y alcohol absoluto. Estos se llevaron a punto crítico con CO₂, se montaron en porta objetos de aluminio, se cubrieron con oro y se observaron con ayuda de un Microscopio de Barrido marca Hitachi modelo 5-2460N, a un voltaje de 15Kv. Se tomaron fotografías de la región anterior, posterior y espículas para comparar las diferencias entre los ejemplares tipo y los ejemplares recolectados en el presente estudio.

5.6. Estudio molecular

Con la finalidad de comparar molecularmente a las dos especies del género *Aplectana*, se extrajo ADN mitocondrial de ejemplares adultos previamente identificados, utilizando el DNeasy Tissue Kit Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.7. PCR

La amplificación del ADN mitocondrial se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la finalidad de amplificar los genes mitocondriales (COI) de las dos especies del género *Aplectana*. Cada una de las mezclas de reacción se preparó con un volumen final de 25µl con las siguientes proporciones: 2.5µl de Buffer, 2.5µl de dNTPs, 1.25µl de MgCl₂, 2.5µl de cada oligonucleótido (10pmol/µl), 3µl de ADN, 0.6µl de Taq ADN polimerasa y 10.15µl de agua destilada.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes mitocondriales fueron los siguientes:

COIF

3' - TTT TTT GGG GAT CCT GAG GTT TAT – 5'

COIR

3' - TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG – 5'

Para las especies *Aplectana itzocanensis* y *Cosmocerca* sp. (elegido como grupo externo). Se utilizó una desnaturalización inicial de 95°C por 5min. y 35 ciclos de 95°C por 30seg, con una temperatura de alineamiento de 45°C por 45seg. y por último 10min. a 72°C.

Para *A. incerta* se realizó una desnaturalización de 95°C por 5min. 95°C por 30seg. con una temperatura de alineamiento de 47°C por 45seg. con dos repeticiones de 40 ciclos y un ciclo de 10min. a 72°C, las amplificaciones se mantuvieron a 4°C. Se utilizó un control negativo en todas los amplificados para detectar posibles contaminaciones.

5.8. Purificación y Secuenciación

Los productos amplificados fueron purificados directamente de la PCR utilizando el Kit Q1 AQuia (PCR purification kit), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente el producto purificado se utilizó para la reacción de secuencia, basada en el método de Sanger et al. (1977), la cual contenía lo siguiente: 2µl de BigDye, 2µl de buffer 2.5, 1µl de oligonucleótido (a la mismas concentración utilizada

para la PCR), 1.5µl del producto purificado y 3.5µl de agua destilada, para un volumen final de 10µl para cada reacción.

El programa utilizado consistió de una desnaturalización inicial a 96°C por 5min. seguida por 25 ciclos de 1min. a 96°C para una temperatura de alineamiento a 47°C por 5seg. y 4min. a 60°C para la extensión de los productos.

Las secuencias obtenidas del gen mitocondrial COI (subunidad uno del Citocromo c oxidasa) de las dos especies en estudio pertenecientes al género *Aplectana*, *A. itzocanensis* y *A. incerta*, y *Cosmocerca* sp. fueron alineadas y editadas mediante el programa BioEdit (Hall, 1999), obteniendo del producto amplificado del gen mitocondrial 353 pb (Apéndice 1).

Los árboles filogenéticos fueron generados bajo el principio de Máxima Parsimonia, empleando el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002). Las topologías se obtuvieron a partir de una búsqueda heurística con 100 replicas (al azar), la cual arrojó 4 árboles igualmente parsimoniosos (Apéndice 2). De ellas se obtuvo un árbol de consenso estricto (Fig. 15). Adicionalmente, se calculó el índice Bootstrap con 1000 pseudoréplicas y el índice de Bremer para el soporte de ramas.

6. Resultados

6.1. Redescripción

Familia Cosmocercidae Railliet, 1916
Subfamilia Cosmocercinae Railliet, 1916
Genero *Aplectana* Railliet y Henry, 1916
Especie *Aplectana incerta* Bravo, 1943
Figuras 1-5

La presente redescripción está basada en 19 adultos, de los cuales 10 son hembras y 9 machos, extraídos del intestino posterior de *Smilisca baudinii*, recolectadas en la carretera San Juan de los Llanos, Ometepec, Guerrero.

Son nematodos muy pequeños, con una cutícula blanca; la boca está rodeada por tres labios presentando una pieza quitinosa en forma de gancho en cada uno de los bordes (Fig. 4 D).

Hembras

Más grandes que los machos; miden 1.8 - 3.2 (2.81 ± 0.18 , n=10) de largo, por 0.11 - 0.21 (0.020 ± 0.032 , n=10) de ancho. Faringe casi cilíndrica, con una longitud de 0.038 - 0.040 (0.03 ± 0.0023 , n=6) por 0.028 - 0.030 (0.027 ± 0.0020 , n=6) de ancho. Esófago ligeramente estriado; mide 0.362 - 0.411 (0.406 ± 0.023 , n=10) de largo y 0.041 - 0.047 (0.047 ± 0.008 , n=10) de ancho a nivel de la porción más amplia. Bulbo esofágico casi esférico, estriado; mide 0.099 - 0.109 (0.105 ± 0.009 , n=10) de largo por 0.092 - 0.095 (0.09 ± 0.016 , n=10) de ancho.

Poros excretor en comunicación con una amplia vesícula excretora; distancia de éste al extremo anterior 0.342 - 0.472 (0.383 ± 0.026 , n=8). La distancia del anillo nervioso al extremo anterior; mide 0.044 - 0.054 (0.053 ± 0.007 , n=7) de ancho (Fig.1 A y B). Distancia del ano al extremo posterior 0.151 - 0.183 (0.183 ± 0.026 , n=10). Vulva ubicada en la mitad posterior del cuerpo; úteros con una gran

cantidad de huevos cubiertos por una cáscara lisa y transparente; miden 0.108 - 0.128 (0.112 ± 0.008 , n=15) de largo y 0.068 a 0.081 (0.070 ± 0.012 , n=15) de ancho (Fig.2 A y B).

Machos

Miden de 1.8 - 2.4 (2.11 ± 0.449 , n=9) de largo por 0.043 - 0.068 (0.051 ± 0.009 , n=9) de ancho. Faringe 0.027 - 0.037 (0.03 ± 0.001 , n=7) de largo por 0.020 - 0.025 (0.020 ± 0.002 , n=7) de ancho. Esófago con pequeñas estrías en toda su longitud; 0.342 - 0.437 (0.336 ± 0.015 , n=9) de largo por 0.037 - 0.041 (0.037 ± 0.007 , n=9) de ancho. Bulbo esofágico casi siempre esférico, mide 0.082 - 0.095 (0.086 ± 0.005 , n=9) de largo por 0.083 - 0.089 (0.08 ± 0.002 , n=9) de ancho.

Ancho del anillo nervioso 0.034 - 0.040 (0.038 ± 0.002 , n=6). Distancia del poro excretor al extremo anterior 0.328 - 0.352 (0.33 ± 0.010 , n=8); distancia del ano al extremo posterior 0.164 - 0.210 (0.162 ± 0.012 , n=9).

Gubernaculum 0.057 - 0.080 (0.058 ± 0.005 , n=9) de largo. Espículas casi de igual tamaño; 0.132 - 0.142 (0.142 ± 0.022 , n=9) la derecha, 0.130 - 0.136 (0.135 ± 0.022 , n=7) la izquierda; presentan una capa hialina que las cubre (Fig.3 A y B; Fig.4 B).

Presenta cinco pares de papilas preanales, 7 pares de papilas postanales y 7 papilas en la región adanal (Fig.4).

Hospedero tipo:

♣ *Bufo marinus* (Caballero, 1949)

Localidad tipo:

♣ Rio Huixtla, Huixtla, Chiapas.

Ejemplar tipo:

♣ CNHE 2158

Registros previos de la especie en anfibios de México:

- ♣ *Bufo marinus*, Rio Huixtla, Huixtla, Chiapas (Caballero, 1949)
- ♣ *Rana berlandieri*, Los Tuxtlas, Veracruz (Guillén, 1992)
- ♣ *Rana vaillanti*, Los Tuxtlas, Veracruz (Guillén, 1992)
- ♣ *Bufo marinus*, Los Tuxtlas, Veracruz (Galicía, 1998)
- ♣ *Bufo marmoreus*, Jalisco (Galicía et al., 2000)
- ♣ *Eleutherodactylus rhodopis*, Los Tuxtlas, Veracruz (Báez, 2001)
- ♣ *Rana forreri*, Laguna Tres Palos, Guerrero (Cabrera, 2002)
- ♣ *Bufo mazatlanensis*, Sonora (Goldberg y Bursey, 2002)
- ♣ *Smilisca baudinii*, Sonora (Goldberg y Bursey, 2002)

Comentarios taxonómicos:

El género *Aplectana* fue erigido por Railliet y Henry en 1916 para contener a *Ascaris acuminata*. Este género, junto con *Cosmocerca* y *Schrankia* fue incluido en la familia *Cosmocercidae* por Travassos (1931).

Los nematodos encontrados en el intestino de *Smilisca baudinii*, se asignaron a este género por la disposición y forma del aparato digestivo anterior, por la presencia de la faringe, presencia de papilas en los machos y posición de la vulva en las hembras. De esta forma se distinguen de los géneros *Cosmocercella* y *Raillietnema* ya que el útero de las especies de estos géneros presentan pocos huevos y son mas grandes que los ejemplares del género *Aplectana*. Se diferencian también de *Cosmocerca* y *Cosmocercoides* debido a que los machos de estos géneros presentan plectanes y papilas en roseta, respectivamente, y se separan de los géneros *Neoxysomatium* y *Oxysomatium* por la condición anfidélfica, siendo las hembras del género *Aplectana* prodelfas y por la presencia del gubernaculum en los machos (Yamaguti, 1961).

Nuestros ejemplares se asignaron a la especie *Aplectana incerta* porque coinciden con la descripción de Caballero (1949), y con la redescrición realizada por Baker (1985), en los siguientes caracteres: longitud total en hembras y machos, en el tamaño de las espículas, tamaño de los huevos, en la distribución de las papilas, aún cuando nosotros observamos la presencia de 7 papilas postanales y 7 en la región adanal (ver Tabla 4 y Fig.4 A, B y C), y por las semejanzas que presentan con los ejemplares tipo de la CNHE, con número de catálogo 2158 (Fig.5)

Aplectana incerta se registró por primera vez en México como parásito del intestino de *Bufo marinus*, en río Huixtla, Huixtla, Chiapas (Caballero, 1949). Posteriormente fue redescrita por Baker (1985), en donde la diferencia claramente de *A. itzocanensis* por la longitud corporal, siendo *A. incerta* de menor tamaño, por la longitud de las espículas, que son mas grandes en *A. itzocanensis* y por el tamaño de los huevos, siendo éstos mas grandes en *A. incerta* (ver Tabla 3).

Nosotros corroboramos estas observaciones al evaluar estos caracteres que tradicionalmente son utilizados para estas especies (ver Tabla 4).

Otras especies registradas para México son: *Aplectana mexicana* Caballero, 1933, *A. waltoni* Walton, 1940, *A. hamatospicula* Walton, 1940 y *A. hoffmani*♦ (Bravo-Hollis, 1943) tales especies se diferencian de *A. incerta* principalmente por la longitud de la faringe, bulbo esofágico, tamaño de los huevos, la distancia del ano al extremo posterior, tamaño de las espículas y por el número de papilas caudales en el macho.

♦ Sinónimo de *A. itzocanensis* según Baker (1985).

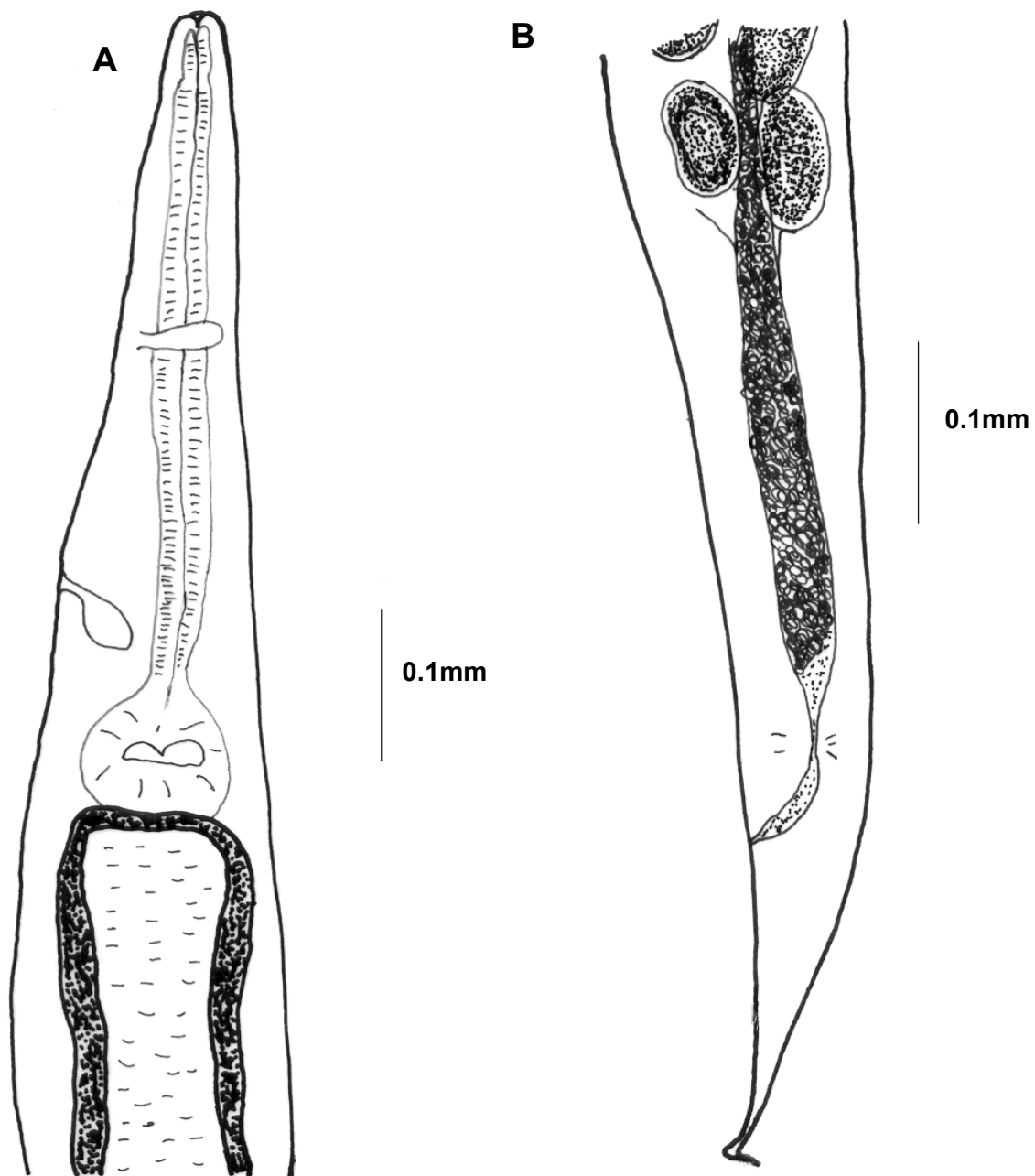


Figura 1. *Aplectana incerta*, hembra. A) Región anterior; B) región posterior.

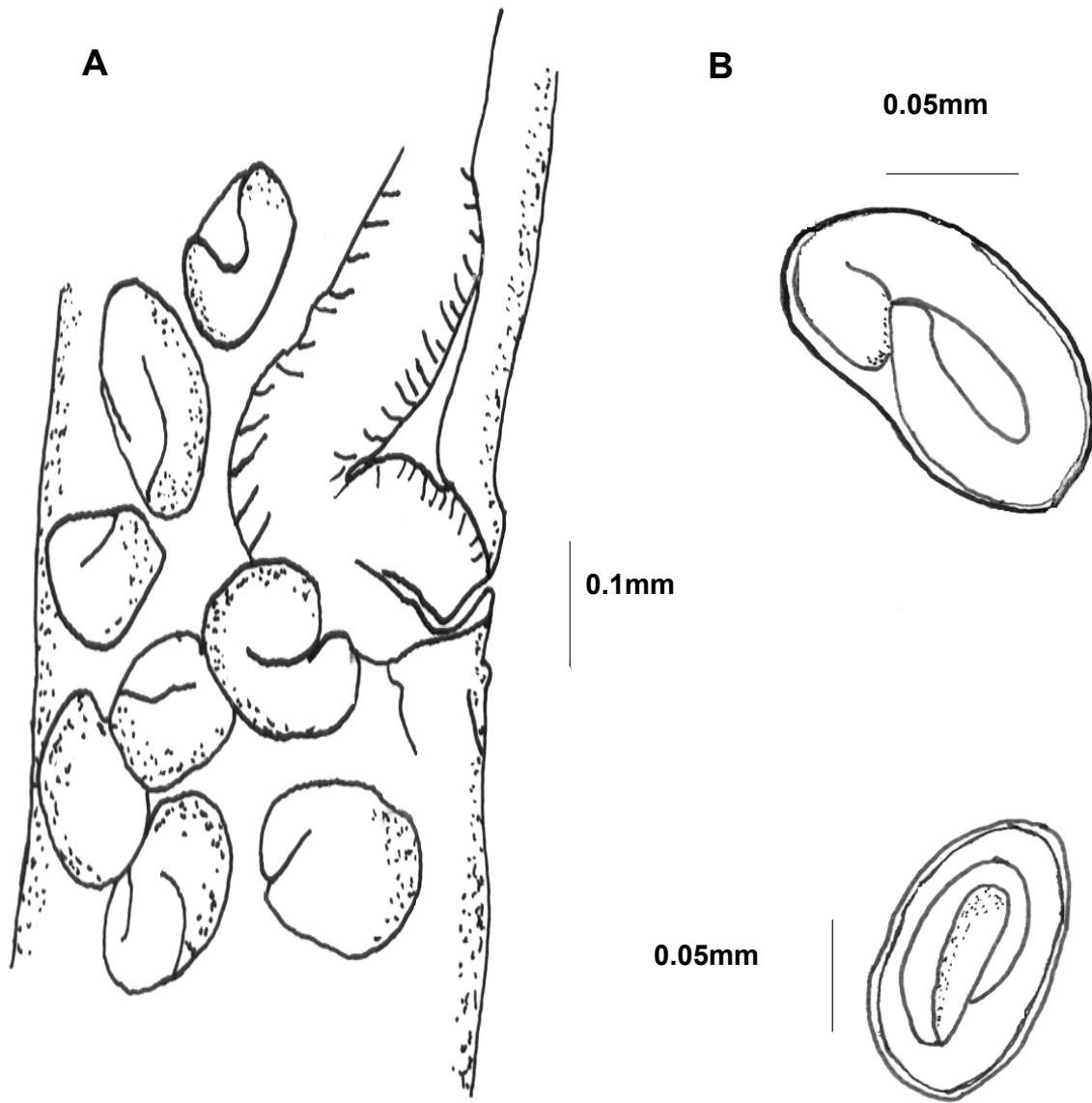


Figura 2. *Aplectana incerta*, hembra. **A)** Vulva; **B)** huevos.

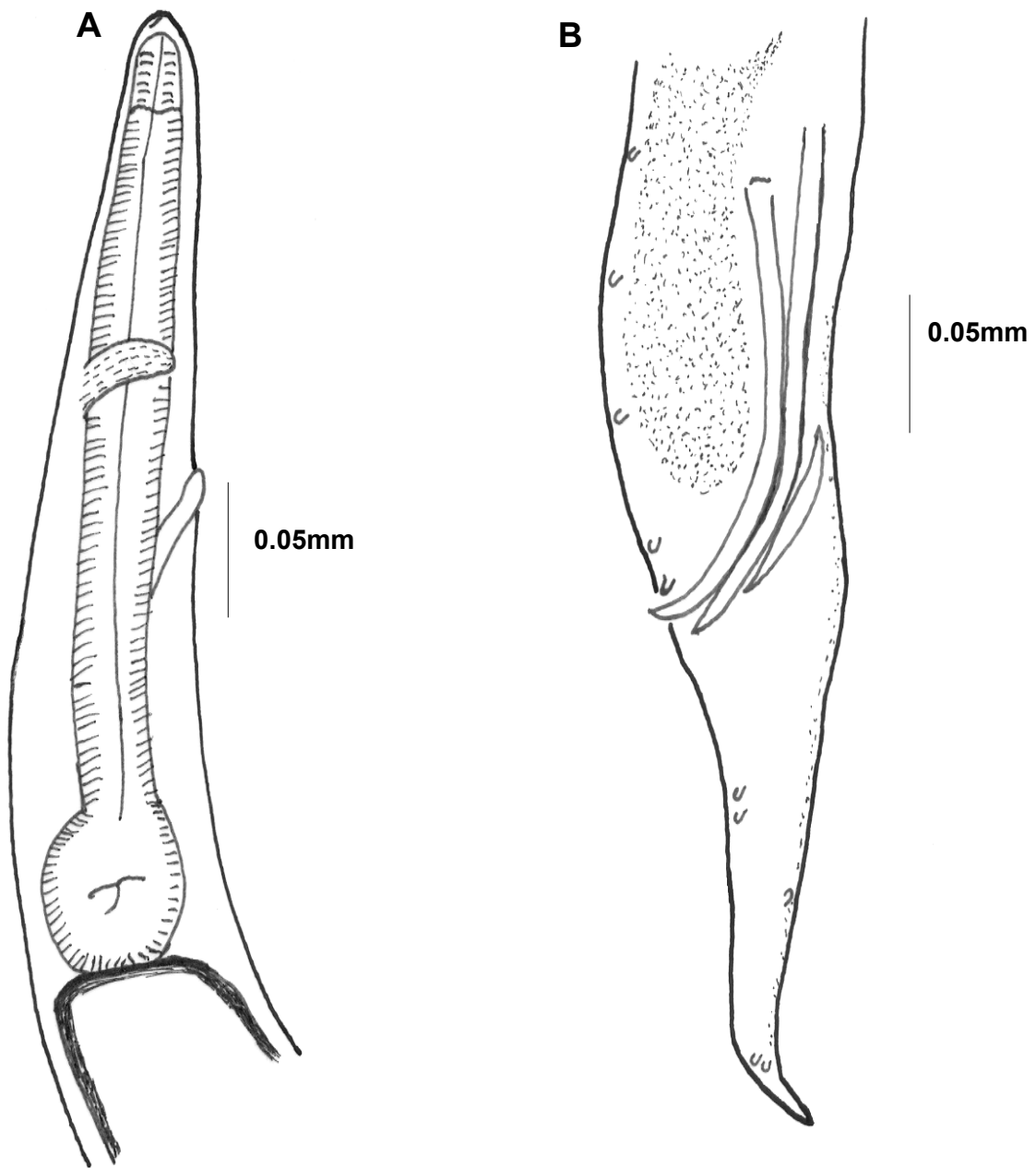


Figura 3. *Aplectana incerta*, macho. **A)** Región anterior; **B)** extremo caudal en donde se observan las espículas, el gubernaculo y las papilas.

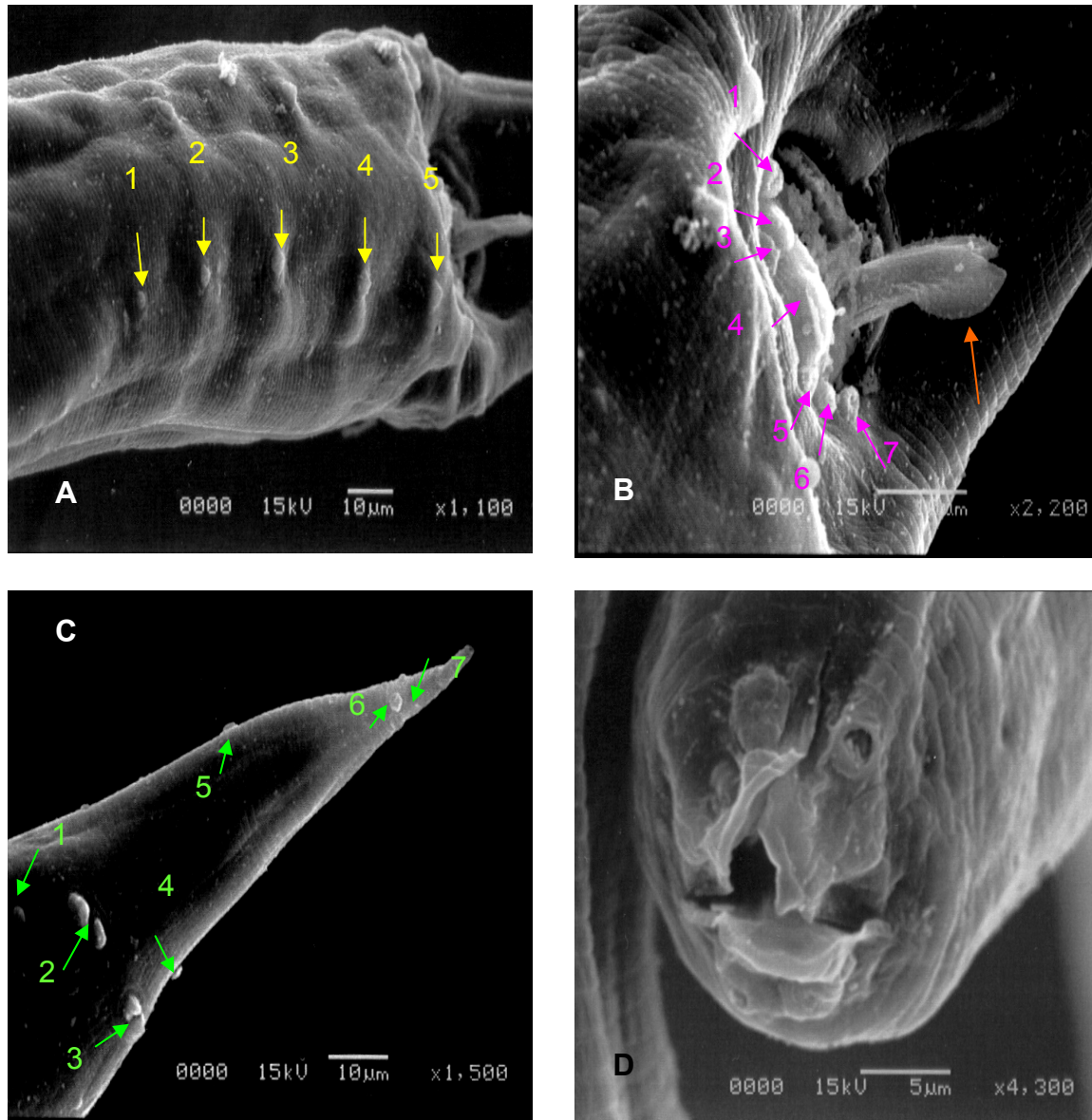


Figura 4. *Aplectana incerta*, macho, fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Se observan los 5 pares de papilas preanales (flechas amarillas); **B)** se muestran las 7 papilas adanales (flechas rosas), se observa una espícula mostrando la capa hialina que la cubre (flecha roja); **C)** se observan los 7 pares de papilas postanales (flechas verdes); **D)** acercamiento de la boca mostrando los tres labios.

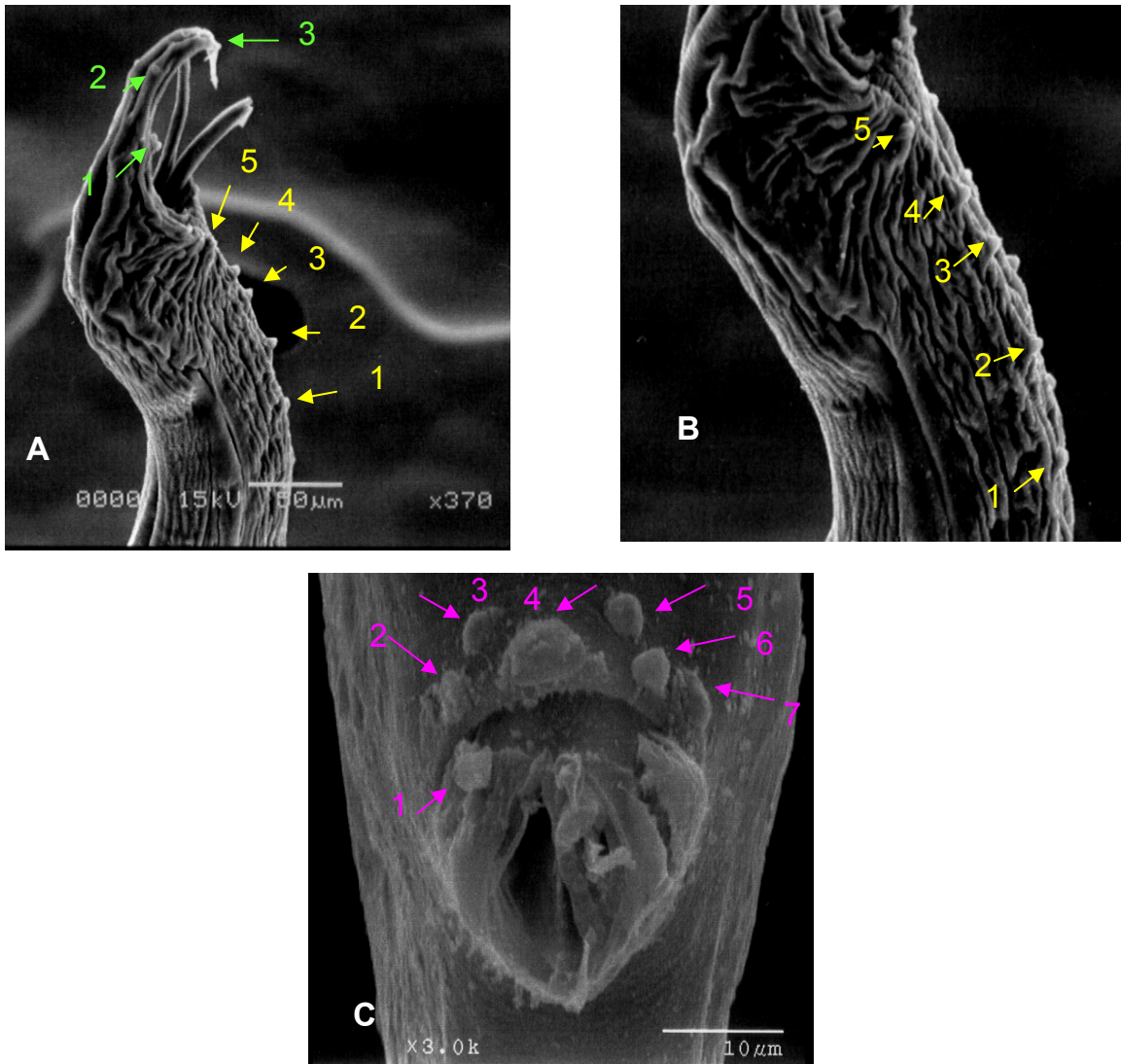


Figura 5. *Aplectana incerta*, macho (ejemplar de la serie tipo, CNHE 2158). Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Se observan los 5 pares de papilas preanales (flechas amarillas), tres pares de papilas postanales (flechas verdes), y se observan ambas espículas; **B)** acercamiento de las papilas preanales; **C)** acercamiento de las 7 papilas adanales (flechas rosas).

Familia Cosmocercidae Railliet, 1916
Subfamilia Cosmocercinae Railliet, 1916
Genero *Aplectana* Railliet y Henry, 1916
Especie *Aplectana itzocanensis* Bravo, 1943
Figuras 6-12.

La siguiente redescrición está basada en 18 ejemplares adultos, 10 de ellos son machos y 8 hembras, recolectados en el intestino posterior de *Bufo marinus* de Paso Canoa, Oaxaca.

Los individuos de esta especie son pequeños, presentan una cutícula blanca semitransparente. La boca está conformada por tres labios que la rodean; cada uno presenta un gancho dirigido al exterior y un par de papilas (Fig.10 A).

Hembras

Dimorfismo sexual muy marcado; las hembras mayores que los machos. Miden de 2.6 - 3.6 (2 ± 0.343 , n=8) de largo por 0.13 - 0.18 (0.14 ± 0.038 , n=8) de ancho.

Faringe con estrías a lo largo de su superficie; 0.042 - 0.048 (0.04 ± 0.005 , n=7) de largo por 0.028 - 0.032 (0.027 ± 0.003 , n=7) de ancho. Esófago 0.368 - 0.512 (0.042 ± 0.044 , n=8) de largo por 0.038 - 0.041 (0.040 ± 0.002 , n=8) de ancho, exhibiendo pequeñas estrías. El bulbo esofágico es casi esférico; mide de 0.096 - 0.112 (0.105 ± 0.014 , n=8) de largo y de ancho 0.086 - 0.092 (0.09 ± 0.007 , n=8).

Poros excretor a 0.390 - 0.401 (0.400 ± 0.052 , n=8) del extremo anterior, ligeramente anterior al bulbo esofágico. Anillo nervioso a la mitad del bulbo esofágico, mide 0.047 - 0.051 (0.044 ± 0.007 , n=5) de ancho. Extremo posterior termina en una delgada punta, la distancia del ano al extremo posterior es de 0.208 - 0.224 (0.211 ± 0.027 , n=8) (Fig.11 A, B y C).

Vulva en la región media del cuerpo; úteros con una gran cantidad de huevos, de cubierta delgada y transparente; y en algunos de ellos se observan larvas. Miden 0.084 - 0.092 (0.086 ± 0.007 , n=18) de largo y 0.041 - 0.054 (0.041 ± 0.008 , n=18) de ancho. Aparato genital de las hembras prodelfo (Fig. 6 A, B y C).

Machos

Menores que las hembras; se distinguen por presentar la cola en forma de gancho; miden 1.5 - 2.9 (2 ± 0.343 , n=10) de largo y 0.11 - 0.13 (0.11 ± 0.016 , n=10) de ancho. Faringe de 0.035 - 0.038 (0.03 ± 0.002 , n=7) de largo por 0.019 - 0.032 (0.022 ± 0.003 , n=7) de ancho; esófago 0.384 - 0.441 (0.351 ± 0.084 , n=10) por 0.028 - 0.035 (0.032 ± 0.003 , n=10), respectivamente. Bulbo esofágico de 0.083 - 0.089 (0.08 ± 0.004 , n=10) de largo y 0.080 - 0.089 (0.08 ± 0.010 , n=10) de ancho.

Distancia entre el poro excretor y el extremo anterior de 0.362 - 0.409 (0.366 ± 0.037 , n=8); anillo nervioso mide 0.032 - 0.048 (0.042 ± 0.006 , n=7) de ancho (Fig. 7 A y B).

Distancia del ano al extremo posterior de 0.156 - 0.176 (0.165 ± 0.022 , n=10); espículas desiguales, presentando en la punta una capa hialina en forma de bolsa; derecha 0.185 - 0.198 (0.188 ± 0.020 , n=10), izquierda 0.166 - 0.182 (0.180 ± 0.021 , n=7); gubernaculum de 0.054 - 0.069 (0.053 ± 0.009 , n=9) de largo. Arreglo papilar con cinco pares de papilas dispuestas en la región preanal, seis en la región postanal y 7 papilas adanales (Fig. 8 A ,B, C y D).

Hospedero tipo:

♣ *Spea multiplicata* y *Bufo marinus* (Bravo-Hollis, 1943).

Localidad tipo:

♣ Izúcar de Matamoros, Puebla.

Ejemplar tipo:

♣ CNHE 2121

Registros previos:

- ♣ *Spea multiplicata*, Izúcar de Matamoros, Puebla (Bravo-Hollis, 1943)
- ♣ *Bufo marinus*, Veracruz (Caballero - Deloya, 1974)
- ♣ *Bufo valliceps*, Neblinas, Queretaro (Galicía, 1998)
- ♣ *Bufo kelloggi*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)
- ♣ *Bufo mazatlanensis*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)
- ♣ *Leptodactylus melanonotus*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)
- ♣ *Pachymedusa dacnicolor*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)
- ♣ *Rana magnaocularis*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)
- ♣ *Smilisca baudinii*, Sonora (Goldberg and Bursey, 2002)

Comentarios taxonómicos:

El material fue determinado como *Aplectana itzocanensis*, parásito del intestino de *Bufo marinus*, con base en los siguientes caracteres: la diferencia entre la longitud total de las hembras y la de los machos, el tamaño de las espículas, el tamaño de los huevos, el número de papilas caudales y la distancia del ano y cloaca al extremo posterior; todas estas medidas muy aproximadas a las presentadas en la descripción original (Bravo-Hollis, 1943) y la redescrípción realizada por Baker (1985).

Aplectana itzocanensis se describió a partir de *Spea multiplicata* y *Bufo marinus* en Izúcar de Matamoros, Puebla por Bravo-Hollis (1943) y fue redescrita por Baker (1985), quien diferencia a *A. itzocanensis* de *A. incerta* por la longitud de las espículas (0.172 – 0.203mm contra 0.135 – 0.143, respectivamente) y el tamaño de los huevos, que son mas pequeños en *A. itzocanensis* (0.070 – 0.082mm por 0.042 – 0.051mm) que en *A. incerta* (0.092 – 0.123mm por 0.054 – 0.062mm), estos caracteres y los que se encuentran en la Tabla 4 nos permitieron diferenciar a *A. itzocanensis* de *A. incerta*, las cuales se distinguen claramente de las otras especies descritas para México.

Aplectana mexicana Caballero, 1933, *A. waltoni* (Walton, 1940) y *A. hamatospicula* Walton, 1940, difieren de nuestros ejemplares por la longitud de la

faringe, bulbo esofágico, por el tamaño de los huevos, el tamaño de las espículas y el arreglo papilar (ver Tabla 3).

Sin embargo, existe controversia sobre la validez de *Aplectana hoffmani*, ya que Baker (1985) señaló que podría ser sinónimo de *A. itzocanensis*. En la descripción original (Bravo-Hollis, 1943), estas especies fueron diferenciadas principalmente por el arreglo papilar de los machos y el tamaño de los huevos.

Al comparar ejemplares de *A. hoffmani* de la serie tipo (CNHE 2123), con ejemplares de *A. itzocanensis* recolectados y los de la serie tipo (CNHE 2121), pudimos comprobar que ambas especies son muy semejantes, aun cuando el número de papilas en los machos es distinto en las dos especies: *A. hoffmani* presenta 7 pares de papilas preanales, 7 adanales y solo pudimos observar 4 papilas postanales (Figuras 13-14); *A. itzocanensis* tiene: 5 pares de papilas preanales, 7 adanales y 6 postanales. (Figuras 7-9).

Nuestros ejemplares coinciden más con la descripción de *A. itzocanensis*, y consideramos que hasta contar con material fresco de *A. hoffmani*, que permita la realización de estudios más detallados se esclarecerá definitivamente esta controversia.

Tabla 4.

Caracteres morfológicos de las especies en estudio (material recolectado en este estudio).

Estructuras / Especie		<i>A. incerta</i> hembras n=10	<i>A. incerta</i> machos n=9	<i>A. itzocanensis</i> hembras n=8	<i>A. itzocanensis</i> machos n=10
Tamaño	L	1.8-3.2	1.8-2.4	2.6-3.6	1.5-2.9
	A	0.11-0.21	0.04-0.07	0.01-0.02	0.011-0.013
Faringe	L	0.03-0.04	0.27-0.037	0.04-0.05	0.03-0.04
	A	0.02-0.03	0.02-0.03	0.02-0.03	0.02-0.03
Esófago	L	0.36-0.41	0.034-0.44	0.37-0.51	0.38-0.44
	A	0.04-0.05	0.04-0.041	0.038-0.041	0.03-0.04
Bulbo esofágico	L	0.09-0.10	0.08-0.010	0.09-0.11	0.08-0.09
	A	0.09-0.010	0.08-0.09	0.08-0.09	0.08-0.09
Distancia del poro excretor al extremo anterior		0.34-0.47	0.32-0.35	0.39-0.40	0.36-0.41
Ancho del anillo nervioso		0.04-0.05	0.03-0.04	0.04-0.05	0.03-0.05
Distancia del ano al extremo posterior		0.15-0.18	0.16-0.21	0.21-0.22	0.16-0.18
Tamaño de los huevos	L	0.11-0.13		0.08-0.09	
	A	0.07-0.08		0.04-0.05	
Tamaño de las espículas			1=0.13-0.14 2=0.13-0.14		1=0.19-0.20 2=0.17-0.18
Tamaño del gubernaculum			0.057-0.080		0.054-0.064
Arreglo papilar		5 pares de papilas preanales, 7 postanales y 7 papilas adanales.		5 pares de papilas preanales, 6 postanales y 7 papilas adanales	

L= longitud, A= ancho, 1= primera espícula, 2= segunda espícula, n= número de individuos

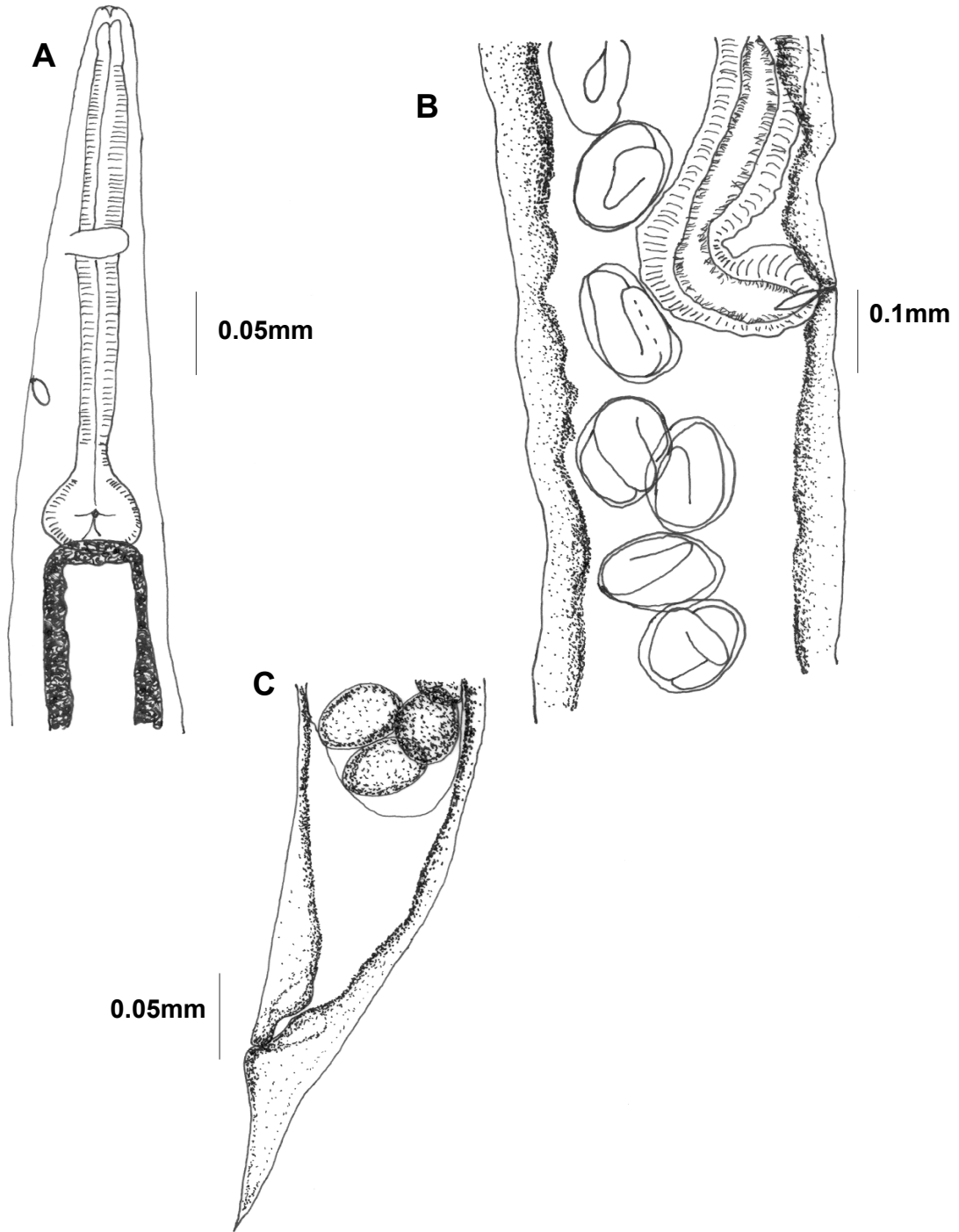


Figura 6. *Aplectana itzocanensis*, hembra. **A)** Región anterior de una hembra, vista lateral; **B)** región vulvar; **C)** región posterior.

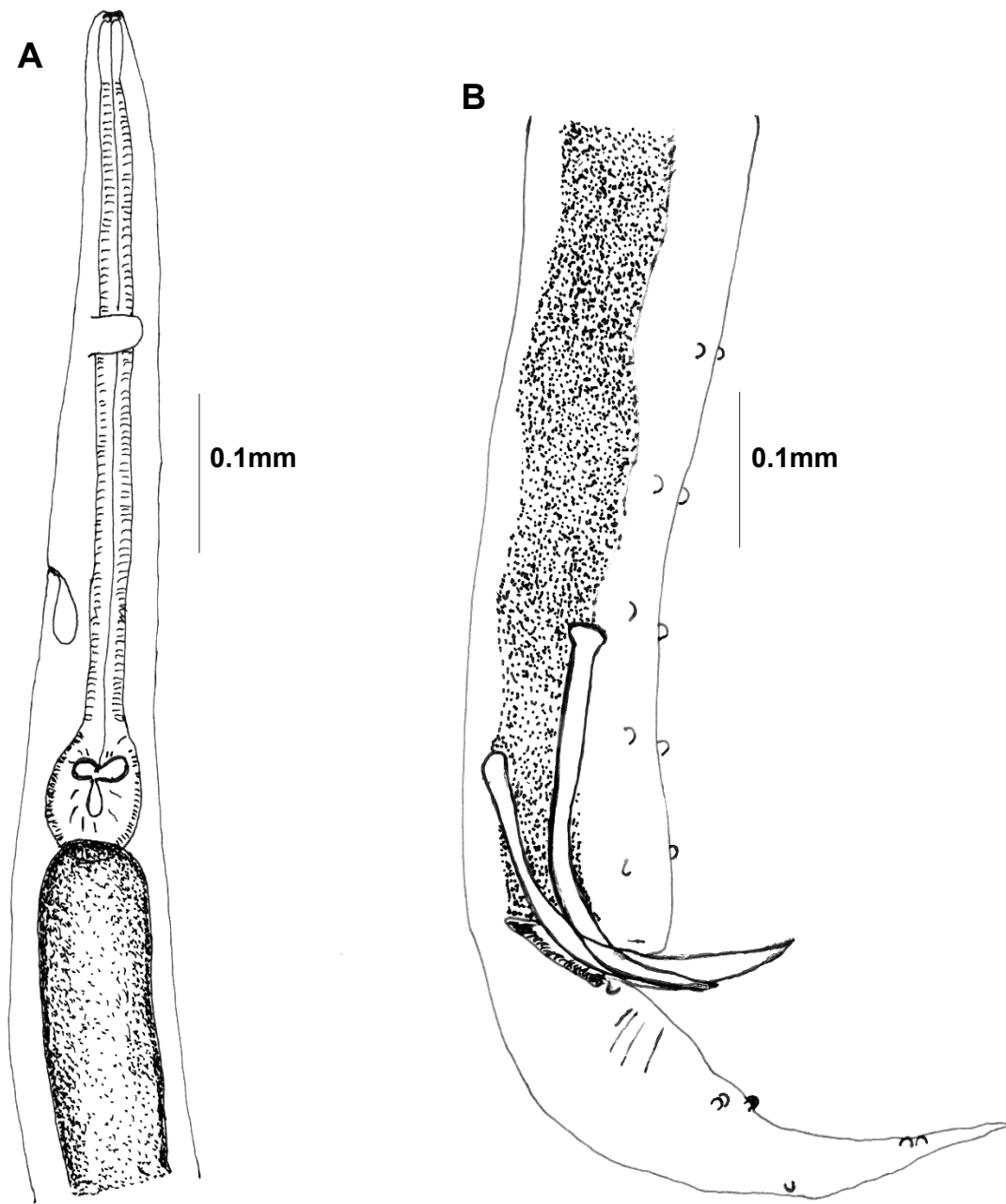


Figura 7. *Aplectana itzocanensis*, macho. **A)** Región anterior; **B)** extremo posterior en donde se observan ambas espículas y las papilas.

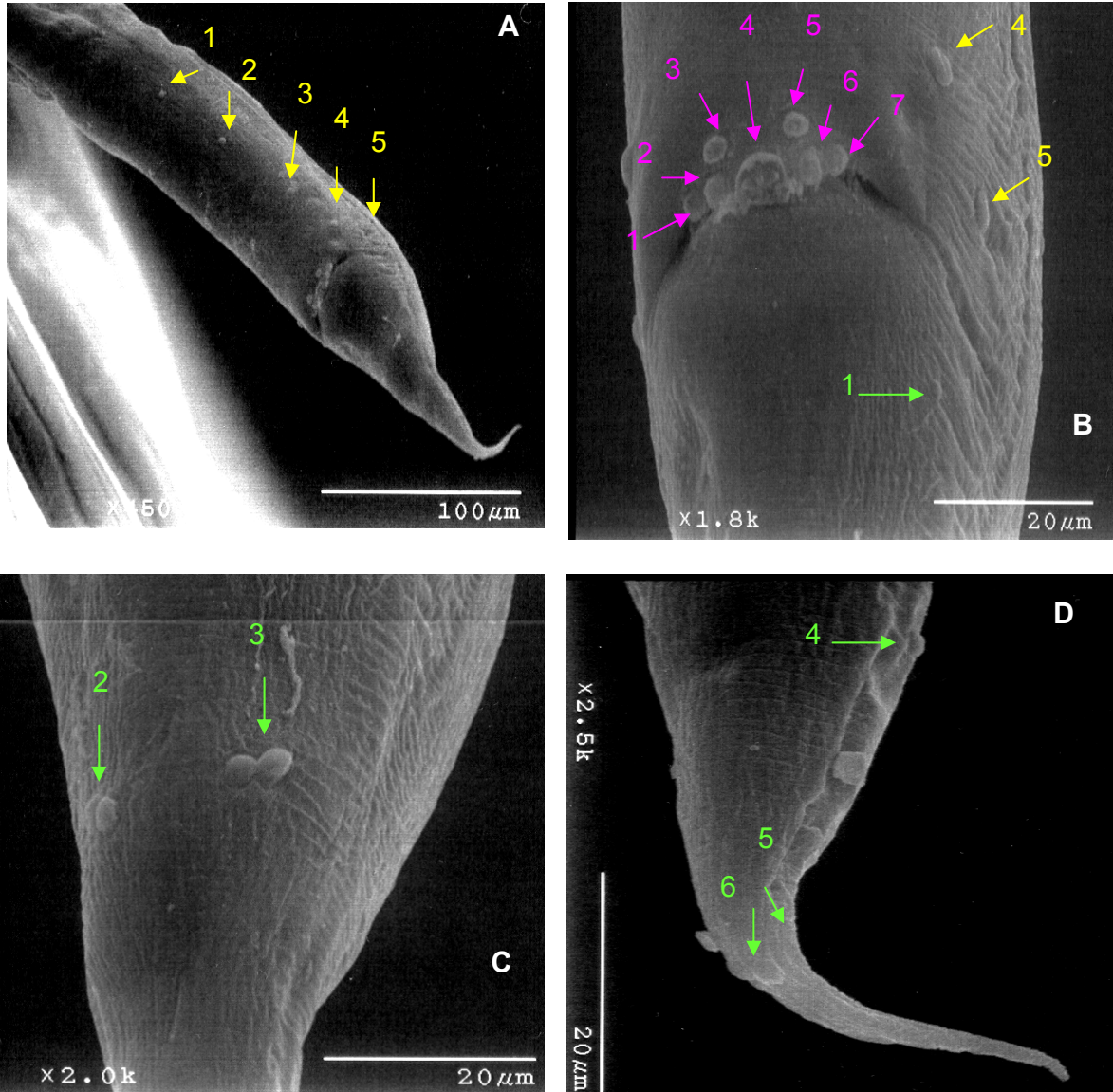


Figura 8. *Aplectana itzocanensis*, macho, fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Se observan los 5 pares de papilas preanales (flechas amarillas); **B)** acercamiento de las 7 papilas adanales (flechas rosas), 2 pares de papilas preanales (flechas amarillas), y un par de papilas postanales (flecha verde); **C)** vista ventral extremo posterior observandose 2 pares de papilas postanales (flechas verdes); **D)** 3 pares de papilas postanales (flechas verdes).

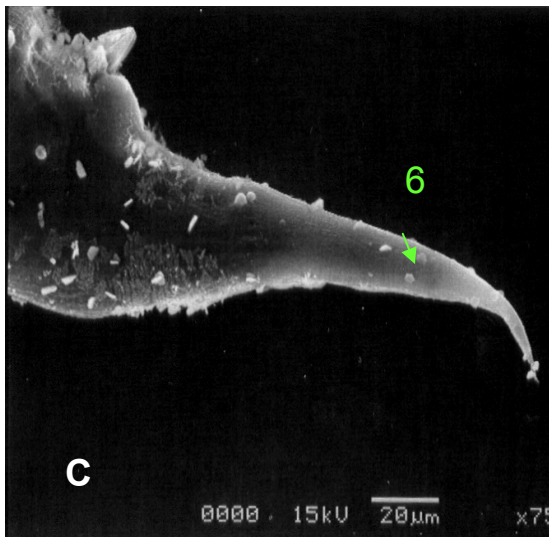
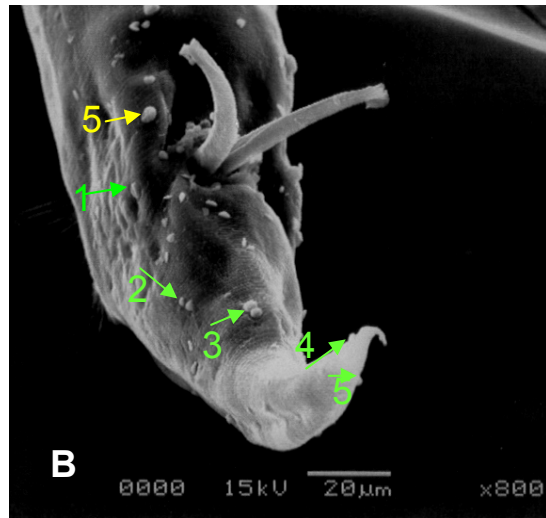
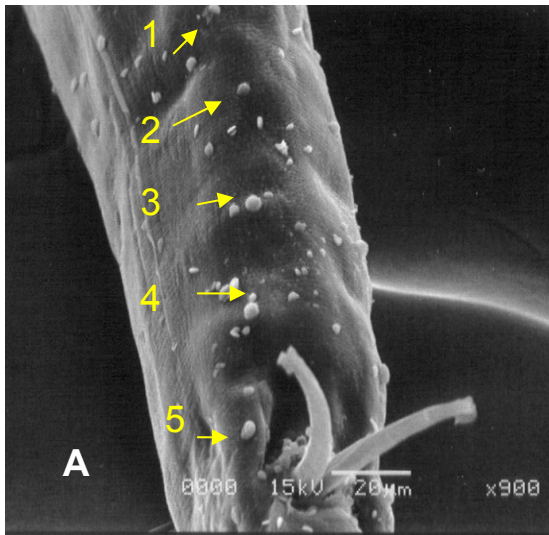


Figura 9. *Aplectana itzocanensis*, macho (ejemplar de la serie tipo, CNHE 2121). Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Se observan los 5 pares de papilas preanales (flechas amarillas) y ambas espículas donde se observa la capa hialina que la cubre; **B)** acercamiento del extremo posterior observándose 5 pares de papilas postanales (flechas verdes), un par de papilas preanales (flechas amarillas) y las espículas; **C)** extremo caudal observándose un par de papilas postanales.

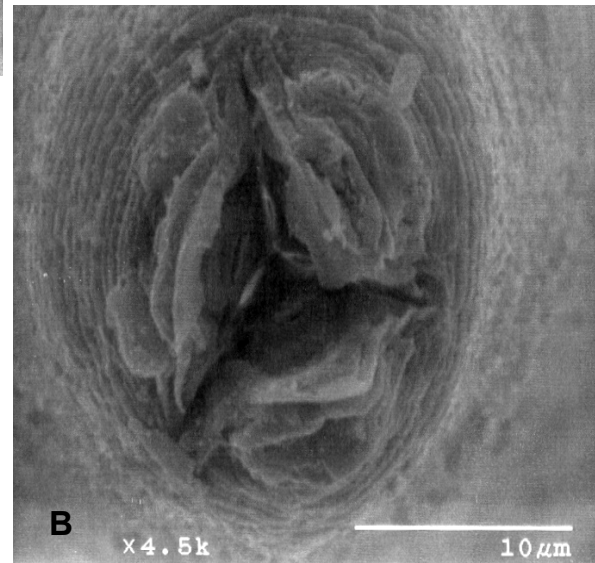
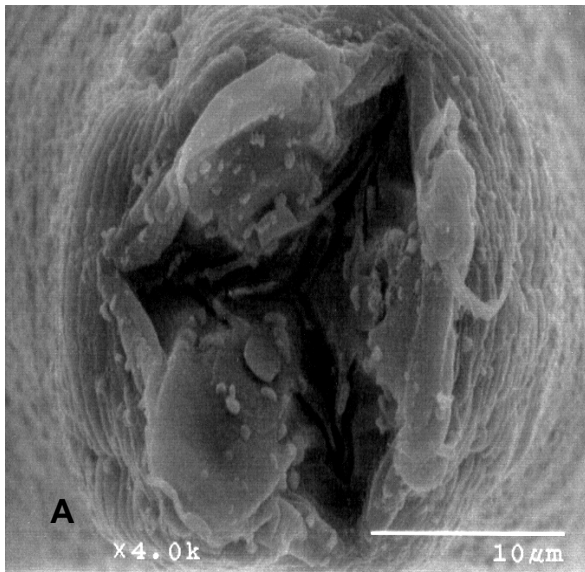


Figura 10. *Aplectana itzocanensis*, macho, fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Acercamiento de la boca se observan los tres labios; **B)** acercamiento de la boca de un ejemplar de la serie tipo (CNHE 2121).

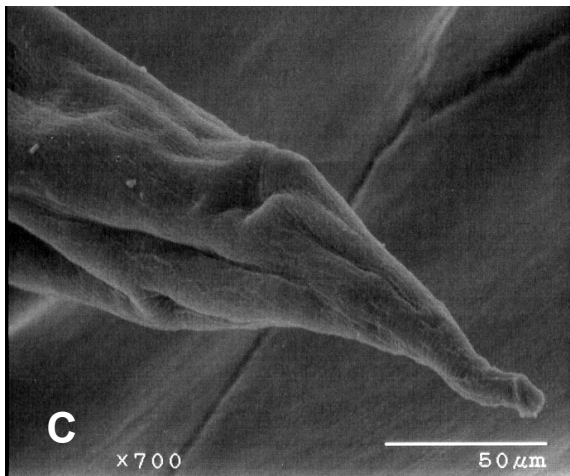
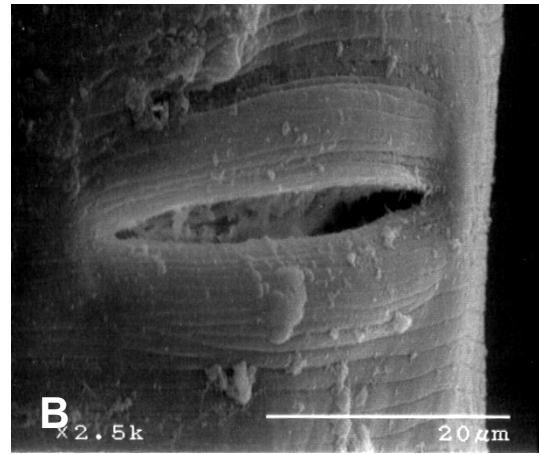
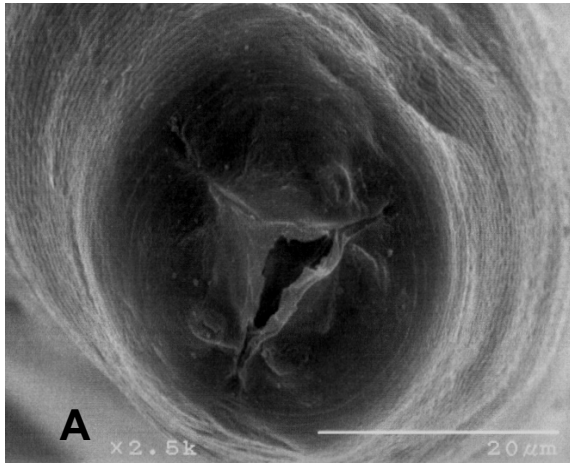


Figura 11. *Aplectana itzocanensis*, hembra, fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Acercamiento de la boca; **B)** región vulvar; **C)** extremo posterior.

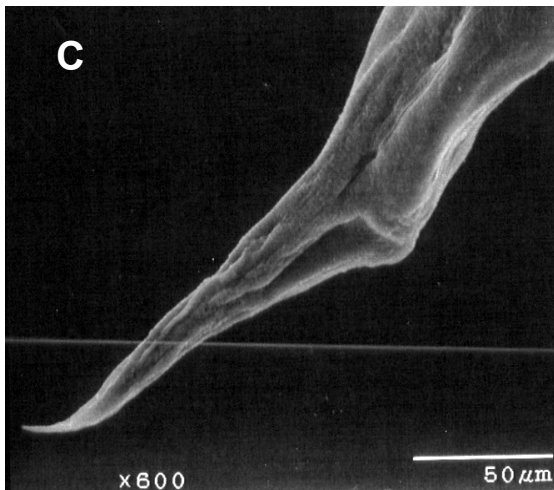
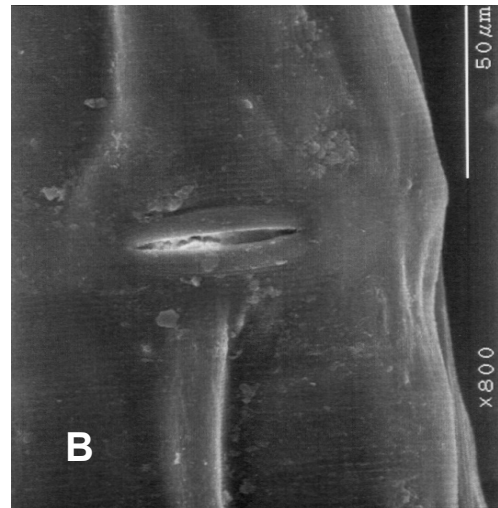
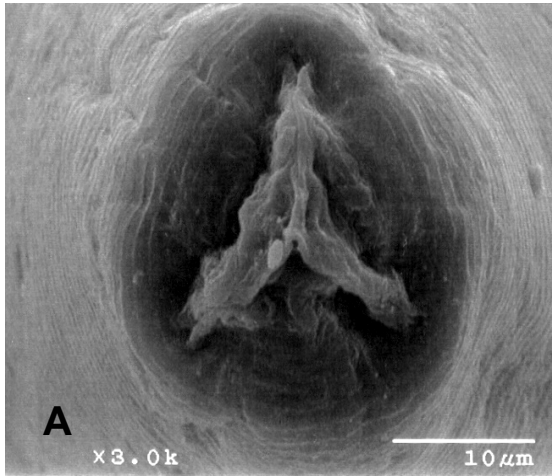


Figura 12. *Aplectana itzocanensis*, hembra (ejemplar de la serie tipo, CNHE 2121). Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Acercamiento de la boca; **B)** región vulvar; **C)** acercamiento del extremo posterior.

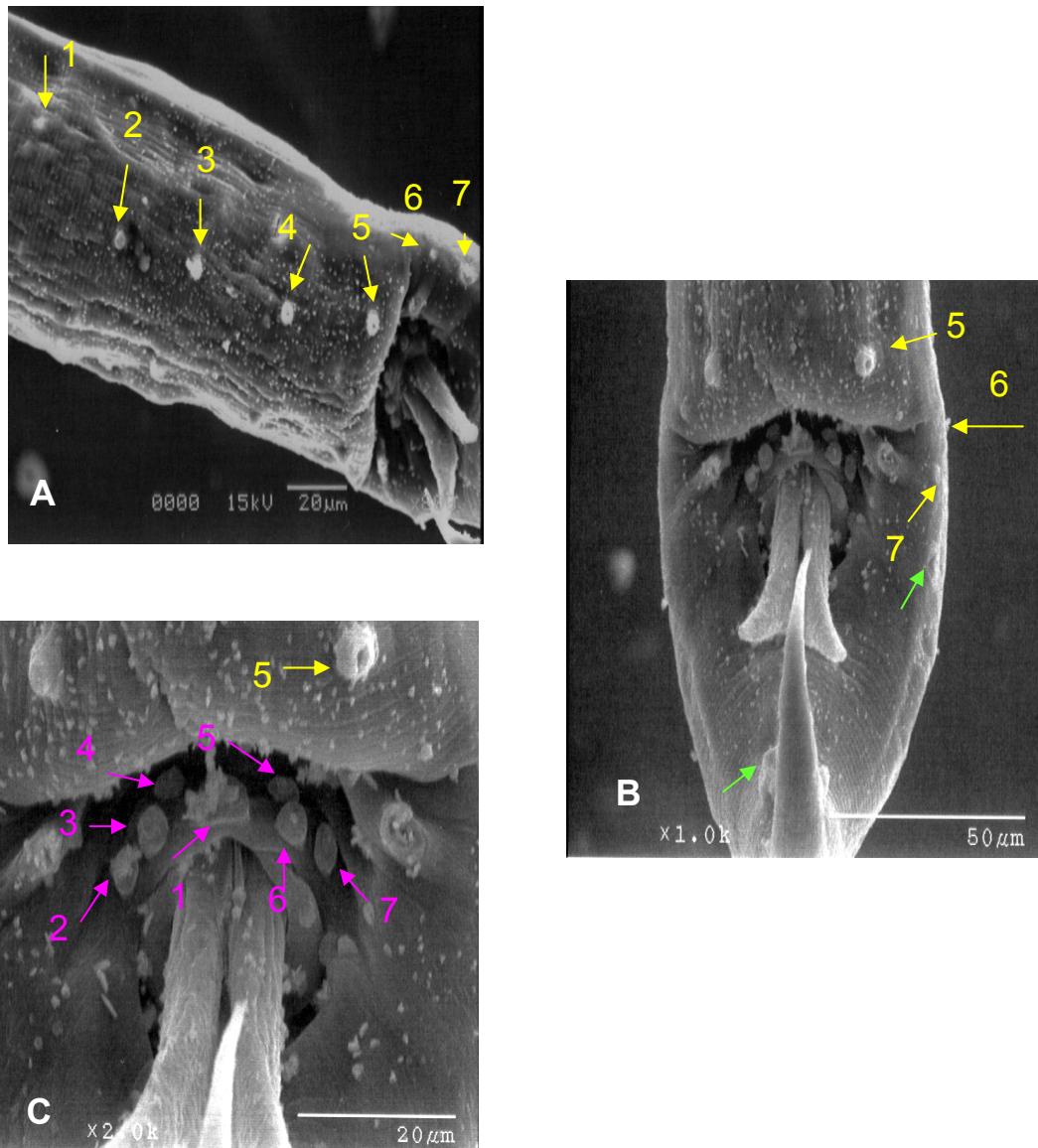


Figura 13. *Aplectana hoffmani*, macho (ejemplar de la serie tipo, CNHE 2123). Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Se observan 7 pares de papilas preanales (flechas amarillas); **B)** acercamiento del extremo posterior solo se observan 2 pares de papilas postanales (flechas verdes), 3 pares de papilas preanales (flechas amarillas) y ambas espículas; **C)** acercamiento de las 7 papilas adanales (flechas rosas).

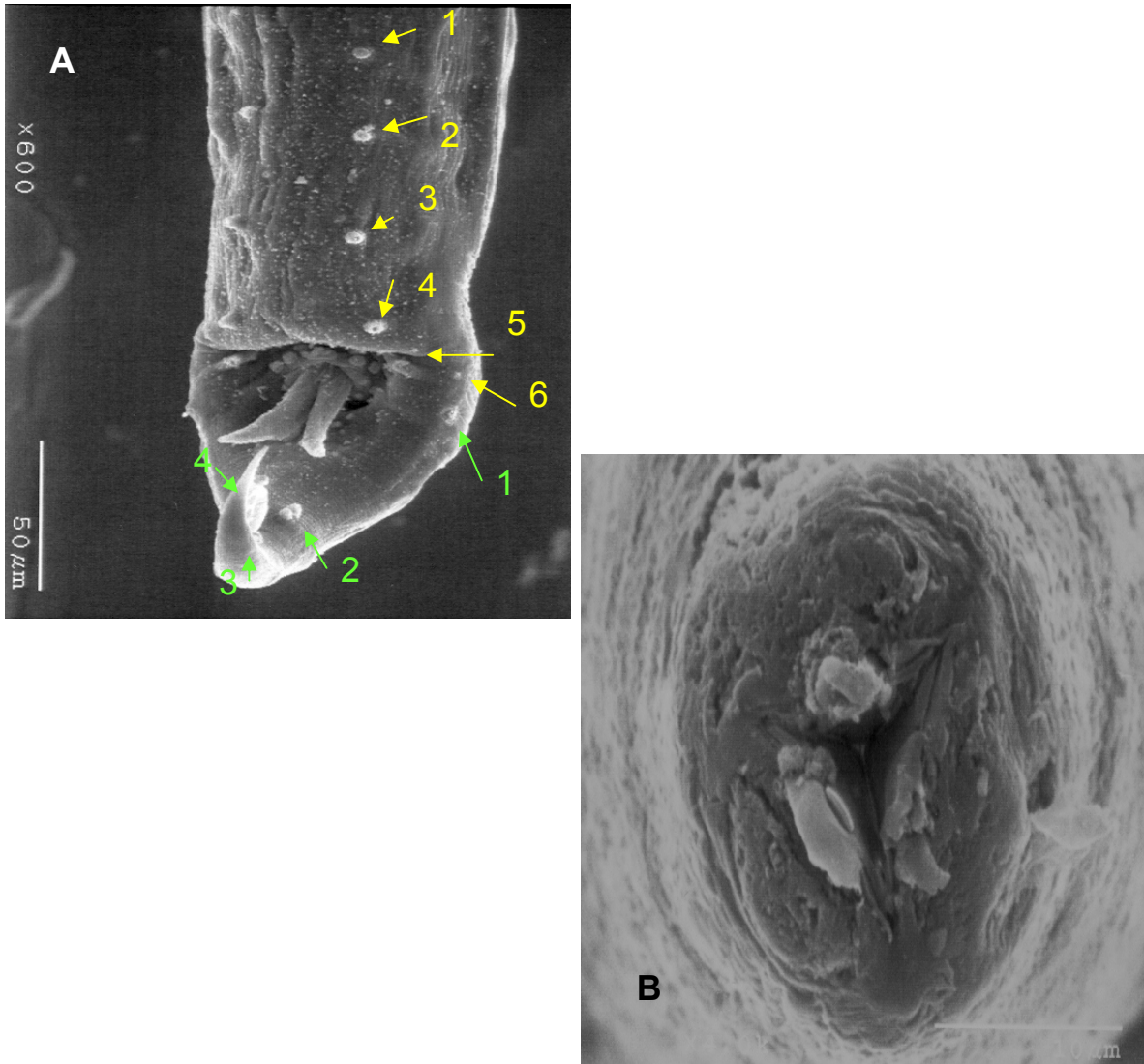


Figura 14. *Aplectana hoffmani*, macho (ejemplar de la serie tipo, CNHE 2123). Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. **A)** Vista ventral observándose 6 pares de papilas preanales (flechas amarillas), 4 pares de papilas postanales (flechas verdes), y ambas espículas; **B)** acercamiento de la boca.

6.2. Estudio molecular

El fragmento amplificado del gen mitocondrial COI (subunidad I del citocromo c oxidasa) de *Aplectana itzocanensis*, *A. incerta* y *Cosmocerca* sp. (Grupo externo) resultó en un alineamiento de 353 pb (Apéndice 1).

El porcentaje de divergencia entre las secuencias de *A. itzocanensis* y *A. incerta* con respecto a las secuencias del grupo externo fue de 17.41% a 21.21%; mientras que la divergencia entre las secuencias de *A. itzocanensis* y *A. incerta* fue de 7.34% a 11.11%. La divergencia entre las secuencias de individuos de la misma especie fluctuó entre 0% y 3.5% (Tabla 5).

Del análisis filogenético de Máxima Parsimonia se obtuvieron 4 árboles igualmente parsimoniosos (Apéndice 2), con una longitud de 145 pasos y un índice de consistencia de 0.956. En el consenso estricto de estos árboles se observa que *A. itzocanensis* y *A. incerta* forman dos grupos independientes con valores altos de soporte de ramas (Fig. 15).

Las relaciones entre las secuencias incluidas observadas en la topología del árbol de consenso estricto, los valores de soporte de ramas y los niveles de divergencia observados en las secuencias, nos indican que *A. itzocanensis* y *A. incerta* son especies independientes y válidas. Asimismo, estos resultados respaldan lo observado en las características morfológicas, indicando así que los caracteres que se han utilizado para diferenciar especies del género son confiables y válidos.

Tabla 5. Matriz de distancia de las secuencias gen mitocondrial COI de varios individuos de las especies *Aplectana itzocanensis*, *A. incerta* y *Cosmocerca* sp. Los números indican porcentaje de diferencia entre las secuencias. Los resaltados en negritas indican los valores máximos y mínimos entre las secuencias del grupo externo y ambas especies.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Cosmocerca</i> sp.	-									
2 <i>Cosmocerca</i> sp.	0.05274	-								
3 <i>Itzocanensis</i> A	0.18414	0.21214	-							
4 <i>Itzocanensis</i> B	0.20028	0.20914	0.03478	-						
5 <i>Itzocanensis</i> C	0.19258	0.21166	0.01856	0.00620	-					
6 <i>Incerta</i> A	0.18414	0.20821	0.08215	0.10827	0.09174	-				
7 <i>Incerta</i> B	0.18697	0.20801	0.08782	0.11112	0.09480	0.00567	-			
8 <i>Incerta</i> C	0.18414	0.20821	0.08215	0.10827	0.09174	0.00000	0.00567	-		
9 <i>Incerta</i> D	0.18697	0.20801	0.08499	0.10832	0.09168	0.00283	0.00850	0.00283	-	
10 <i>Incerta</i> E	0.17410	0.18315	0.07347	0.08170	0.07551	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-

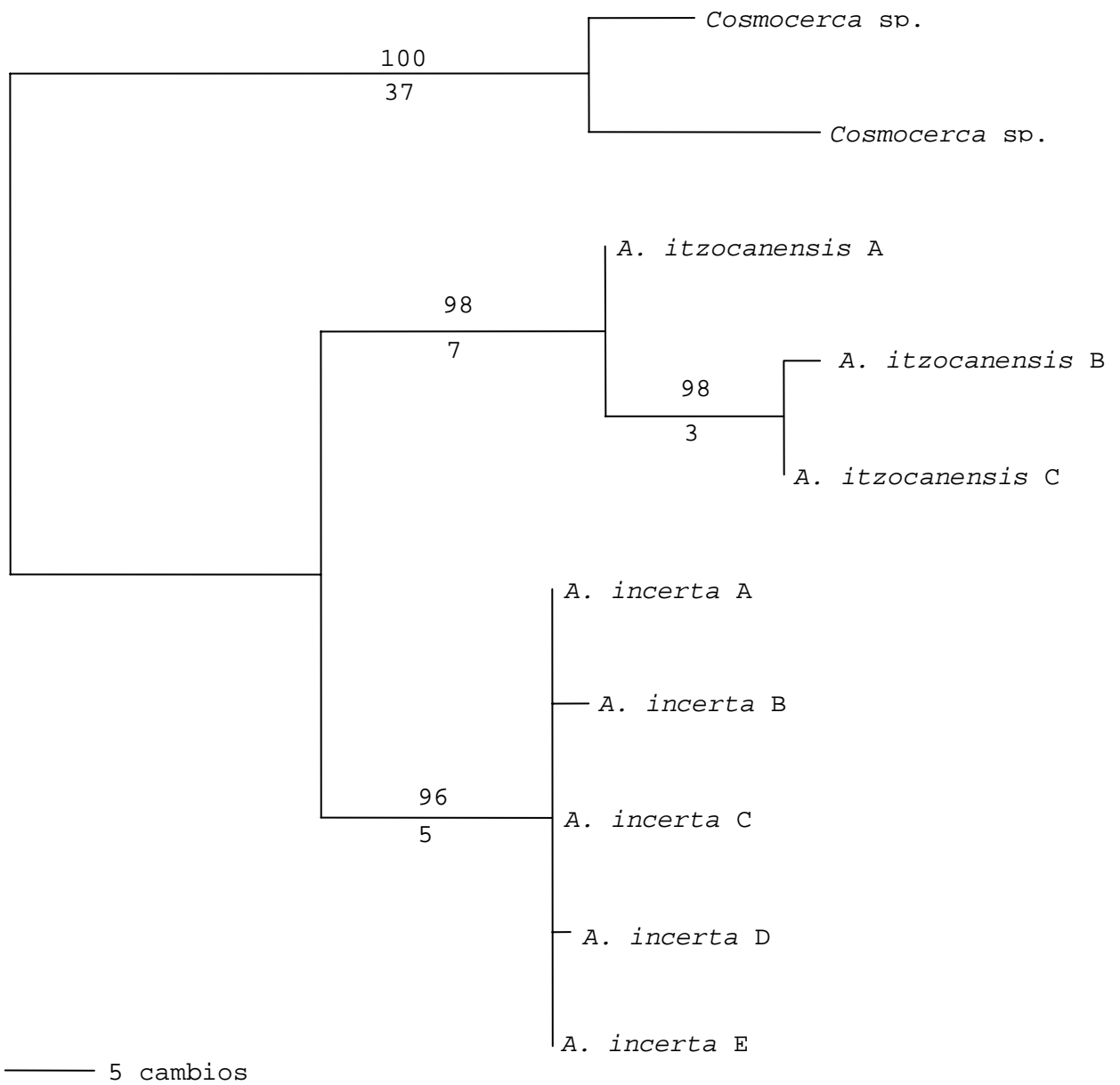


Figura 15. Árbol de consenso estricto de 4 árboles igualmente parsimoniosos mostrando la divergencia genética. Los valores de Bootstrap se muestran por encima de las ramas y los valores del índice de decaimiento de Bremer se muestran por debajo de las ramas. La longitud de las ramas indica el número de cambios.

7. Discusión

Al comparar el material recolectado en este estudio con los ejemplares tipo de cada una de las especies depositadas en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología de la UNAM (CNHE 2158 para *A. incerta* y CNHE 2121 para *A. itzocanensis*) y con la descripción original de las mismas (Bravo-Hollis, 1943; Caballero, 1949), encontramos que morfológicamente los ejemplares recolectados en San Juan de los Llanos - Ometepec, Guerrero corresponden con las características descritas para la especie *A. incerta*, mientras que los recolectados en Paso Canoa, Oaxaca corresponden con *A. itzocanensis*.

Para el estudio morfométrico de ambas especies se utilizaron 22 caracteres (ver Tabla 4), siendo útiles para distinguirlas. Adicionalmente encontramos dos rasgos diferenciales más, que sumamos a los propuestos por Baker (1985): 1) la distancia del ano al extremo posterior, la cual es mayor en las hembras de *A. itzocanensis* y en los machos de *A. incerta*, y 2) el número de papilas postanales, 6 pares en *A. itzocanensis* y 7 en *A. incerta*.

Asimismo, nuestro análisis permitió corroborar la estabilidad del rango de medidas que describe Baker (1985), en cuanto al tamaño de las espículas: en *A. itzocanensis* siempre de mayor tamaño que *A. incerta* (0.19 – 0.20 y 0.13 – 0.14mm, respectivamente). Por lo que respecta al tamaño de los huevos, observamos que son más grandes los de *A. incerta* que los de *A. itzocanensis* (0.11 – 0.13 de largo contra 0.08 – 0.09, respectivamente), coincidiendo también con el planteamiento de Baker (1985).

Por otro lado, el análisis molecular demostró que el porcentaje de divergencia del grupo externo con respecto a *A. itzocanensis* y *A. incerta* va de 17.41% - 21.21%. Mientras que el nivel de divergencia es de 7.34% - 11.11% entre *A. itzocanensis* y *A. incerta*. El análisis de parsimonia resultó en un agrupamiento de las secuencias de cada especie con valores de soporte altos.

La evidencia morfológica obtenida para diferenciar a *A. itzocanensis* de *A. incerta* pertenecientes al género *Aplectana*, está sustentada por el análisis molecular, por lo que podemos concluir que el uso de caracteres morfológicos como el tamaño de las espículas, tamaño de los huevos, el número de papilas y la distancia del ano al extremo posterior, es válido e informativo para diferenciar a ambas especies.

En conjunto, tanto la consistencia en el rango de los caracteres morfológicos, como los niveles de diferencia molecular y la topología del árbol obtenido, determinan que *A. itzocanensis* y *A. incerta* son especies diferentes y válidas para el género *Aplectana*.

De esta forma, *Aplectana itzocanensis* y *A. incerta* pueden distinguirse de *A. mexicana* por el número de papilas preanales, ya que ésta presenta 3; de *A. hamatospicula* y *A. waltoni* se diferencian por poseer 4 y 6 pares de papilas preanales, respectivamente. Con relación al número de papilas postanales, *A. hamatospicula* y *A. waltoni* presentan 7 pares, siendo en número mayor que las de *A. itzocanensis* e iguales que en *A. incerta*, mientras que *A. mexicana* tiene 5 pares, diferenciándose así de *A. itzocanensis* y *A. incerta* (que exhiben 6 y 7 pares respectivamente). Las papilas adanales de *A. hamatospicula*, *A. waltoni* y *A. mexicana* no se pueden comparar con las de las dos especies en estudio debido a que este carácter no se detalla en sus descripciones originales.

Adicionalmente, *A. mexicana* se diferencia de las especies en estudio por la longitud de su faringe, la cual es más corta en la especie de Walton, porque el bulbo esofágico es más pequeño, la longitud de sus huevos es menor, y en el caso de las espículas, porque éstas en *A. mexicana* tienen el mismo tamaño, mientras que en las de las otras dos especies son desiguales.

En el caso de *A. waltoni*, el tamaño de los machos es mayor y con respecto a las espículas, éstas son iguales y más grandes que las de *A. incerta* y *A. itzocanensis*. La mayor diferencia que presenta *A. hamatospicula* con respecto de las especies en estudio, es la longitud de las espículas, pues en esta especie son mucho mayores. Adicionalmente, la distancia del ano al extremo posterior es más grande en los machos de *A. hamatospicula* al igual que su faringe.

Con respecto a *A. hoffmani*, y de acuerdo con su descripción original, ésta se caracteriza porque las hembras tienen una gran longitud corporal, siendo la de mayor tamaño entre las especies descritas para México. Además, la distancia del ano al extremo posterior es mayor en las hembras de esta especie a diferencia de las de *A. incerta*, en donde este carácter es mayor en los machos. Sin embargo, *A. hoffmani* fue señalada por Baker (1985) como sinónimo de *A. itzocanensis*, criterio compartido por Goldberg y Bursey (1998).

Al examinar el material tipo de *A. hoffmani* depositado en la CNHE (No. de catálogo 2123), encontramos que se diferencia de *A. itzocanensis*

principalmente en cuanto a la longitud del cuerpo, tanto en el caso de las hembras como en los machos. No obstante, al comparar las estructuras de ambas especies encontramos que éstas se asemejan en la morfometría del bulbo esofágico, la faringe, gubernaculum, el tamaño de las espículas, los huevos y la distancia del ano al extremo posterior, respaldando así lo que señaló Baker (1985).

El arreglo papilar de *A. hoffmani*, fue descrito por Bravo-Hollis (1943) como sigue: 9 pares de papilas preanales, 7 papilas adanales y 6 papilas postanales; dicho arreglo pareciera diferenciarla de *A. itzocanensis* (5 preanales, 7 adanales y 6 postanales); sin embargo, encontramos que en algunos ejemplares de *A. hoffmani* solo se observan 7 pares de papilas preanales; en cuanto al número de papilas adanales y postanales, observamos siempre el mismo patrón (7 y 6, respectivamente). El análisis del material con Microscopia Electrónica de Barrido reveló claramente la existencia de 7 papilas preanales, 7 papilas adanales y solo se observan 4 papilas postanales, esto último debido a la posición del ejemplar en estudio (Fig. 14 D).

Si las variaciones observadas en el número de papilas preanales en *A. hoffmani* y *A. itzocanensis* corresponden a una variación intraespecífica o si en realidad diferencian a las dos especies como lo propuso Bravo-Hollis (1943), permanece como una interrogante a resolver con el uso de caracteres moleculares, ya que a pesar de nuestros intentos de recolecta en la localidad tipo, fue imposible encontrar a los hospederos de *A. hoffmani*, probablemente debido a la gran perturbación antropogénica de la zona.

Finalmente, este análisis demuestra la importancia de interpretar los caracteres morfológicos en conjunto con los datos moleculares, lo cual nos da una mayor precisión y claridad para resolver problemas taxonómicos.

8. Conclusiones

- ❖ *Aplectana itzocanensis* difiere de *A. incerta* por las siguientes características morfológicas: longitud corporal, tamaño de las espículas, tamaño de los huevos, el número de papilas caudales y la distancia del ano al extremo posterior.
- ❖ Se corrobora que estos caracteres propuestos por Baker (1985), son válidos e informativos taxonómicamente para diferenciar a ambas especies.
- ❖ Las secuencias del gen COI proporcionan información totalmente congruente con la información morfológica. El árbol filogenético obtenido agrupa las secuencias de cada una de las especies en clados con alto soporte.
- ❖ La divergencia genética entre las dos especies es de 17.41% y de 21.21% con respecto a *Cosmocerca* sp., mientras que se observó una divergencia genética máxima entre *A. itzocanensis* y *A. incerta* de 11.11%.
- ❖ *Aplectana itzocanensis* y *A. incerta* son especies válidas.
- ❖ Este análisis demuestra la importancia de interpretar los caracteres morfológicos en conjunto con los datos moleculares para esclarecer problemas taxonómicos.
- ❖ Con los datos moleculares anteriormente expuestos se podrán establecer comparaciones más exactas con los demás representantes de este género.
- ❖ Es necesario realizar un estudio molecular con ejemplares de *A. hoffmani* para precisar su validez.

9. Bibliografía.

- **Almeyda–Artigas, R. J., M. D. Bargues and S. Mas-Coma.** 2000. ITS-2 rDNA Secuencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*. 86: 537–544.
- **Anderson, G. R. and S. C. Barker.** 1998. Inference of phylogeny and taxonomy within the Didymnozoidae (Digenea) from the second internal transcribed spacer (ITS-2) of ribosomal DNA. *Systematic Parasitology*. 41: 87-94.
- **Anderson, R. C.** 1992. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission.* CAB International University Press, Cambridge, 578 pp.
- **Báez, V. R.** 2001. Análisis de la estructura de las comunidades de helmintos de cuatro especies de anuros de la región de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. 101 pp.
- **Baker, M. R.** 1985. Redescription of *Aplectana itzocanensis* and *A. incerta* (Nematoda: Cosmocercidae) from Amphibians. *Transactions of the American Microscopical Society*. 104: 272- 277.
- **Baker, M. R.** 1987. Synopsis of the Nematoda Parasite in Amphibians and Reptiles. *Memorial University of Newfoundland Occasional Papers in Biology*. 11: 325.
- **Bravo-Hollis, M.** 1943. Dos nuevos nemátodos parásitos de Anuros del sur de Puebla. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma México*. 14: 69 – 78.
- **Caballero y C, E.** 1933. Nematodos parásitos de los batracios de México II. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México*. 4: 187-190.
- **Caballero y C, E.** 1949. Estudios Helmintológicos de la Región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 5ª parte. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 20: 279 – 292.
- **Caballero-Deloya, J.** 1974. Estudio helmintológico de los animales silvestres de la estación de biología tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz. Nematodos I. Algunos nemátodos parásitos de *Bufo horribilis* Wiegmann, 1833. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México*. 45: 45-50.
- **Cabrera, G. E.** 2002. Comunidades de helmintos parásitos de *Rana forreri*, Boulenger, 1883 (Amphibia: Ranidae) en dos localidades del Municipio de Acapulco, Guerrero México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 118 pp.
- **Carranza, S.** 2004. Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. Ed. Primera. España. 587 pp.
- **Cheng, T.** 1978. *Parasitología General.* Ed. Libros Científicos y Técnicos. Madrid, España. 965 pp.

- **Espinoza, J. A.** 2006. Registro helmintológico de *Bufo marinus* en dos localidades de Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 80 pp.
- **Galicia, G. S.** 1998. Helmintos parásitos de tres especies de *Bufo* en diferentes localidades de México. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 104 pp.
- **Galicia, G. S., C. R. Bursey, S. R. Goldberg and G. Salgado Maldonado.** 2000. Helminths of two sympatric toad species, *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo marmoratus* Wiegmann, 1833 (Anura: Bufonidae) from Chamela, Jalisco, México. *Comparative Parasitology* 67: 129-133.
- **Goldberg, S. R. and C. R. Bursey.** 1998. Nematodes of the Great Plains Narrow-mouthed Toad, *Gastrophryne olivacea* (Microhylidae), from Southern Arizona, *Journal of Helminthological Society of Washington*. 65: 102 – 104.
- **Goldberg, S. R. and C. R. Bursey.** 2002. Helminth parasites of seven anurans species from Northwestern México. *Western North American Naturalist*. 62: 160-169.
- **Guillén, H. S.** 1992. Comunidades de Helmintos de algunos anuros de los Tuxtlas Veracruz. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 90 pp.
- **Hall T. A.** 1999. BioEdit a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/N T. *Nucleic Acids Symposium*. Ser. 41: 95 – 98.
- **Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard.** 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 270: 313-321.
- **Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham and J. R. deWaard.** 2003b. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceeding of the Royal Society of London*. B(suppl.) 03BL0066.S1-4. (DOI.10.1098/rsbl.2003.0025).
- **Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak and C. M. Francis.** 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2: 1657-1663.
- **Lamothe, A. R.** 1987. Importancia de la taxonomía en parasitología. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoológica*. 58(2): 883-886.
- **Lamothe, R. y L. García.** 1988. *Helminthiasis del hombre en México*. Editor AGT México D. F. 131 pp.
- **León-Règagnon, V., D. R. Brooks and G. Pérez-Ponce de León.** 1999. Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiiformes): molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology* 85: 935-946.
- **León-Règagnon, V., S. Guillén-Hernández and M. A. Arizmendi-Espinosa.** 2005. Intraspecific variation of *Haematoloechus floedae* Harwood, 1932 (Digenea: Plagiorchiidae), from *Rana* sp. in North and Central America. *Journal of Parasitology* 91: 915-921.

- **Liu, J., R. E. Berry and A. E. Moldankc.** 1997. Phylogenetic relationships of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69: 246-252.
- **MacManus, P. and J. Bowles.** 1996. Molecular Genetic Approaches to Parasite Identification: Their value in diagnostic Parasitology and Systematics. *International Journal for Parasitology*. 26: 687 - 704.
- **Martinez, S. E.** 2001. Estudio de la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomidae) en algunos peces de la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 67 pp.
- **Paredes, C. E.** 2000. Helminths parasites of *Rana vaillanti* Brocchi, 1877 (Anura: Ranidae) de la estación de Biología Tropical, Los Tuxtlas Veracruz., Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 69 pp.
- **Sanger, F. S. Nicklen and A. R. Coulson.** 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74: 5463 – 5468.
- **Swofford, D. L.** 2002. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) Versión 4.0b10. Sinauer, Associates Sunderland. Massachusetts.
- **Travassos, L.** 1931. Pesquisas helmintologicas en Hamburgo IX. Ensaio monographico da familia Cosmocercidae. Travassos, 1925 (Nematoda). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 23: 237 – 253.
- **Yamaguti, S.** 1961. *Systema Helminthum*. Nematodes Vol. III Part. Interscience Publishers, INC New York 679.
- **Walton, M. H.** 1940. Notes on amphibian. *Proceeding of the Helminthological Society of Washington*. 7: 87-91.

	10	20	30	40	50	60
<i>Cosmocerca</i> sp.	TTTTTTTGGG	GATCCTGAGG	TTTATATTTT	GATTTTGCCG	GCTTTTGGTA	TCATTAGGCA
<i>Cosmocerca</i> sp.C.....	C.....
<i>Itzocanensis</i> A	A.....A..TT.....T..
<i>Itzocanensis</i> B	A.....A..TT.....T..
<i>Itzocanensis</i> C	A.....A..TT.....T..
<i>Incerta</i> A	A.....A..TT..C..C..
<i>Incerta</i> B	A.....A..TT..C..C..
<i>Incerta</i> C	A.....A..TT..C..C..
<i>Incerta</i> D	A.....A..TT..C..C..
<i>Incerta</i> E	A.....??..TT..C..C..

	70	80	90	100	110	120
<i>Cosmocerca</i> sp.	CAGGAGTCTA	TATATTACTG	GCAAAAAAGA	GGTGTGGGT	TCTTTGGGGA	TGATTTATGC
<i>Cosmocerca</i> sp.
<i>Itzocanensis</i> A	T..A..A..T	..T.G....	.T.....	..T..C..GA..A.	..G.C..C..
<i>Itzocanensis</i> B	T..A..A..T	..T.G....	.T.....	..T..C..GA..A.	..G.C..C..
<i>Itzocanensis</i> C	T..A..A..T	..T.G....	.T.....	..T..C..GA..A.	..G.C..C..
<i>Incerta</i> A	T..A..G..T	..T.A....	.T.....	..T....AA..A.	..G.....
<i>Incerta</i> B	T..A..G..T	..T.A....	.T.....	..T....AA..A.	..G.....
<i>Incerta</i> C	T..A..G..T	..T.A....	.T.....	..T....AA..A.	..G.....
<i>Incerta</i> D	T..A..G..T	..T.A....	.T.....	..T....AA..A.	..G.....
<i>Incerta</i> E	T..A..G..T	..T.A....	.T.....	..T....AA..A.	..G.....

	130	140	150	160	170	180
<i>Cosmocerca</i> sp.	TATTTTGAGT	ATCGGGGTA	TTGGTTGTGT	GGTTTGGGCT	CACCATATGT	ATACAGTGGG
<i>Cosmocerca</i> sp.	A.....
<i>Itzocanensis</i> AA..A	..T..TTTG	T.....C.....A..
<i>Itzocanensis</i> BA..A	..T..TTTG	A.....C.....A..
<i>Itzocanensis</i> CA..A	..T..TTTG	T.....C.....A..
<i>Incerta</i> AA..A	..T..TTTA	T.....	..T.....A..
<i>Incerta</i> BA..A	..T..TTTA	T.....	..T.....A..
<i>Incerta</i> CA..A	..T..TTTA	T.....	..T.....A..
<i>Incerta</i> DA..A	..T..TTTA	T.....	..T.....A..
<i>Incerta</i> EA..A	..T..TTTA	T.....	..T.....A..

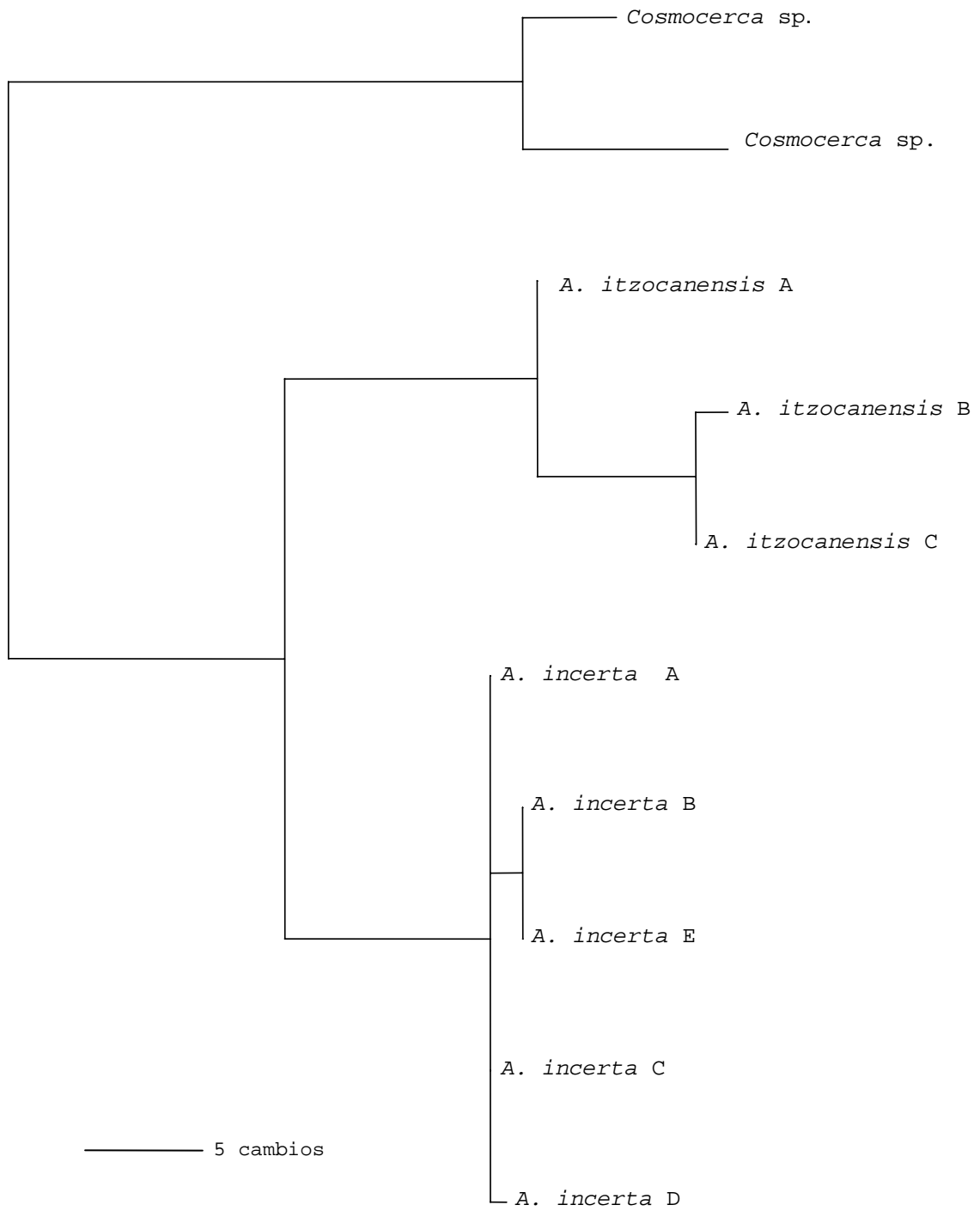
Apéndice 1. Alineamiento de las secuencias del gen mitocondrial COI de las especies *Aplectana itzocanensis* y *A. incerta*, y *cosmocerca* sp. Los puntos indican los mismos nucleótidos.

	190	200	210	220	230	240
<i>Cosmocerca</i> sp.	GATGGACTTG	GATAGCCGAG	CTTATTTAC	TGCTGCCACT	ATGGTGATTG	CTGTTCCCTAC
<i>Cosmocerca</i> sp.A.....
<i>Itzocanensis</i> A	T....T... ..CT..T.T..	A..A..G...C..C..		
<i>Itzocanensis</i> B	T....T... ..CT..T.T..	A..A..G...C..C..		
<i>Itzocanensis</i> C	T....T... ..CT..T.T..	A..A..G...C..C..		
<i>Incerta</i> ATC.. ..C...T.T..	A..A..T...	..A..A....C.....	
<i>Incerta</i> BTC.. ..C...T.T..	A..A..T...	..A..A....C.....	
<i>Incerta</i> CTC.. ..C...T.T..	A..A..T...	..A..A....C.....	
<i>Incerta</i> DTC.. ..C...T.T..	A..A..T...	..A..A....C.....	
<i>Incerta</i> ETC.. ..C...T.?	A..A..T...	..A..A.???C.???	

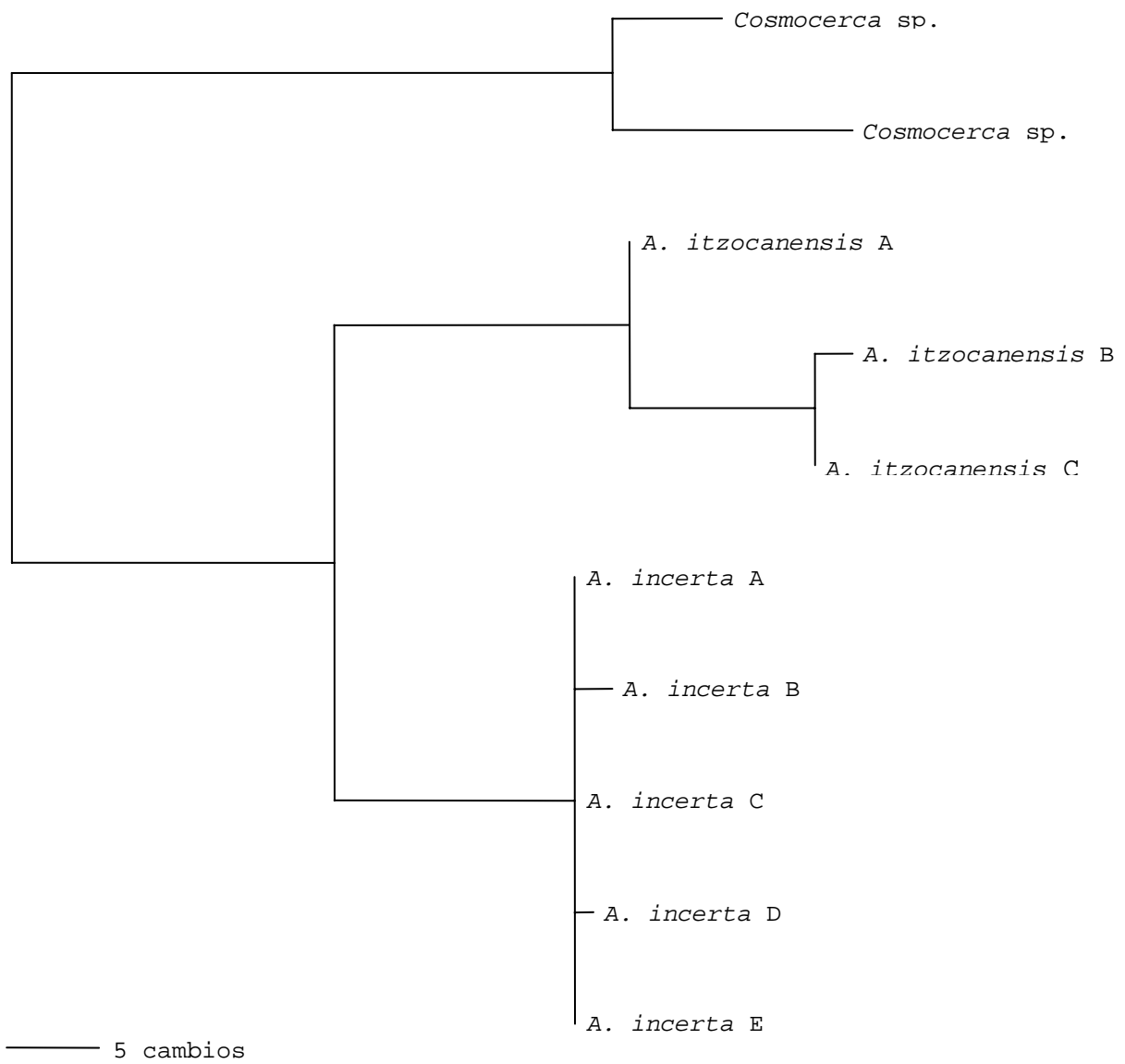
	250	260	270	280	290	300
<i>Cosmocerca</i> sp.	TGGGGTGAAG	GTTTTTAGCT	GGTTAGCTAC	TTTGTACGGT	ACTGTTATAA	CTAATCAGCC
<i>Cosmocerca</i> sp.	A.....TA..A.....G	
<i>Itzocanensis</i> A	A..A..A..AT.A.T...G	.TGAA.....	T.TT.....
<i>Itzocanensis</i> B	A..A..A..AT.A.T...G	.TGAA.....	A.TT.....
<i>Itzocanensis</i> C	A..A..A..AT.A.T...G	.TGAA.....	T.TT.....
<i>Incerta</i> A	A..A..A..AT.	.A.....TT..A	.TAAA...G.	T.TT.....
<i>Incerta</i> B	A..A..A..AT.	.A.....TT..A	.TAAA...G.	T.TC.....
<i>Incerta</i> C	A..A..A..AT.	.A.....TT..A	.TAAA...G.	T.TT.....
<i>Incerta</i> D	A..A..A..AT.	.A.....TT..A	.TAAA...G.	T.TT.....
<i>Incerta</i> E	A..A..A..AT.	.A.....??..A	.TAAA...G.	T.???.

	310	320	330	340	350	
<i>Cosmocerca</i> sp.	TCTGTTATTG	TGGATTCTGG	GTTTTATTTT	TTTATTACT	ATCGGTGGCC	TAA
<i>Cosmocerca</i> sp.	.G.....	G....GGT.	.GG..T????	??????????	??????????	???
<i>Itzocanensis</i> A	.T.A.....	...G..T.A.CG..AT	...
<i>Itzocanensis</i> B	.T.A.....	G..G.C....	.G..C..AAG	G.....C	??????????	???
<i>Itzocanensis</i> C	.T.A.....	G..G.C....	.G..C.????	??????????	??????????	???
<i>Incerta</i> A	.T.A.....	...G..T.A.T.....GT	.G.
<i>Incerta</i> B	.T.A.....	...G..T.A.t.....GT	CG.
<i>Incerta</i> C	.T.A.....	...G..T.A.T.....GT	.G.
<i>Incerta</i> D	.T.A.....	...G..T.A.T.....GT	.GT
<i>Incerta</i> E	.T.A.?????	??????????	??????????	??????????	??????????	???

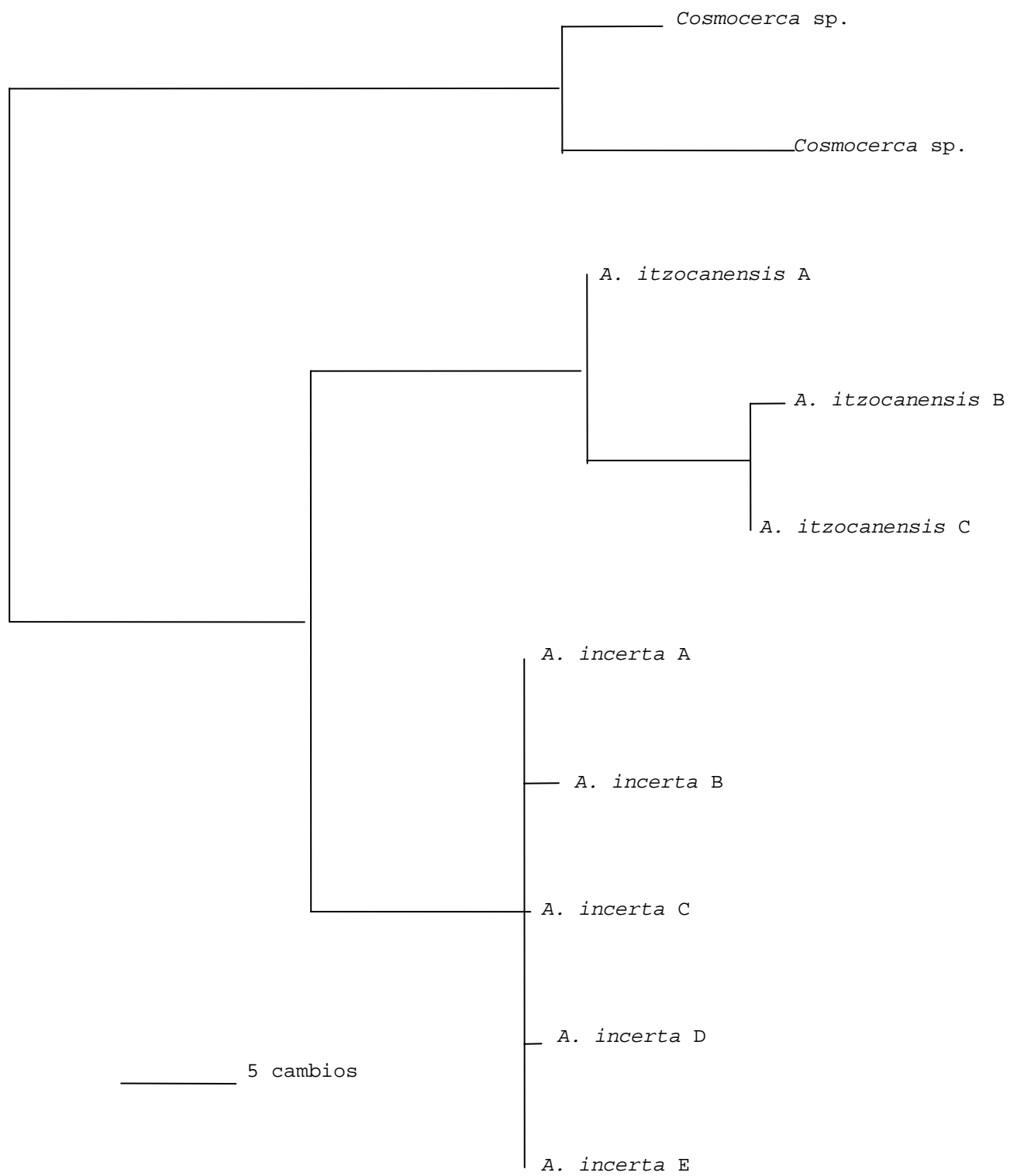
Apéndice 1. (Continuación).



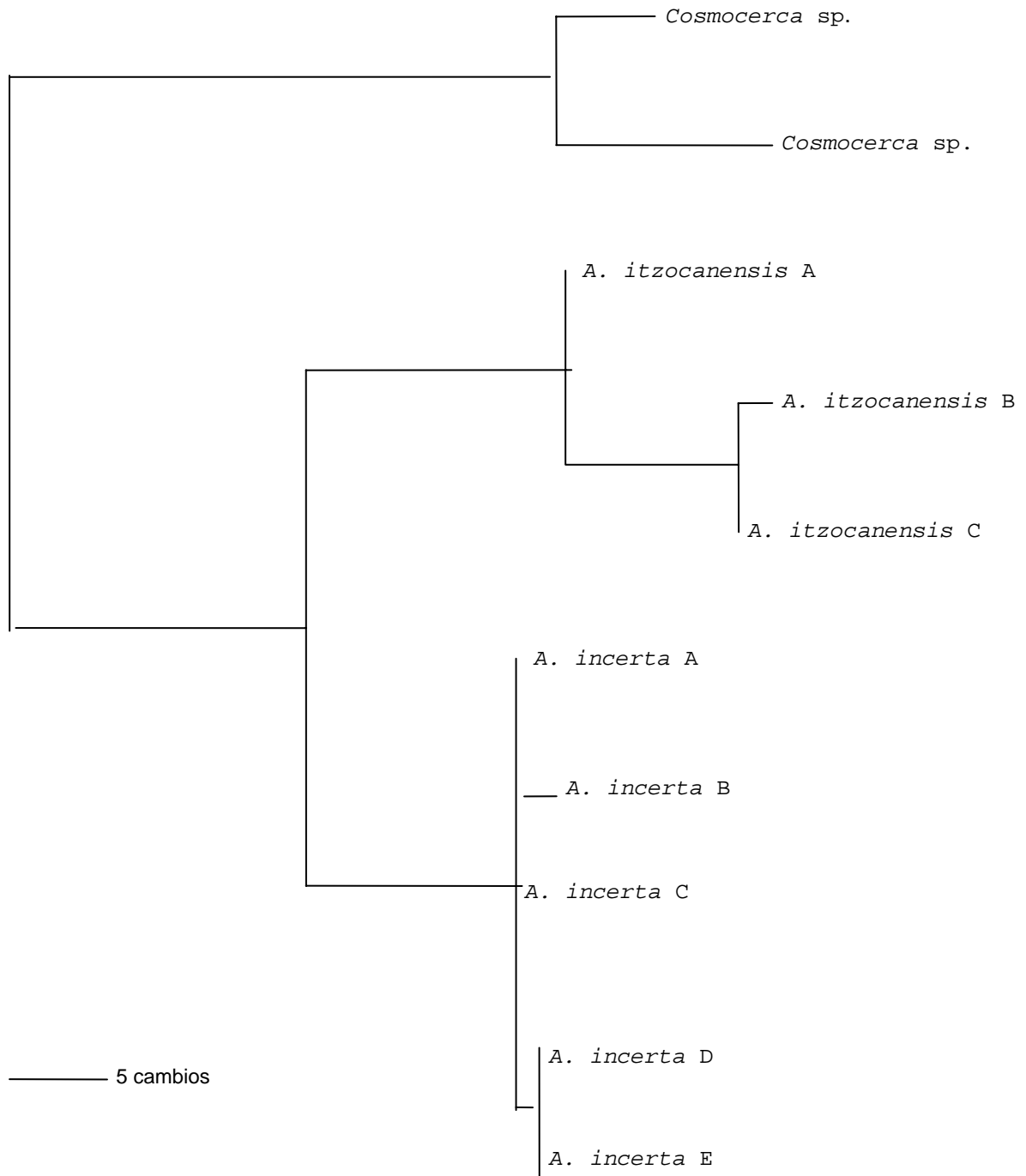
Apéndice 2. Se muestran los cuatro árboles más parsimoniosos del gen mitocondrial COI de las especies *Aplectana itzocanensis*, *A. incerta* y *Cosmocerca* sp (grupo externo).



Apéndice 2. (Continuación).



Apéndice 2. (Continuación).



Apéndice 2. (Continuación).