



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

VARIACIÓN GENÉTICA DE *NEOECHINORHYNCHUS GOLVANI*

(ACANTHOCEPHALA: NEOECHINORHYNCHIDAE)

EN MÉXICO BASADO EN SECUENCIAS DE GENES NUCLEARES

(ITS1, 5.8S, ITS2 Y DE LA REGIÓN D2-D3 DEL 28S RNA RIBOSOMAL)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS  
(S I S T E M Á T I C A)**

P R E S E N T A

**ANDRÉS MARTÍNEZ AQUINO**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA

MÉXICO, D. F.

Octubre, 2008



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Nuevamente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo económico otorgado por la impresión de tesis; así como por el apoyo otorgado para mi asistencia a los congresos: X Congreso Nacional de Ictiología. Santiago de Querétaro, Querétaro, México (2006), From Alaska to Chiapas: The first North American Parasitology Congress. Yucatán, México (2007) y The 83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Parasitologists, Arlington, Texas, U.S.A..

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el período 2006-2008.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos PAPIIT-UNAM No. IN206906 y CONACyT-No. 52185 a cargo del Dr. José Martín García Varela.

Este trabajo contó con la asesoría del Comité Tutoral conformado por:

Dr. José Martín García Varela

Dra. Blanca Hernández Baños

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León.

A los miembros del Jurado:

Dr. Juan José Morrone Lupi

Dr. Ulises Razo Mendivil.

**PARA MI AMOROSA FAMILIA**

**Mardo Martínez, Juanita Aquino,**

**Yerita,**

**Koko y Mariana**

*Quienes me alientan a ser...*

**Para Ana**

*(love me)*

Es un hecho.  
Teóricamente es imposible construir una *maquina del tiempo*,  
pero, hipotéticamente,  
podemos viajar en él  
a través de la reconstrucción de un árbol filogenético...

**Martínez-Aquino A. Un viaje *en proceso*.**

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Martín García Varela se atrevió a darme *Una Oportunidad* para trabajar y colaborar en su laboratorio.

Dra. Blanca Hernández Baños fue parte de mi comité tutorial de maestría, profesora de mi clase de Sistemática Filogenética y además parte de mi comité de entrevista para el ingreso a la maestría.

Gerardo Pérez Ponce de León supo ayudar en gran parte este trabajo en todos los sentidos. Buena onda ☺

Dr. Juan José Morrone Lupi revisó velozmente mi trabajo de tesis así como mi manuscrito para su publicación.

Dr. Ulises Razo Mendivil recolectó gran parte del material aquí analizado y aportó en gran medida para que este trabajo se llevara a cabo.

### ***Colegas de atrás tiempo***

Rogelio Aguilar Aguilar: *anywhere, anytime, in fact*, colega en cualquier lugar, amigo en cualquier tiempo. Ser, hacer y tener. Cuál será la plataforma a abordar y cuál el libro a redactar...

Raúl Contreras Medina, colega panbiogeohelminbotánicomolecularpaesco escuchó parte de mi primer proyecto de investigación, después, todo cambio...

### ***Ex's-nueva camada***

Carlos A. Mendoza Palmero y Mirza P. Ortega Olivares. Una plesiomorfía nos une, buena onda colegas, gracias por estar justo en el momento indicado.

### **Colegas del cubículo-lab C-102**

Francisco Javier Alcántar *la novela* y Violeta Quintero compartieron parte de la vida de los *clock counters*.

### **Personal fundamental**

Indiscutiblemente las siguientes personas fueron elementales para realizar este proyecto:

Dr. Jesús Montoya Mendoza donó material de *N. golvani* (linaje 2) de Alvarado, Ver. Además, ayudó generosamente en la organización de varias expediciones en busca de helmintos parásitos de emplumados y quelonidos. Buena onda *Doc* Chucho Montoya!!!

Rogelio Rosas Valdez recolectó gran parte del material aquí analizado. Aportó importantes críticas y cuestionamientos epistemológicas y ontológicos al NO dogmatismo de la biología

evolutiva y de la sistemática molecular de los centinelas de la historia organismica. Buenas líricas.

M. en C. Oscar Méndez ayudó en parte de este proyecto desinteresadamente. Buena onda.

### **Cooperativas de pescadores**

En México existen miles de familias de pescadores. Durante su trayecto paralelo a las costas y dentro de sus aguas interiores, colosales hombres trabajan a flor de sol pescando los mounstros acuáticos. Ríos, arroyos, manantiales, cenotes, presas, lagos, lagunas, marismas y mares, son el abrigo de la gente local. Comunidades indígenas y criollas simbióticamente imperan en el escenario mágico de las aguas mexicanas. A ellos infinitas gracias por mostrarme su cosmovisión del agua y sus secretos que oculta.

### **Biblioteca del Instituto de Biología, UNAM**

A sus grandiosos bibliotecarios Miguel, Rosa María y a Gina, así como a la Sra. Alicia (multicopista).

### **A mis colegas del IE, UNAM**

Rene 4, Fabricio Villalobos, Checo, Pablo Gesundheit, seguimos de pie biólogos *warriors!!!*

### **A mi gente del grupo de sistemática filogenética 2007-I**

Sandyhongy, Clarita, Oscurita, Carlos, Omar y Rica. Qué grupo tan excepcional, tan humano, tan Facultad de Ciencias más una *burrita* que deja en claro que la Universidad no tiene fronteras... Buena vibra amigos!

### **Juebebes**

Rodri Medel-Nadia, Ani Medel-Andrea (*Chego*), Tops (alias el *troll*), Nuche-Ann, qué momentos tan agradables amigos ☺

### **H. H. Consejo Interno**

Aquellos quienes siempre serán mis amigos, PASE LO QUE PASE: Punk, por tus palabras tan concretas y tu aparición siempre en los momentos indicados, de huevos!!!; Casco, por tus lustrosos viajes *hippie buena onda*; Karlita *Butterflye*, por trasmitirme que es mucho mucho mucho mejor vivir un sueño que soñarlo; Mutito, epistemológicamente reflexionó conmigo sobre pirámides sureñas, la cosmovisión del mundo surreal es el *buffer* de la vida ¶ *San Cristobal la vibra positiva* ¶; Tri, buen amigo, buen hermano, estuvo incondicionalmente, como siempre, cada vez que lo requería, especiales gracias; Mi Dany, la nueva H. H. C. I. rejuveneció, aunque no lo crean a esta sociedad. Buen viaje amigos ☺



## Reconocimientos especiales

Rocío Acosta ayudó en TODOS mis trámites burocráticos durante mi estancia de maestría y resolvió TODAS mis dudas con una gran sonrisa y amabilidad, a la cuál le estoy eternamente agradecido.

Don Otilio ayudó en la toma de datos de las tortugas recolectadas en Nayarit.

Ariel entabló charlas *relax* por más 350 mañanas que parecían ser interminables. Por cierto, felicidades por nuevo cargo.

Rodolfo Salas supo charlar conmigo como en mi primer día de clases en la Facultad de Ciencias, UNAM. Buena vibra!!!

Rodolfo Pérez, *silvestre, independent*, buen viaje carnal.

Fernanda Fosas (*Double F*) demostró la analogía entre el baile y la vida.

Andrea Johana Roth Monzón (*NPM*), aportó locura cuando, aunque parezca mentira, me faltaba.

Itziar Rebollar (*Diosa*) supo comprender parte de mi viaje.

Mis alumnos de los grupos de Sistemática 5074 2006- II y 5084 2007-II; Biogeografía I 5111-2006-II y 5116 2007-II; Biogeografía II 5349 2009-I y Ecología de Parásitos 5359 2009-I, supieron comprender mi ausencia en *muchas* clases con el fin de completar este proyecto.

Pablo Piña, Alvin la ardilla, Ángel Arontes (lagrimita), Peter, Resort, Pillo y a todos ellos que por ahora no están cerca físicamente, más los más de 100 que estoy seguro que me faltan y que no he colocado en este papel por simples cuestiones logísticas, nuevamente ya saben cuántos y quienes son ustedes, amigos!!!

## BIOSKETCH

**Andrés Martínez Aquino** (*Dragón*, 2008) syn. *guerrero*, 2005 ha generado en los últimos tres años cinco *papers* en su revista *The International Journal of Cabulation* (ver Aguilar-Aguilar, 2005; Benitez-Insunza, 2005 *versión ponencia PP*; Contreras-Medina, 2006 *versión en línea*; Pompa-Mancilla, 2007; Camacho-Rico, 2008). Una de sus cábulas más brillantes (enero, 2007) fue generar un cenocrón (dispersión en manada ante un evento catastrófico) desde su centro de origen helmintológico, causando este proceso la locura total de un “académico”. Por este tipo de acciones, se ha considerado a éste estudiante como *rebelde, idealista y radical* (cosa que a él mismo le causa mucho orgullo y felicidad©). Dragón no se deja engañar por charlatanes ni aficionados a la ciencia, de hecho su antepenúltima pregunta profunda formulada *¿por qué hacer un doctorado?* lo tiene actualmente en un *trip* evolutivo personal (ver pensamiento del presente trabajo para calcular niveles). Si requiere más información, en cuanto a esto se refiere, puede redactar a: [seulresearch@yahoo.com.mx](mailto:seulresearch@yahoo.com.mx).

## CONTENIDO

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>RESUMEN</b> .....                                                                                                     | 1  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                                                    | 3  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                                                                                | 5  |
| Especies crípticas en helmintos parásitos.....                                                                           | 5  |
| Marcadores moleculares.....                                                                                              | 7  |
| <i>Neoechinorhynchus golvani</i> Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala:<br>Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae)..... | 9  |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....                                                                                               | 17 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                                                                                                   | 18 |
| <b>MANUSCRITO</b> .....                                                                                                  | 19 |
| Abstract.....                                                                                                            | 20 |
| Introduction.....                                                                                                        | 21 |
| Material and methods.....                                                                                                | 23 |
| Results.....                                                                                                             | 27 |
| Discussion.....                                                                                                          | 30 |
| Acknowledgements.....                                                                                                    | 34 |
| Literature cited.....                                                                                                    | 35 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....                                                                                                | 50 |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....                                                                                                | 52 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....                                                                                                 | 53 |
| <b>APÉNDICE</b> .....                                                                                                    | 66 |

## RESUMEN

Este trabajo aborda la variación genética interpoblacional del acantocéfalo *Neoechinorhynchus golvani*, el cual tiene un área de distribución amplia y fragmentada asociada con peces dulceacuícolas y de aguas salobres. Los individuos de esta especie presentan una amplia gama en cuanto a su tamaño; sin embargo, los caracteres diagnósticos de *N. golvani* (proboscis subcilíndrica recubierta con 18 ganchos dispuestos en tres hileras horizontales de seis ganchos en cada una), son idénticos en los individuos de las poblaciones muestreadas.

Dada la amplia distribución de *N. golvani* y el hecho de que tiene al parecer una baja especificidad hospedatoria (ya que se ha registrado asociado a 40 especies de peces de 11 familias), proponemos que este acantocéfalo es un excelente modelo para realizar un estudio de prospección molecular para detectar especies crípticas. Por tanto, se planteó el objetivo de detectar la variación genética entre las poblaciones de *N. golvani* en su área de distribución.

Se estudiaron ejemplares de 13 poblaciones del acantocéfalo distribuidas en México y una en Costa Rica, usando como marcadores moleculares dos genes nucleares (ITS1, 5.8S, ITS2 y región D2-D3 del 28S del rDNA). El promedio de las divergencias genéticas de las poblaciones se estimó a través del método de Jukes-Cantor. Los análisis filogenéticos para cada gen y el combinado de ambos (ITS's + 28S) se infirieron a través de los métodos de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.

Con base en los porcentajes de las divergencias genéticas entre los individuos, más los árboles filogenéticos inferidos a través de caracteres moleculares, detectamos la existencia de cuatro clados que representan cuatro linajes con evolución independiente. El porcentaje de la divergencia genética de los cuatro clados de *N. golvani* osciló entre los 30-40% para ITS's y 19% para 28S.

El linaje 1, asociado con peces de la familia Cichlidae, se distribuye al noreste y sureste de México, y en Costa Rica. Este linaje presenta una variación genética interpoblacional de 1.6% con ITS's y 1.4% para 28S.

Los linajes 2 y 3, distribuidos en sistemas hidrológicos del Pacífico y del Golfo de México, respectivamente, se asocian con peces de la familia Eleotridae. La divergencia genética entre ambos linajes es del 15%. Los linajes 2 y 3 presentaron una variación genética interpoblacional de 0.6% (ITS's) y 0.09% (28S) y, 0.33 (ITS's) y 0.09 (28S), respectivamente. Estos porcentajes de divergencia genética más la posición filogenética de estos linajes sugieren la ausencia de flujo génico debido a su aislamiento geográfico.

El linaje 4, asociado al cíclido *Petenia splendida*, distribuido en el río Champotón, Campeche está ubicado en la posición basal de los árboles filogenéticos. Este linaje está representado por un solo individuo, por tanto, se sugiere recolectar más muestras de poblaciones distribuidas en el río Champotón, preferentemente sobre las tierras bajas del sureste mexicano debido a su relación histórica compartida con éste río. De este modo, se podría apoyar o rechazar la hipótesis de que este linaje representa una especie críptica.

Es posible que las asociaciones Cichlidae-*N. golvani* (linaje 1) y Eleotridae-*N. golvani* (linaje 2 y 3) representen eventos de *host-switching*; mientras que las asociaciones observadas entre *N. golvani* y las otras nueve familias de peces (Ariidae, Belonidae, Centropomidae, Gerridae, Goobidae, Hemiramphidae, Heptapteridae, Ictaluridae y Lutjanidae) se deban a eventos de *host-sharing* o infecciones accidentales.

Al parecer el complejo de especies crípticas de *N. golvani* es el resultado de la historia evolutiva de los huéspedes, aunque los eventos vicariantes de las regiones en donde se distribuye esta especie juegan un papel relevante.

## ABSTRACT

The interpopulation genetic variation of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus golvani* is herein studied. This species exhibits a wide and fragmented distribution and is associated to freshwater and brackish fishes. Specimens of *N. golvani* show some morphological variation in terms of body size, however, diagnostic characters (subcylindric proboscis armed with 3 longitudinal rows with 6 hooks each) are apparently similar among individuals from all populations, irrespective to their size.

The wide distributional area of *N. golvani* and the fact that it exhibits a low host-specificity (it has been found in 40 species of fishes from 11 families) makes this acanthocephalan an excellent model to conduct a molecular prospecting analysis, since their populations may represent independent lineages as a result of a genetic variation due to geographical isolation and suppression of genetic flow. The main objective of the present research was to estimate the genetic divergence along the distributional area of some populations of *N. golvani*.

Molecular prospecting was conducted in individuals from 13 populations of the acanthocephalan distributed in Mexico, and one in Costa Rica, by using two nuclear genes (ITS's and domain D2 + D3 of LSU rDNA). The genetic divergences among populations were estimated through Jukes-Cantor method. Phylogenetic analyses from each dataset and the combined of both datasets (ITS's + LSU rDNA) were conducted with Maximum Likelihood and Maximum Parsimony approaches.

The results of genetic divergence in addition to the phylogenetic trees suggested that the acanthocephalan *N. golvani* represent a complex of cryptic species composed at least by 4 lineages (clades) with an independent evolutionary history. The genetic divergence among

populations of four lineages of *N. golvani* ranged from 31 to 35 % with LSU, and from 38 to 40 % with ITS's.

The first lineage shows a large distribution, including localities from Northeastern Mexico, southwards through Central and Southeastern Mexico, to Costa Rica, corresponding with *N. golvani sensu stricto*. Interpopulation genetic variation in this lineage was low, 1.6% with ITS's and 1.4% from LSU. This lineage is associated with fishes belonging to the family Cichlidae.

Lineages 2 and 3 are distributed along of the Gulf of Mexico and Pacific slopes, respectively, and both are associated to fishes of the family Eleotridae and apparently also represent a cryptic species. Genetic divergence between two lineages was 15%. Whereas intrapopulation genetic divergence was even lower, 0.6% (ITS's) and 0.09% (LSU) and, 0.33 (ITS's) and 0.09 (LSU), for clade 2 and 3, respectively.

Lineage 4 is found exclusively along the Champoton River basin, in the lowlands of southeastern Mexico and is also considered to be a cryptic species.

Interactions between Cichlidae-*N. golvani sensu stricto* (lineage 1) and Eleotridae-*N. golvani* (lineage 2 and 3), seems to support the contention of a host-switching event. Interactions among *N. golvani* with others 10 families of fishes (Ariidae, Belonidae, Centropomidae, Gerridae, Goobidae, Hemiramphidae, Heptapteridae, Ictaluridae and Lutjanidae), possibly represent a host-sharing event or accidental infection.

The diversification of the 4 major lineages seems to be the allopatric speciation processes caused by several microvicariant events closely tied to the evolutionary history of their hosts.

## INTRODUCCIÓN

### **Especies crípticas en helmintos parásitos**

Históricamente el concepto de *especie* ha sido discutido por varios autores debido a la diversidad de formas en las que se ha expresado la vida orgánica (v. gr. Mayden 1997, 1999; también ver referencias ahí citadas). Sobre el marco teórico de la biología evolutiva, es importante delimitar correctamente a una especie para detectar los procesos, patrones y mecanismos evolutivos que las afectan (Sites y Marshall 2003). Con base en conceptos operacionales (v. gr. concepto de especie taxonómica) y conceptos teóricos (v. gr. concepto de especie evolutiva) se han reconocido linajes (v. gr. aislamiento reproductivo, características ecológicas, monofilia, genealogía), capaces de inferir límites entre las especies (Mayden 1997; De Queiroz 1998; Sites y Marshall 2003; Miura *et al.*, 2005). Sin embargo, en estudios recientes utilizando diferentes metodologías para delimitar a las especies se ha detectado una subestimación de la biodiversidad debido a la existencia de complejos de especies crípticas (Brooks y Hoberg 2000; Poulin y Morand 2004; Bensch *et al.*, 2004; Westenberger *et al.*, 2004). Un complejo de especies crípticas (*sibling species*) (Mayr 1991; Knowlton 1993; Miura *et al.*, 2005; Palm *et al.*, 2007) es un grupo de linajes que son morfológicamente muy similares, pero genéticamente distintos (Mayden 1999; Criscione *et al.*, 2005).

Algunos autores han propuesto que a partir de la prospección molecular (*molecular prospecting*) se puede inferir la presencia de especies crípticas o de poblaciones de una misma especie (Blouin 2002; Criscione *et al.*, 2005; Vilas *et al.*, 2005). Con base en secuencias de DNA, las especies crípticas pueden ser delimitadas debido al alto porcentaje de divergencia en las distancias genéticas entre los individuos analizados (v. gr. a nivel de población o de especie), o si

se detecta evidencia de grupos con monofilia recíproca en muestras poblaciones grandes (v. gr. poblaciones con área de distribución amplia). En términos de prospección molecular, Vilas *et al.* (2005) propusieron dos pasos para detectar especies crípticas:

1. Análisis de exploración de datos para generar una hipótesis, la cual requiere observar la evidencia de que las especies crípticas están presentes (v. gr. individuos con alto porcentaje de divergencia genética).
2. La delimitación de especies, que sugiere poner a prueba la hipótesis de ausencia de flujo génico o exclusividad del linaje a través de la recolección de muestras y el uso de marcadores moleculares.

La prospección molecular permite detectar complejos de especies crípticas en helmintos parásitos a partir de divergencias genéticas sustentados en que cada uno de los linajes detectados representa una historia evolutiva independiente y ausencia de flujo génico (Blouin 2002; Criscione *et al.*, 2005; Vilas *et al.*, 2005). Sin embargo, la evolución de un complejo de especies crípticas parasitas puede interpretarse a través de la inferencia empírica de la biología de los organismos parásitos. Por ejemplo, se han detectado especies crípticas de parásitos como el resultado de los siguientes fenómenos biológicos: el requerimiento (nivel ecológico de especificidad hospedatoria: oioxenoeco, estenoeco o eurieco) y condiciones (probabilidad de encuentro parásito-huésped) del parásito por su huésped (Reversat *et al.*, 1989); la alternancia de generaciones entre los huéspedes definitivos e intermediarios, así como los hábitos alimenticios (especialistas) de los huéspedes definitivos (Jousson *et al.*, 2000); la diferencia en el grado de patogenicidad y epidemiología de un parásito, así como una mayor susceptibilidad por un huésped (Murrell y Pozio 2000; Homan y Mank 2001); el aislamiento geográfico (especies crípticas con área de distribución amplia y fragmentada o disyunta) (Kráľ'ová-Hromadová *et al.*,



2003; O'Mahony *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2005; Palm *et al.*, 2007); la ecología de poblaciones de los huéspedes intermediarios en función de condiciones y recursos ambientales locales (Donald *et al.*, 2004); el rango amplio de parasitismo (múltiples huéspedes) en distintos tipos de ambientes (hábitats) en los que se distribuyen los huéspedes (Vilas *et al.*, 2005); la especificidad hospedatoria de grupos de huéspedes estrechamente relacionados filogenéticamente y por el tipo de hábitat en el que se distribuyen (Steinauer *et al.*, 2006, 2007); y la estacionalidad del parásito en función de la longevidad y área de distribución del huésped (Marques *et al.*, 2007). En algunos casos, la presencia de especies crípticas simpátricas ha dado como resultado cambios conductuales aún en la misma especie de huésped intermediario (Perrot-Minnot 2004). Por tanto, reconocer el papel de los factores que intervienen durante la evolución de un complejo de especies crípticas no solo debe de limitarse a evidencia sustentada en divergencias genéticas, sino también debe considerarse la biológica del organismo.

### **Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son biomoléculas que aportan información genética en términos genealógicos (Avice 2004). Las proteínas (v. gr. antígenos, isoenzimas, aloenzimas) o fragmentos de DNA (v. gr. genes nucleares o mitocondriales) funcionan como *señales* de diferentes regiones del genoma (Simpson 1997; Picca *et al.*, 2002; Avice 2004). Un marcador molecular detecta variación entre individuos de una población y presenta un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel (Picca *et al.*, 2002). Esta variación puede considerarse a diferentes niveles, desde cambios fenotípicos heredables hasta la variación de un solo nucleótido. Un marcador molecular ideal debe ser altamente polimórfico dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de

rápida identificación y simple análisis y, de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de un organismo (Simpson 1997; Picca *et al.*, 2002; Avise 2004). Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en tres grupos: 1. Marcadores con base en la hibridación del DNA, v. gr. polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción del DNA (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*); 2. Marcadores con base en la amplificación del DNA, v. gr. fragmentos de genes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa del DNA (PCR, *polymerase chain reaction*); 3. Marcadores mixtos, v. gr. polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de DNA, pueden considerarse como una combinación de RFLP y RAPD's (Simpson 1997; Picca *et al.*, 2002; Avise 2004; Rentarúa-Alcántara 2007).

Para delimitar especies crípticas en helmintos parásitos se han utilizado marcadores moleculares como los genes mitocondriales (v. gr. Macnish *et al.*, 2002; Bensch *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2005; 2006; Grillo *et al.*, 2007) y nucleares del RNA ribosomal (rRNA) (ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S) (v. gr. Luton *et al.*, 1992; Adlard *et al.*, 1993; Bowles *et al.*, 1995; Després *et al.*, 1995; Morgan y Blair 1995; Guo-Chiuan *et al.*, 1996; Verneau *et al.*, 1997a, b; Jousson *et al.*, 1998, 2000; Bell *et al.*, 2001; Blouin 2002; Luo *et al.*, 2002, 2003; Macnish *et al.*, 2002; Král'ová-Hromadová *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2005; Vilas *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2007; Steinauer *et al.*, 2007), entre otros, debido a que estos genes muestran una alta tasa de mutación en sus secuencias nucleotídicas y evolución concertada, es decir, sus secuencias nucleotídicas evolucionan en conjunto (Garey y Wolfstenholme 1989; Hillis y Dixon, 1991).

Para detectar especies crípticas en helmintos parásitos, se han desarrollado diferentes análisis sobre el marco teórico de la filogeografía, de la genética de poblaciones y de los análisis filogenéticos, entre otros (v. gr. Criscione y Blouin 2004; Nieberding *et al.*, 2004; Steinauer *et al.*, 2007). En diferentes linajes de helmintos (v. gr. tremátodos y nemátodos) se han detectado

porcentajes de divergencia genética similares a nivel de especie, incluyendo complejos de especies crípticas en secuencias del DNA mitocondrial (Blouin 2002); sin embargo, en acantocéfalos el porcentaje de divergencia genética detectado entre especies y complejo de especies crípticas, aparentemente no presentan valores estándar capaces de discernir entre una especie y otra (v. gr. Král'ová-Hromadová *et al.*, 2003; Steinauer *et al.*, 2007). Por ejemplo, utilizando las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 como marcador molecular en 10 especies del género *Corynosoma* Lühe 1904 se detectó una variación genética de 0.4-11% entre especies (García-Varela *et al.*, 2005); en contraste, la divergencia genética entre especies crípticas de *Leptorhynchoides thecatus* Linton 1891 osciló entre el 1-8% (Steinauer *et al.*, 2007). Dos ejemplos más de contraste en términos de divergencia genética, utilizando ambos el mismo marcador molecular (ITS's) en especies del género *Pomphorhynchus* Monticelli 1905, presentan una variación genética interpoblacional de 10% en especies alopátricas (Král'ová-Hromadová *et al.*, 2003), mientras que el complejo de especies crípticas simpátricas de *Pomphorhynchus laevis* Müller 1776 presentan una variación genética de 20% (Perrot-Minnot 2004).

***Neoechinorhynchus golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae)**

El género *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall 1905 se ubica filogenéticamente en la familia Neoechinorhynchidae Ward 1917, la cual esta clasificada en la clase Eoacanthocephala Van Cleave 1936 (Amin 1985; Near *et al.*, 1998; García-Varela *et al.*, 2000; Monks 2001; Near 2002). *Neoechinorhynchus* es uno de los géneros más diversos del phylum Acanthocephala con 91 especies descritas distribuidas en todo el mundo, de las cuales 63 son parásitas intestinales de

peces dulceacuícolas, 13 de peces marinos, 10 de tortugas y una de anfibios (Bullok 1970; Amin 2000, 2002; Amin *et al.*, 2003; Barger *et al.*, 2004; Amin y Christison 2005).

Las especies del género *Neoechinorhynchus* se caracterizan por presentar una proboscis pequeña, globular o subcilíndrica, armada con 18 ganchos dispuestos en tres hileras horizontales de seis ganchos cada una, o en seis filas espirales de tres ganchos cada una, un receptáculo de la proboscis, ganglio cerebral ubicado en la base del receptáculo de la proboscis, un tronco sin espinas, con una sola pared muscular; adicionalmente, los machos presentan una sola glándula de cemento sincicial (Amin 2002). Amin (2002) sugirió que el género *Neoechinorhynchus* está dividido en dos subgéneros: *Hebesoma* Van Cleave 1928 y *Neoechinorhynchus* Stiles y Hassall 1905, con base en un solo carácter morfológico (forma de los huevos); sin embargo, la carencia de un análisis filogenético del género *Neoechinorhynchus* deja esta sugerencia taxonómica como una hipótesis que debe ponerse a prueba en futuros estudios.

El ciclo de vida de los neoechinorhínchidos ha sido poco estudiado (Schmidt 1985; Kennedy 2006); sin embargo, se sabe que el ciclo de vida de un Eoacanthocephala es indirecto y siempre se asocia con un artrópodo como huésped intermediario (crustáceo). Las formas adultas sexualmente maduras habitan el intestino de varios tipos de vertebrados (v. gr. peces, tortugas, anfibios), las hembras liberan huevos al medio acuático a través de las heces del huésped. Los huevos son ingeridos por el crustáceo, en el cual se desarrollan tres fases larvarias en este orden: acantor, acantela y cistacanto o fase infectiva. Al ser ingerido el crustáceo con esta fase infectiva por el huésped definitivo el ciclo de vida es completado (Fig. 1) (Schmidt 1985, 1988; Kennedy 2006).

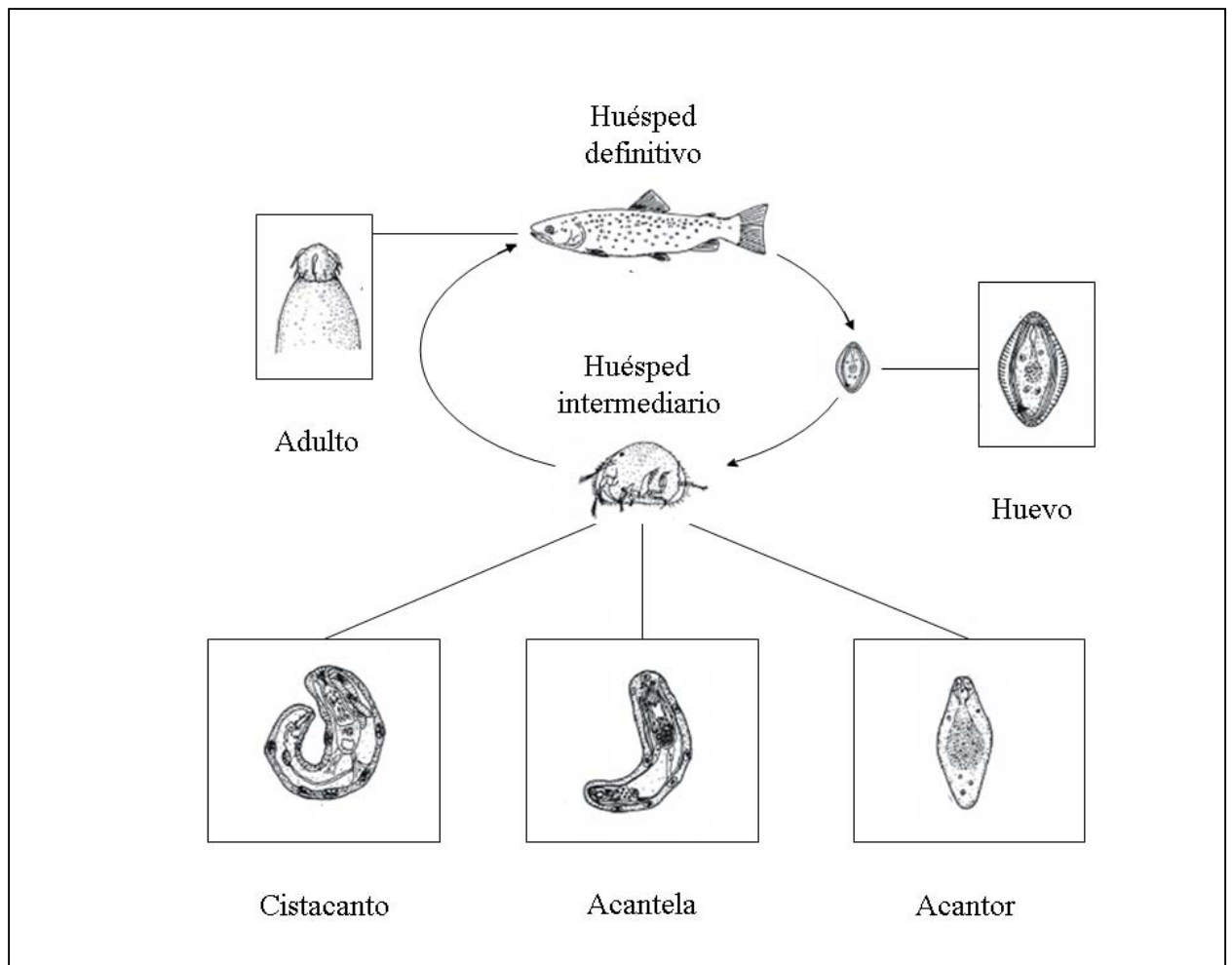


Figura 1. Ciclo de vida de *Neoechinorhynchus rutili* (Müller 1780) Stiles y Hassall 1905.

Tomado y modificado de: [www.parasitology.informatik.uniwuerzburg.de/login/n/h/0934.html](http://www.parasitology.informatik.uniwuerzburg.de/login/n/h/0934.html).

En México se han registrado cuatro especies del género *Neoechinorhynchus*: *N. emyditoides* Fisher, 1960 y *N. schmidti* Barger, Thatcher y Nickol, 2004 asociadas a tortugas; *N. roseum* Salgado-Maldonado, 1978, que parasita el intestino de peces estuarinos y; *N. golvani* Salgado-Maldonado, 1978 asociada con peces dulceacuícolas y estuarinos (Amin 2002; Barger *et al.*, 2004).

*Neoechinorhynchus golvani* fue descrito como parásito de *Vieja fenestrata* (Pisces: Cichlidae) en el Lago de Catemaco, Veracruz (Salgado-Maldonado 1978, 2006). Morfológicamente *N. golvani* se caracteriza por presentar una proboscis subcilíndrica recubierta con 18 ganchos dispuestos en tres hileras horizontales de seis ganchos en cada una. Adicionalmente, poseen un tronco ovoide, lemniscos en forma de saco, mismos que sobrepasan el receptáculo de la proboscis, la pared del cuerpo contiene cinco núcleos gigantes y los machos son de menor tamaño que las hembras (Salgado-Maldonado 1978) (Figs. 2 y 3).

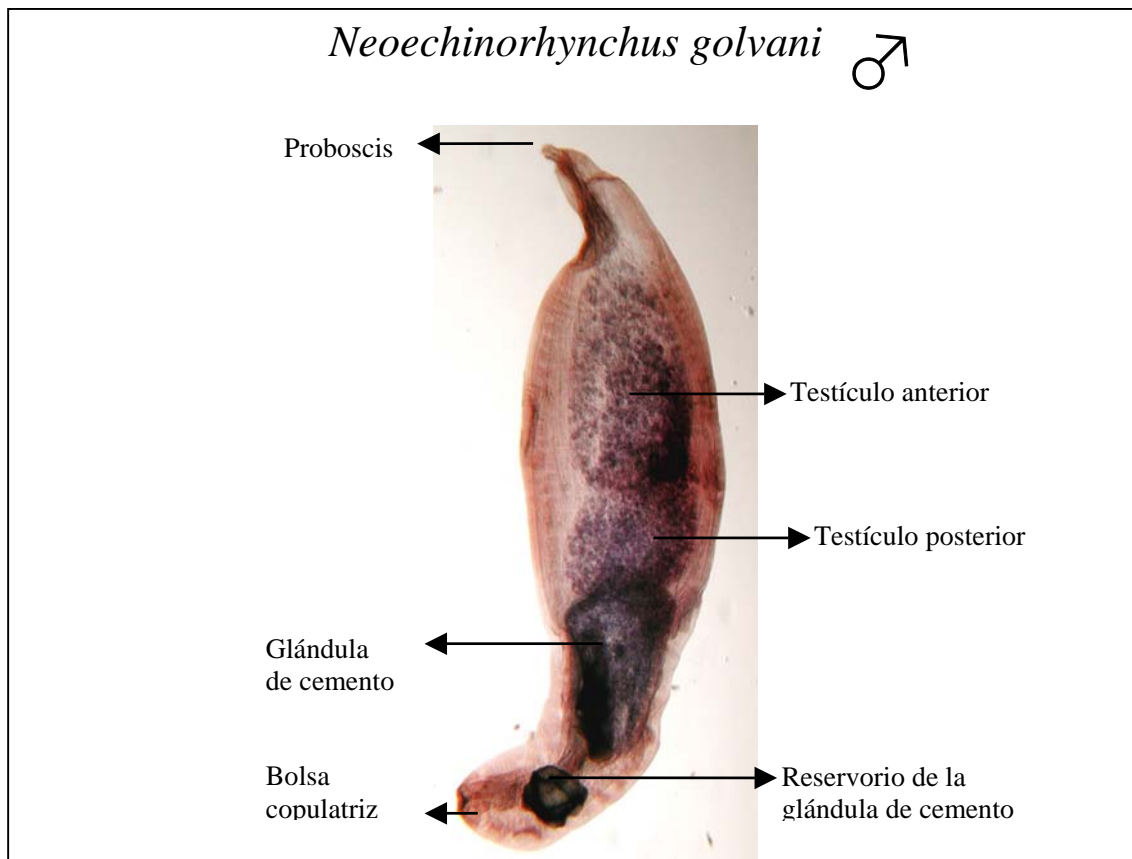


Figura 2. Microfotografía mostrando los caracteres morfológicos diagnósticos de *Neoechinorhynchus golvani* macho.

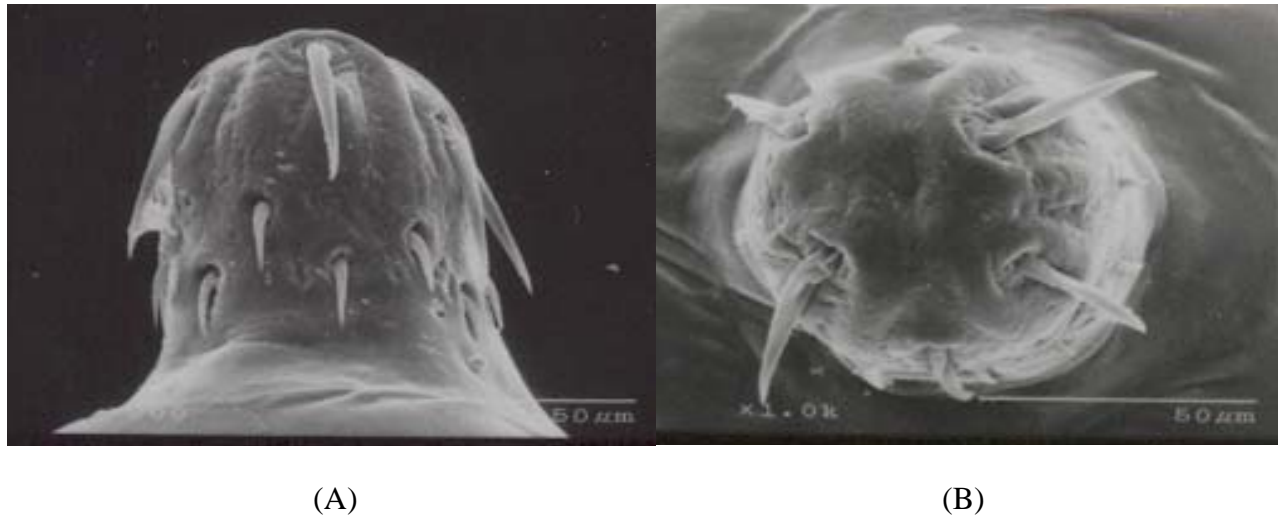


Figura 3. Proboscis de *Neoechinorhynchus golvani* utilizando microscopía electrónica de barrido. (A) = vista lateral; (B) = vista frontal.

En México, *N. golvani* se ha registrado en 40 especies de peces, 26 de las cuales pertenecen a la familia Cichlidae (Apéndice 1) y, por tanto, este acantocéfalo es considerado una especie especialista de dicha familia (Scholz *et al.*, 1996; Salgado-Maldonado y Kennedy 1997, Pérez-Ponce de León y Choudhury 2005; Salgado-Maldonado 2006). Sin embargo, *N. golvani* también ha sido registrado en otras diez familias de peces: Ariidae, Belonidae, Centropomidae, Eleotridae, Gerridae, Goobidae, Hemiramphidae, Heptapteridae, Ictaluridae y Lutjanidae (Salgado-Maldonado 2006; Violante-González *et al.*, 2007), lo cual no parece apoyar la asociación específica sugerida para ciclidos. Esta evidencia sugiere una evolución independiente de las poblaciones de *N. golvani* con diferentes familias de peces, o bien, una transferencia horizontal como resultado de la exposición de diferentes especies a las fases infectivas por ocurrir en simpatria. Una tercera posibilidad es que dichas infecciones resulten ser accidentales. Por tanto, consideramos que *N. golvani* es una especie modelo para someterse a una prospección molecular, para detectar si existe variación genética interpoblacional y poner a prueba la hipótesis

de la presencia de un complejo de especies crípticas, considerando la siguiente evidencia empírica:

1. *Neoechinorhynchus golvani* presenta una amplia gama en cuanto a su tamaño se refiere; sin embargo, los caracteres diagnósticos de esta especie (proboscis subcilíndrica recubierta con 18 ganchos dispuestos en tres hileras horizontales de seis ganchos en cada una), al parecer siempre son iguales. Por tanto, consideramos que *N.golvani* no presenta variación morfológica intraespecífica capaz de delimitar diferentes morfotipos, por lo que un estudio de prospección molecular podría detectar si existe un complejo de especies crípticas como respuesta a algún fenómeno biológico.

2. *Neoechinorhynchus golvani* presenta un área de distribución amplia y fragmentada (Fig. 5). Este parásito ha sido registrado en siete cuencas hidrológicas: Santiago, Pánuco, Papaloapan, Balsas, Grijalva, Usumacinta y Champotón (Salgado-Maldonado 2006; Violante-González *et al.*, 2007). Estos sistemas acuáticos presentan historias hidrogeomorfológicas distintas (Ferrusquía-Villafranca 1998; Arriaga-Cabrera *et al.*, 2000; Ortega-Gutiérrez 2000) que afectaron la historia evolutiva de los taxones que las habitan, produciendo endemismos y patrones biogeográficos características para distintos taxa tales como peces, helmintos, anfibios, reptiles y plantas acuáticas (Flores-Villela 1998; Aguilar-Aguilar *et al.*, 2003, 2005, 2008; Miller *et al.*, 2005; Pérez-Ponce de León y Choudhury 2005; Huidobro *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, se puede inferir que las poblaciones de *N. golvani* pueden presentar variación genética intraespecífica debida a la supresión de flujo génico interpoblacional causada por el aislamiento geográfico.



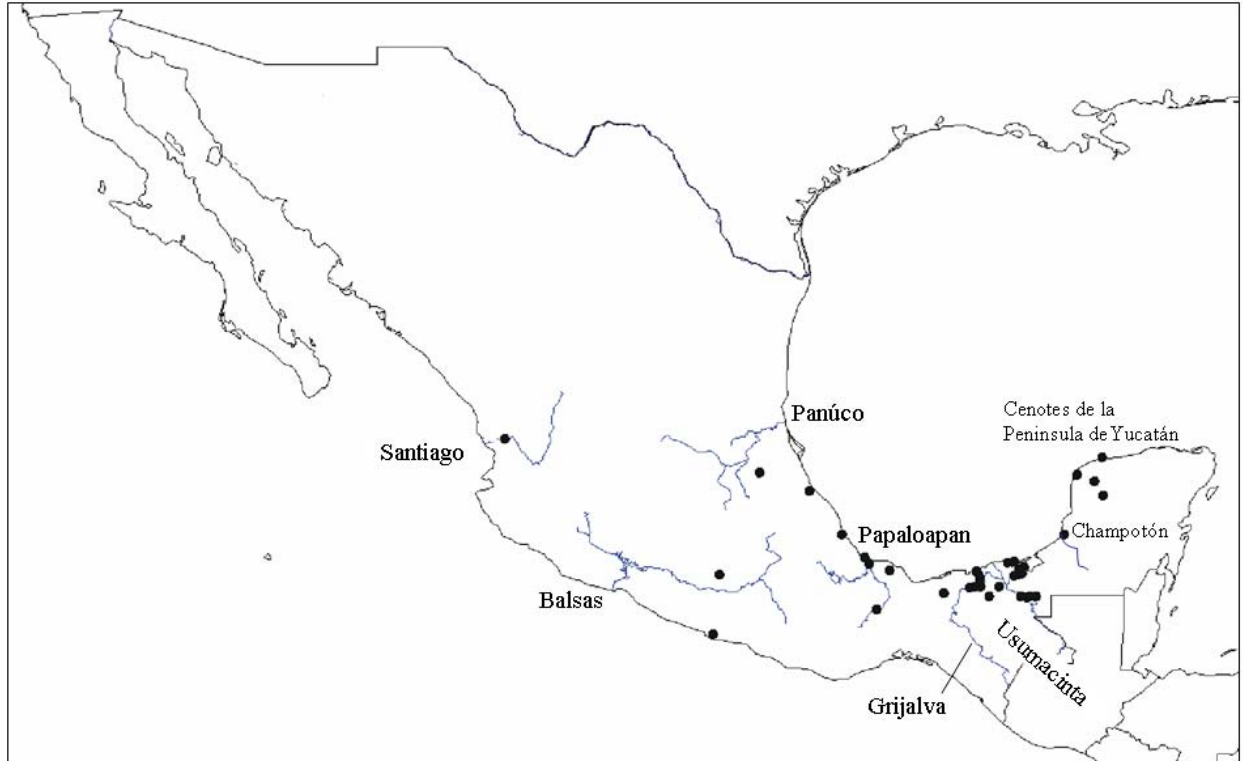


Fig 4. Mapa de México mostrando las cuencas principales y cuerpos de agua en que se ha registrado *Neoechinorhynchus golvani* (•).

3. *Neoechinorhynchus golvani* ha sido registrado en cíclidos y en otras familias de peces dulceacuícolas y salobres (Salgado-Maldonado 2006; Violate-González *et al.*, 2007). Por tanto, es posible inferir que algunas poblaciones de *N. golvani* representen linajes independientes en función de su asociación con distintos linajes de huéspedes. Además, es probable que eventos de *host-switching* (activación de nuevos huéspedes con evolución filogenética) o *host-sharing* (activación de nuevos huéspedes con evolución ecológica), pudieron haber desencadenado un proceso de cambio entre las poblaciones del parásito que, si bien no se ha expresado en términos

morfológicos, si pudiera reflejarse en cuanto a divergencia genética se refiere, pudiendo así determinar la presencia de especies crípticas.

## JUSTIFICACIÓN

Con base en la evidencia morfológica, ecológica y geográfica de *N. golvani* mencionada anteriormente, se sugiere que este parásito representa un excelente modelo para realizar un estudio de prospección molecular que permita inferir la existencia de un complejo de especies crípticas. Estas podrían delimitarse calculando la divergencia genética, y a través de un análisis filogenético, entre las poblaciones de *N. golvani*, utilizando como marcadores moleculares los genes ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S rDNA, debido a que son marcadores moleculares que muestran una alta tasa de mutación y que han sido usados previamente como marcadores moleculares para delimitar especies, poblaciones o especies crípticas de acantocéfalos (Král'ová-Hromadová *et al.*, 2003; Perrot-Minnot 2004; García-Varela *et al.*, 2005; Steinauer *et al.*, 2007).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Detectar la variación genética interpoblacional en *Neoechinorhynchus golvani*, con base en secuencias de genes nucleares (ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S rDNA).

### **Objetivos particulares**

I. Estimar las distancias genéticas de los genes nucleares ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S rDNA, respectivamente.

II. Realizar un análisis filogenético de algunas poblaciones de *Neoechinorhynchus golvani*, usando una matriz de caracteres moleculares de los genes nucleares ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S de rRNA, para inferir la presencia de un complejo de especies crípticas.

III. Generar una hipótesis que infiera la existencia de un complejo de especies crípticas, con base en las distancias genéticas y en los análisis filogenéticos de las poblaciones de *Neoechinorhynchus golvani* y su posible relación con las cuencas hidrológicas y/o las especies de peces que habitan.

Running Head: MARTÍNEZ-AQUINO *ET AL.*— COMPLEX OF CRYPTIC SPECIES OF *N. GOLVANI*

**DETECTING A COMPLEX OF CRYPTIC SPECIES WITHIN  
*NEOECHINORHYNCHUS GOLVANI* (ACANTHOCEPHALA:  
NEOECHINORHYNCHIDAE) INFERRED FROM ITS'S AND LSU RDNA GENE  
SEQUENCES.**

**Andrés Martínez-Aquino, Rogelio Rosas-Valdez, Ulises Razo-Mendivil, Miriam E. Reyna-Fabián, Gerardo Pérez-Ponce de León and Martín García-Varela\*.**

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000; Ciudad Universitaria; C.P. 04510; Distrito Federal. México *e-mail:* *garciaav@servidor.unam.mx*

**Corresponding author.**

Martín García Varela  
Departamento de Zoología,  
Instituto de Biología, UNAM,  
04510. México D.F., México.  
Email: *garciaav@servidor.unam.mx*  
Phone: (525)56229130  
Fax: (525) 5550 0164

## ABSTRACT

*Neoechinorhynchus golvani* is an intestinal parasite of freshwater and brackish water fishes distributed in Mexico. The genetic variability of 14 populations from north, south and central Mexico was estimated by sequencing 2 nuclear genes (ITS1, 5.8S, ITS2 and LSU rDNA including the domain D2 + D3). The length of both genes ranged from 700 to 779 pb and 813 to 821 bp, for ITS's and LSU, respectively. The genetic divergence among populations ranged from 30 to 40 % with ITS's and 19 % with LSU. Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses were performed for each dataset and also for the combined dataset (ITS's + LSU rDNA), showing strong similarities among trees, with high bootstrap support in all cases. Phylogenetic trees suggested that the acanthocephalan *N. golvani* represents a complex of cryptic species, which is at least composed by 4 lineages. The first lineage shows a wide distribution, including localities from Northeastern Mexico, southwards through Central and Southeastern Mexico, further down to Costa Rica, corresponding with *N. golvani*. This lineage is associated with fishes belonging to the family Cichlidae. Lineages 2 and 3 are distributed along the Gulf of Mexico and Pacific slopes, respectively, and both are associated to fishes of the family Eleotridae and apparently represent 2 cryptic species. Lineage 4 is found exclusively along the Champoton River basin, in the lowlands of southeastern Mexico and is also considered to be a cryptic species. The diversification of these lineages seems to be the result of allopatric speciation processes caused by several microvicariant events closely tied to the evolutionary history of their hosts.

## INTRODUCTION

*Neoechinorhynchus* Stiles and Hassall 1905 is one of the most speciose genera within Acanthocephala, with 91 described species classified into 2 subgenera based on egg anatomy, *Hebesoma* Van Cleave, 1928 and *Neoechinorhynchus* (Amin, 2000, 2002; Amin et al., 2003; Barger et al., 2004; Amin and Christison, 2005). Species of *Neoechinorhynchus* are small to medium sized organisms, and are characterized by the following characters: small globular or sub-cylindrical proboscis, armed with 3 circles of 6 hooks each, a single-walled proboscis receptacle, a cerebral ganglion located at the base of proboscis receptacle, males with 2 spherical to oblique testes, equatorial or postequatorial, a single syncytial cement gland, genital pore terminal in both sexes or subterminal in females, eggs oval, elliptical or elongate, with concentric shells or with polar prolongation of fertilization membrane. Variation and combination of these morphological traits has been traditionally used to diagnose and delimit species (see Amin, 2002; Barger and Nickol, 2004). Additionally, species of *Neoechinorhynchus* exhibit an indirect life cycle, involving ostracods as intermediate hosts, and either marine, freshwater and brackish water fishes, or freshwater turtles and frogs as definitive hosts, and occur mostly in the Nearctic region (Bullock, 1970; Schmidt, 1985, 1988; Amin, 2000, 2002; Kennedy, 2006), however, some species have been found in South America, Europe, India, Asia and Australia (see Bullock, 1970). In Mexico only 4 species of *Neoechinorhynchus* have been described mostly from the Neotropical region, 2 occurring in freshwater turtles *N. schmidtii* Barger, Thatcher and Nickol, 2004 and *N. emyditoides* Fisher, 1960 and other 2 species occurring in brackish and freshwater water fishes, *N. roseum* Salgado-Maldonado, 1978 and *N. golvani*, Salgado-Maldonado, 1978, respectively. Particularly, the species *Neoechinorhynchus golvani* is widely distributed in Southeastern, Southwestern and Central Mexico, and is commonly associated to members of the

family Cichlidae, however, it has been also recorded sporadically in other 10 families of fishes (Pérez-Ponce de León et al., 1996; Salgado-Maldonado, 2006; Violante-González et al., 2007). Additionally, even though specimens of *N. golvani* show some morphological variation in terms of body size, diagnostic characters such as sub-cylindric proboscis armed with 3 longitudinal rows with 6 hooks each, short and ovoid trunk, elongate and equal sized lemnisci, and body wall containing 5 giant nuclei (Salgado-Maldonado, 1978), are exhibited by individuals from all populations irrespective to their size (Fig. 1). In addition to that, the distribution area of *N. golvani* is wide and fragmented, and therefore it would be possible that their populations may show some level of genetic variation due to geographical isolation and suppression of genetic flow.

The main objective of the present research was to estimate the genetic divergence among some populations of *N. golvani* by using 2 nuclear genes, ITS1, 5.8S, ITS2 (ITS's) and the Large Subunit (LSU) of ribosomal DNA including the domain D2 + D3 as molecular markers and to test for the possible presence of cryptic species.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Specimens and DNA isolation***

Adult acanthocephalans were collected from the intestine of their definitive hosts in 13 localities of Mexico and 1 in Costa Rica (Table I and Fig. 2). Worms were washed 3 times in 0.9 % (w/v) saline, preserved in absolute ethanol, and stored at 4 C. For taxonomic identification, some specimens were stained with Meyer's paracarmine, cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides using Canada balsam. The acanthocephalans were identified by conventional morphological criteria following keys of Amin (2002). In addition, original and revised descriptions of the species (e.g. Salgado-Maldonado, 1978; Barger et al., 2004) were consulted as needed. Voucher specimens were deposited at the Colección Nacional de Helminthos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM, Mexico City, México (Table I).

### ***Amplification and sequencing of DNA***

A single specimen from each population was digested overnight at 56 C in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> 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, Ohio) according to the manufacturer's instructions.

Two regions of nuclear ribosomal DNA (rDNA) were amplified using the polymerase chain reaction (PCR). The ITS1, 5.8S, and ITS2 (ITS's) (~ 800 pb) were amplified using the forward primer 5' GTCGTAACAAGGTTTCCGT 3' and reverse primer 5' ACCCGCTGAATTTAAGCATA 3' (Luton et al., 1992). The domains D2 + D3 (~ 900 bp) of LSU rDNA were amplified using the forward primer 5' CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC

3' and reverse primer 5' GTCGATAGGACTCCCTTTG 3' (García-Varela and Nadler, 2005). PCR reactions (25 µl) consisted of 10 µM of each primer, 2.5 µl of 10X buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling parameters for rDNA amplifications included denaturation at 94 C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 C for 1 min, annealing at 50 C for 1 min, and extension at 72 C for 1 min, followed by a post-amplification incubation at 72 C for 10 min.

Each PCR product was purified using Millipore columns (Amicon, Billerica, Massachusetts). Purified products were cloned by ligation into pGEM-T vector (Promega, Madison, Wisconsin) and used to transform competent *Escherichia coli* (JM109). Positive clones were identified by blue/white selection, and clone (insert) size was confirmed by PCR of DNA extracts prepared from bacterial (clone) colonies. Liquid cultures for minipreps were grown in Luria broth containing 50 µg/ml of ampicillin. Plasmids for DNA sequencing were prepared using commercial miniprep kits (Qiaprep, Qiagen, Valencia, California). Plasmids were sequenced for both DNA strands using universal (vector) and internal primers. Sequencing reactions were performed using ABI Big Dye (PE Applied Biosystems, Boston, Massachusetts) terminator sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using an ABI 310 capillary DNA sequencer. Contigs were assembled and base-calling differences resolved using Codoncode Aligner version 1.4.5 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts). All sequences have been deposited in the Genbank database (accession numbers in Table I).

### ***Alignments and phylogenetic analyses***

The ITS's and LSU data sets were aligned separately using the software ProAlign version 0.5 (Loytynoja and Milinkovitch, 2003). For each alignment, a ProAlign guide tree was constructed using corrected (for multiple hits) pair-wise distances; this guide tree was used to estimate the

hidden Markov model parameters ( $\delta$  and  $\epsilon$ ) for progressive multiple alignment. Program (Java) memory and band-width were increased as required to complete the alignment. The minimum posterior probability of sites was used as the criterion for detecting and removing unreliably aligned sequence. To reduce the likelihood of excluding correctly aligned sites, the filter threshold was set to 60% minimum posterior probability. For the ITS's sequences, using ProAlign to detect and remove unreliably aligned sequence by their posterior probabilities excluded 580 of 992 sites. For the LSU dataset, 145 of 841 sites were excluded based on posterior probability filtering. These (ITS's + LSU) combined datasets included 1,108 characters following removal of unreliably aligned sites. The ITS's and LSU rDNA filtered alignments were analyzed independently and also as a combined (ITS's + LSU) dataset. Tree searches were conducted with the optimality criteria of maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) using the software PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). For ML analyses, the Akaike Information Criterion (AIC) was used to assess the fit of GTR (General Time Reversible) nucleotide substitution models for these data (Rodríguez et al., 1990) as implemented using Modeltest version 3.0 (Posada and Crandall, 1998). The best ML model for each dataset (ITS's, LSU, and combined) was used for likelihood analysis (Table II). For each data set a GTR model with invariable sites (+ I), and rate heterogeneity (+ G; Yang, 1994) was used, but the estimated parameters varied by dataset (Table II). Tree searches were performed using 50 (ML) and 1,000 (MP) random addition heuristic searches with Tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping. The support of the clades was assessed by bootstrap resampling, with 10,000 (MP) or 100 (ML) bootstrap replicates. Trees were drawn using RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsenstein, 1999). The genetic divergence among population and between congeneric species were estimated using the Jukes-Cantor method using PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002).

Congeneric species *N. roseum*, *N. schmidtii* and *N. saginatus* Van Cleave and Bangham, 1949 were chosen as outgroups to conduct ML and MP analyses.

## RESULTS

### *Base composition and genetic divergence*

DNA fragments of the ITS'S and LSU were amplified, cloned and sequenced for 15 samples of *N. golvani* and 4 samples representing 3 congeneric species (2 of *N. roseum*, 1 of *N. schmidtii* and 1 of *N. saginatus*) which were used as outgroups. Length of the PCR products among *N. golvani* ranged from 700-779 bp and 813 -821 bp for ITS's and LSU respectively and among congeneric species ranged from 728-987 bp and 766-818 bp for ITS's and LSU respectively.

Nucleotide frequencies for the combined (ITS's + LSU) data set were 0.256 (A), 0.186 (C), 0.280 (G) and 0.276 (T). The heterogeneity of nucleotide frequencies across taxa was tested using the "basefreq" option implemented in PAUP\* ( $X^2 = 11.20$ ,  $P = 1$ ). This result indicates that rDNA nucleotide frequencies were not significantly heterogeneous across taxa, which is advantageous because MP and ML inference methods perform optimally when nucleotide frequencies are homogeneous (Omilian and Taylor, 2001). Total lengths of the alignments and number of constant and parsimony-informative characters for the ITS's, LSU, and combined (ITS's + LSU) datasets are provided in Table II. The genetic divergence among populations from 4 major clades of *N. golvani* ranged from 31 to 35 % with LSU, and from 38 to 40 % with ITS's, and among congeneric species (*N. roseum*, *N. schmidtii* and *N. saginatus*) ranged from 29 to 31 % with LSU, and from 39 to 45 % with ITS's (Table III).

### *Combined ITS's + LSU dataset*

Maximum likelihood tree inferred from the combined (ITS's + LSU) dataset yielded 1 tree with  $-ln$  of 5897.36984. In this tree 4 major clades are shown (Fig. 3A). The first clade was composed by 8 populations of *N. golvani* that exhibit a wide distribution, from Northeastern Mexico, through Central and Southeastern Mexico, southwards to Costa Rica. All these populations are

found exclusively in cichlids, and they include the type locality (population from Catemaco, Veracruz [*N. golvani* 6]). Clades 2 and 3 are composed by 6 specimens from populations distributed along the Gulf of Mexico and Pacific slopes, respectively and are associated to fishes belonging to the families Cichlidae and Eleotridae. Finally, the clade 4 was composed by a single specimen that inhabits a river basin (Champton) in the lowlands of Southeastern Mexico, and is also associated with Cichlids (Figs. 2,3). The 4 major clades obtained a relatively high bootstrap support value, ranging from 62 to 100 %. Maximum parsimony analysis of the combined ITS's + LSU dataset (Fig. 3B) yielded 6 trees with a C.I. = 0.77 and length of 1048 steps (Table II). The strict consensus of 6 trees yielded almost the same general topology as the ML, but the 4 major clades received a higher bootstrap support (77 to 100 %). The few topological differences between ML and MP trees involved some populations within clades with very short branches as inferred by ML and low bootstrap support (Figs. 3A, B), but the major difference is the position of the population from Champoton (*N. golvani* 15) which appears as the sister taxa to the clade formed by populations found in eleotrids in the MP analysis. Instead, in the ML analysis, this population appears as the sister taxa to all the other populations.

### ***LSU dataset***

Maximum likelihood analysis of the LSU data set yielded a single tree with  $-\ln$  of 3302.18233 (Fig. 4A). This tree had a considerable similarity to the MP tree inferred from the combined dataset. The four major clades received strong bootstrap support (93 to 100 %). The MP analysis of this data set yielded 6 trees with C.I. = 0.80 and length of 548 steps (Fig. 4B). The strict consensus of 6 trees yielded the same general topology as ML tree inferred from LSU dataset along and the MP tree from the combined datasets (Figs. 4A, B).

### *ITS's dataset*

Maximum likelihood analysis of the ITS's data set yielded a single tree with  $-\ln$  of 2517.06499 (Fig. 5A). This tree almost yielded the same topology inferred with ML and MP trees from combined dataset and LSU dataset alone. However in the ITS's tree clade 4, which is represented by a single specimen was nested as the sister taxa of a clade composed by 2 congeneric species that were used as outgroups, albeit this relationship is supported by a very low bootstrap support (62 %). The MP analysis of this dataset yielded 6 trees with C.I. = 0.7465 and length of 501 steps (Fig. 5B). The strict consensus of 6 trees yielded the same general topology as the MP trees inferred from LSU dataset alone and combined of both (ITS's + LSU) datasets (Figs. 5A, B).

## DISCUSSION

The genetic divergence among populations of *N. golvani* detected in the current study with ITS's ranged from 38 to 40 %. This level of divergence is larger than that previously reported for populations of other acanthocephalan species such as *Pomphorhynchus leavis* Müller 1776, which exhibited a genetic divergence of 20 % (Perrot-Minnot, 2004) and *Leptorhynchoides thecatus* Linton, 1891, which showed a genetic divergence ranging from 1 to 8.7 % (Steinauer et al., 2007). Likewise, genetic divergence among populations of *N. golvani* is 19 % with LSU. This level of divergence among populations is smaller than that found among congeneric species (*N. roseum*, *N. schmidtii* and *N. saginatus*), which ranged from 29 to 36 %. Our results confirm that LSU gene can be also used as molecular marker to establish a species limits among populations of acanthocephalans, and would also be useful in recognizing a complex of cryptic species. The genetic distances estimated for each gene, in addition to the phylogenetic trees inferred from each data set as well as the combined dataset (ITS's + LSU) using both ML and MP methods, clearly demonstrate the existence of a complex of cryptic species in *N. golvani*. This complex is at least composed by 4 lineages with evolutionary independence, particularly by considering that populations are fragmented and occupy several river basins in Mexico.

Lineage 1, which includes *N. golvani sensu stricto*, is associated to fishes belonging to the Cichlidae in freshwater environments. The area of distribution of this lineage (Fig. 3), extends from Southeastern Mexico to Costa Rica, exhibiting a genetic divergence range between 0.25 and 4.6 % for ITS's and between 0.1 and 4.45 % for LSU. The wide distribution of this lineage could be explained as a result of the contemporary and historical biogeography of the cichlids (see Concheiro-Pérez et al., 2007). In this context, *N. golvani* seems to be part of the helminth core fauna of cichlids (see Pérez-Ponce de León and Choudhury, 2005), along with other species of



helminths such as the members of the genus *Crassicutis* Manter, 1936 (*C. cichlasomae* Manter, 1936 and *C. choudhuryi* Pérez-Ponce de León, Razo-Mendivil, Rosas-Valdez, Mendoza-Garfias and Mejía-Madrid, 2008) and *Oligogonotylus* Watson, 1976 (*O. manteri* Watson, 1976, and *O. mayae* Razo-Mendivil, Rosas-Valdez and Pérez-Ponce de León, 2008) (Manter, 1936, Watson, 1976, Pérez-Ponce de León et al., 2008; Razo-Mendivil et al., 2008).

Lineages 2 and 3 are represented by populations geographically restricted, and distributed in the Gulf of Mexico slope as well as in the Pacific Ocean slope, respectively and both are mainly restricted to brackish water lagoons. The lineage 2 is associated to fishes of the families Eleotridae and Cichlidae. Meanwhile, the lineage 3 is associated to fishes of the family Eleotridae. The genetic divergence between both lineages was 15 % for ITS's and 7.8 % for LSU. Steinauer et al., (2007) found a divergence level of 8.7% for populations of *Leptorhynchoides thecatus* Linton, 1891 with ITS's, and this evidence was used by the authors to postulate the existence of a complex of cryptic species. Being aware that this fact does not necessarily mean a genetic yardstick for the group. The values of genetic divergence obtained in our study for clades 2 and 3, are large enough to postulate that both lineages are evolving as independent entities. As an additional piece of information, populations show a vicariant distribution and it seems not likely that gene flow may exist among populations, and then it is possible to postulate that they actually represent 2 cryptic species.

The samples from the Gulf of Mexico slope (Clade 2), were collected from the eleotrid *Dormitator maculatus* Bloch, 1792 (*N. golvani* 11), and other 2 samples were obtained from the cichlid *Cichlasoma urophthalmus* Günther, 1862 (*N. golvani* 9, 10). It is currently known that the Papaloapan river is not considered as a part of the natural distributional range of *C. urophthalmus* (Miller et al., 2005), and it was introduced with aquacultural purposes (Espinosa-Pérez et al., 1993). Therefore, *C. urophthalmus* occurs in sympatry with eleotrids in the same hydrological

system. In this scenario, when considering the very low genetic divergence among those individuals, it can be established they represent the same lineage and that the presence of this lineage in *C. urophthalmus* is due a host-sharing event.

The samples from clade 3 were found in the eleotrid *Dormitator latifrons* Richardson, 1844 from the Tres Palos Lagoon, on the Pacific slope of Mexico. It is currently known that this species of fish co-occur with fishes from other families such as Centropomidae, Cichlidae, Gerridae, Gobiidae, Lutjanidae, where the acanthocephalan “*N. golvani*” also has been recently recorded (Violante-González *et al.*, 2007). As established before, those specimens belong to a separate and cryptic species and not to *N. golvani sensu stricto*, but whether or not individuals from these fish species will belong to the same lineage as the cryptic species need to be determined in the future, since we have not collected fresh specimens from these hosts to extract DNA. Following the scenario described for the Gulf of Mexico subclade, our prediction is that they will correspond with the same species, and that the presence of this species of *Neoechynorhynchus* in other species of fishes will be explained either as a result of a host-sharing event, or even as an accidental infection, depending on the abundance and mean intensity values.

Lineage 4 is postulated here also as a cryptic species, however this needs to be taken with caution since lineage is represented only for a single specimen, which is associated to the cichlid *Petenia splendida* Günther, 1862. This lineage shows very high values of genetic divergence (18-19 % for LSU and 37-41 % for ITS's), suggesting that this population has been isolated, probably as a result of the species inhabiting a geographically restricted area in a river of the lowlands of Southeastern Mexico. In addition to that, differences in the MP and ML trees are due to the placement of *N. golvani* 15 (the Champoton population) either as the sister taxa of the eleotrid clade, as the sister taxa of the cichlid and eleotrid clades, and also as the sister taxa of outgroups. Further, some surveys have shown that several records of “*N. golvani*” have been made in some

localities of the states of Chiapas, Tabasco, Quintana Roo and Yucatán, where the acanthocephalan is found at least in 14 species of cichlids (Vidal-Martínez et al., 2001), so this confirms that the validity of clade 4 as an independent lineage with restricted geographical distribution needs further verification, by extending our sampling effort in Southeastern Mexico to obtain specimens for sequencing.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Montoya-Mendoza and L. García-Prieto for providing some specimens of *Neoechinorhynchus* they collected during their field work. The support of Patricia de la Torre and Laura Márquez with the molecular techniques and Berenit Mendoza-Garfias with the scanning electron microscopy micrographs is greatly appreciated. We also thank B. Hernández-Baños and Juan J. Morrone for their comments on an earlier draft of this manuscript. AMA thanks CONACyT for scholarship to accomplish his Ms. Sc. degree. Specimens from Costa Rica were collected during a field trip of G.P.P.L. and Anindo Choudhury to the Area de Conservación de Guanacaste. Dr. Daniel R. Brooks sponsored G.P.P.L. for this field trip under operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Canada, as coordinator of the inventory of eukaryotic parasites of vertebrates. This research was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM No. IN206906) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, through the program Apoyo Complementario a Investigadores en Proceso de Consolidación (CONACYT-No. 52185) to MGv and by grants from the program PAPIIT-UNAM No. IN220605 and 209608 and from CONACyT (No. 47233) to G.P.P.L.

## LITERATURE CITED

Amin, O. M. 2000. Acanthocephala in the Neotropical Region. *In* Metazoan parasites in the neotropics: A systematic and ecological perspective, G. Salgado-Maldonado, A. N. García-Aldrete, and V. M. Vidal-Martínez (eds.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México., p. 167-174.

\_\_\_\_\_. 2002. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles & Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology* **53**: 1-18.

\_\_\_\_\_, and W. K. Christison. 2005. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *dorsovaginatus* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the dusky kob *Argyrosomus japonicus* (Sciaenidae) on the southern coast of South Africa. *Systematic Parasitology* **61**: 173-179.

\_\_\_\_\_, M. A. S. Abdullah, and F. T. Mhaisen. 2003. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *zabensis* sp. n. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from freshwater fish in northern Iraq. *Folia Parasitologica* **50**: 293–297.

Barger, M. A., and B. B. Nickol. 2004. A key to the species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Turtles. *Comparative Parasitology* **71**: 4-8.

\_\_\_\_\_, E. V. Thatcher, and B. B. Nickol. 2004. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology* **71**: 1-3.

Bullock, W. L. 1970. The zoogeography and host relations of the acanthocephalan parasites of fishes. Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. Bethesda: The American Fisheries Society, p. 162-173.

- Concheiro-Pérez G. A., O. Rican, G. Ortí, E. Bermingham, I. Doadrio, and R. Zardoya. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**: 91-110.
- Espinosa-Pérez H., M. T. Gaspar-Dillanes, and P. Puentes-Mata. 1993. Listados faunísticos de México III. Los peces dulceacuícolas mexicanos. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 99 p.
- Felsenstein, J. 1999. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.572. University of Washington, Seattle, Washington.
- García-Varela, M., and S. A. Nadler. 2005. Phylogenetic relationships of palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **91**: 1401-1409.
- Kennedy, C. R. 2006. Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, 249 p.
- Luton, K., D. Walker, and D. Blair. 1992. Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular Biochemical Parasitology* **56**: 323-328.
- Loytynoja, A., and M. C. Milinkovitch. 2003. A hidden Markov model for progressive multiple alignment. *Bioinformatics* **19**: 1505-1513.
- Manter, H. W. 1936. Some trematodes of cenote fish from Yucatán. Carnegie Institute of Washington Publications **457**: 33-38.
- Miller, R. R., W. L. Minckley, and S. M. Norris. 2005. Freshwater fishes of Mexico. The University of Chicago Press, Chicago, 490 p.
- Omilian, A. R., and D. J. Taylor. 2001. Rate acceleration and long-branch attraction in a conserved gene of cryptic daphniid (Crustacea) species. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 2201-2212.

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

\_\_\_\_\_, L. García-Prieto, D. Osorio-Sarabia., and V. León-Regagnon. 1996. Listados faunísticos de México VI. Helmintos parásitos de peces de aguas continentales de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 100 p.

\_\_\_\_\_, U. Razo-Mendivil, R. Rosas-Valdez, B. Mendoza-Garfias., and H. Mejía-Madrid. 2008. Description of a new species of *Crassicutis* Manter, 1936, parasite of *Cichlasoma beani* Jordan (Osteichthyes: Cichlidae) in Mexico, based on morphology and sequences of the ITS1 and 28S ribosomal RNA genes. *Journal of Parasitology* **94**: 257-263.

Perrot-Minnot, M-J. 2004. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomporhynchus laevis* (Acanthocephala). *International Journal for Parasitology* **34**: 45-54.

Posada, D., and K. A. Crandall. 1988. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **9**: 817-818.

Razo-Mendivil, U., R. Rosas-Valdez., and G. Pérez-Ponce de León. 2008. A new Cryptogonimid (Digenea) from the Mayan Cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Osteichthyes: Cichlidae) in several localities of the Yucatán Peninsula, México. *In press*.

Rodríguez, F., J. F. Oliver, A. Marin, and J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 817-818.

Salgado-Maldonado, G. 1978. Acantocéfalos de peces IV. Descripción de dos especies nuevas de *Neoechinorhynchus* Hamann, 1892 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) y algunas consideraciones sobre este género. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* **49**: 35-48.

\_\_\_\_\_. 2006. Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa* **1324**: 1-357.

Schmidt, G. D. 1985. Development and life cycles. *In* *Biology of Acanthocephala*, B. B. Nickol., and D. W. T. Crompton (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 273-286.

\_\_\_\_\_. 1988. *Essentials of parasitology*. Wm. C. Brown Publisher, 298 p.

Steinauer, M. L., B. B. Nickol., and G. Ortí. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology* **16**: 4097-4109.

Swofford, D. L. 2002. PAUP 4.0b10. *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Vidal-Martínez, V., L. Aguirre-Macedo, T. Scholz, D. González-Solís., and E. Mendoza-Franco. 2001. *Atlas of the helminth parasites of cichlid fish of Mexico*. Academia Press, Praha, Czech Republic, 165 p.

Violante-González, J., M. L. Aguirre-Macedo., and E. F. Mendoza-Franco. 2007. A checklist of metazoan parasites of fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Parasitology Research* **102**: 151-161.

Watson, D. E. 1976. Digenea of fishes from Lake Nicaragua. *In* *Investigations of the ichthyofauna of Nicaraguan lakes*, T. B. Thorson (ed.). University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska, p. 251-260.

Yang, Z. 1994. Estimating the patterns of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 105-111.



## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Adult specimens of *Neoechinorhynchus golvani*. Photographs of male (**A**) and female (**B**). Scanning electron micrograph of the proboscis in lateral view (**C**) and face view (**D**).

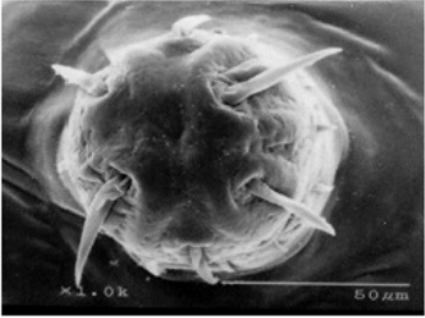
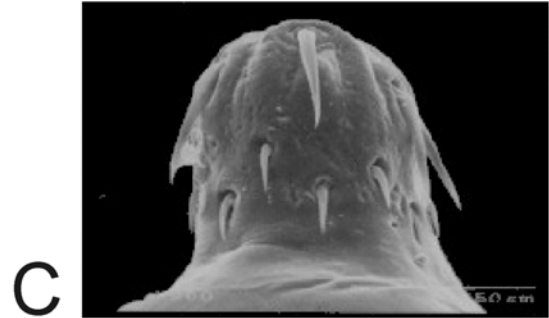
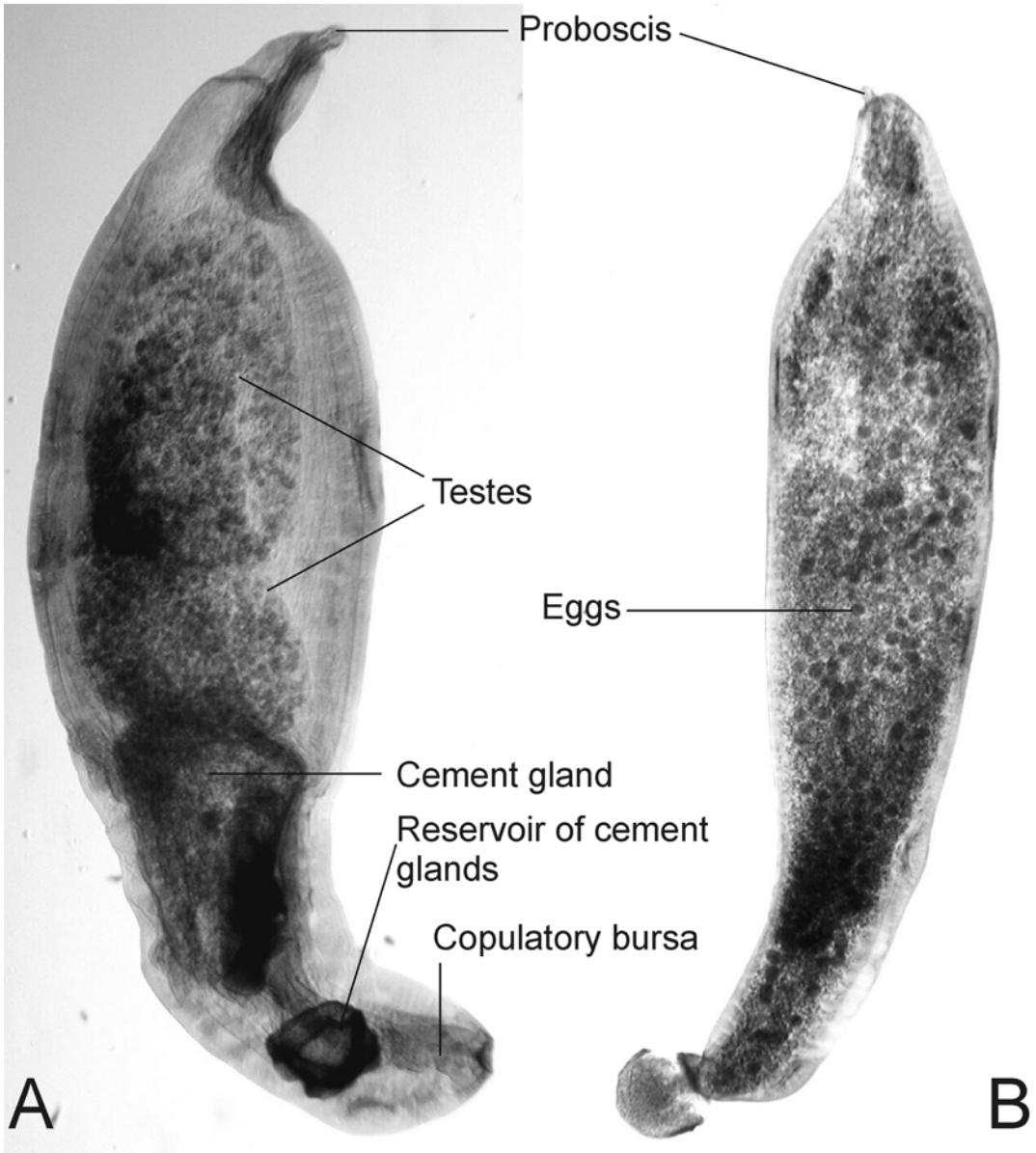
FIGURE 2. Sampling sites of specimens of *Neoechinorhynchus golvani* in Mexico and Costa Rica. Symbols correspond to the lineages uncovered through phylogenetic analyses as shown in Figures 3-5. Collection sites are numbered according to Table I.

FIGURE 3. Trees recovered from analyses of the combined ITS's + LSU rDNA dataset. (**A**) Maximum likelihood tree (-ln likelihood of 5897.36984) obtained from heuristic search with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per site. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies. (**B**) Strict consensus of 6 equally parsimonious trees (1048 steps) inferred from heuristic MP analysis. Numbers below internal nodes show MP bootstrap clade frequencies. The four major lineages discussed in the text are indicated on the trees: Lineages 1 (**M**); 2 ( $\sigma$ ); 3 ( $\lambda$ ) and 4 ( $\nu$ ).

FIGURE 4. Trees recovered from analyses of the LSU rDNA dataset. (**A**) Maximum likelihood tree (-ln likelihood of 3302.18233) obtained from heuristic search with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per site. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies. (**B**) Strict consensus of 6 equally parsimonious trees (548 steps) inferred from heuristic MP analysis. Numbers below internal nodes show MP bootstrap clade frequencies. The four major lineages discussed in the text are indicated on the trees: Lineages 1 (**M**); 2 ( $\sigma$ ); 3 ( $\lambda$ ) and 4 ( $\nu$ ).

FIGURE 5. Trees recovered from analyses of the ITS's dataset. **(A)** Maximum likelihood tree (-ln likelihood of 2517.06499) obtained from heuristic search with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per site. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies. **(B)** Strict consensus of 6 equally parsimonious trees (501 steps) inferred from heuristic MP analysis. Numbers below internal nodes show bootstrap values. The four major lineages discussed in the text are indicated on the trees: Lineages 1 (**M**); 2 ( $\sigma$ ); 3 ( $\lambda$ ) and 4 ( $\nu$ ).

FIGURE 1.



C

D

FIGURE 2.

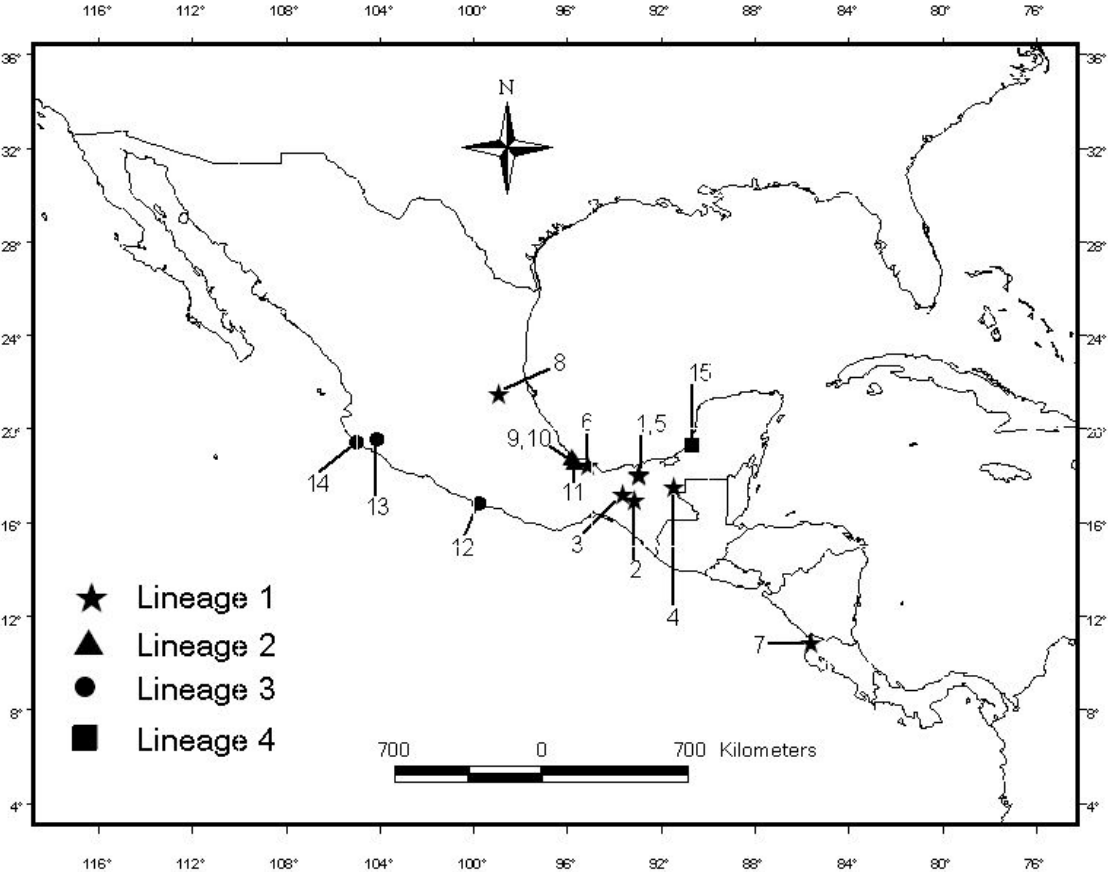
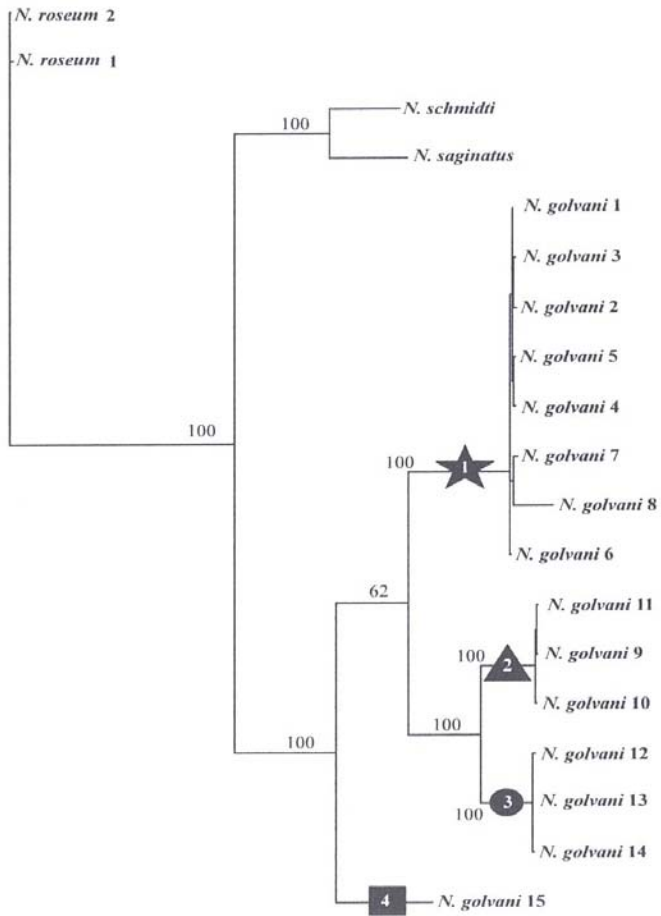


FIGURE 3.

A



0.1

B

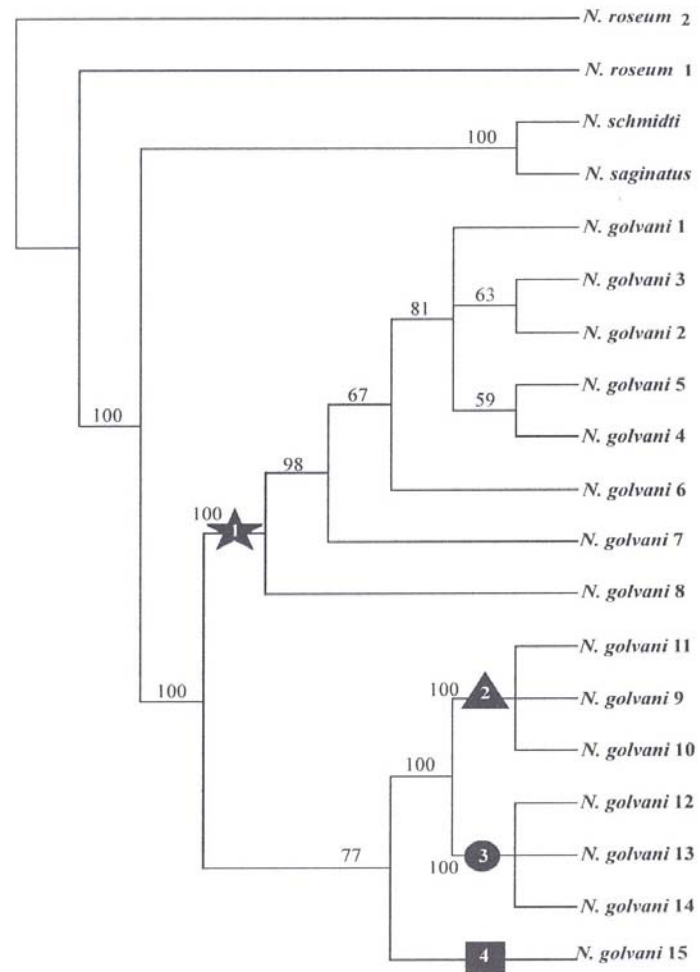


FIGURE 4.

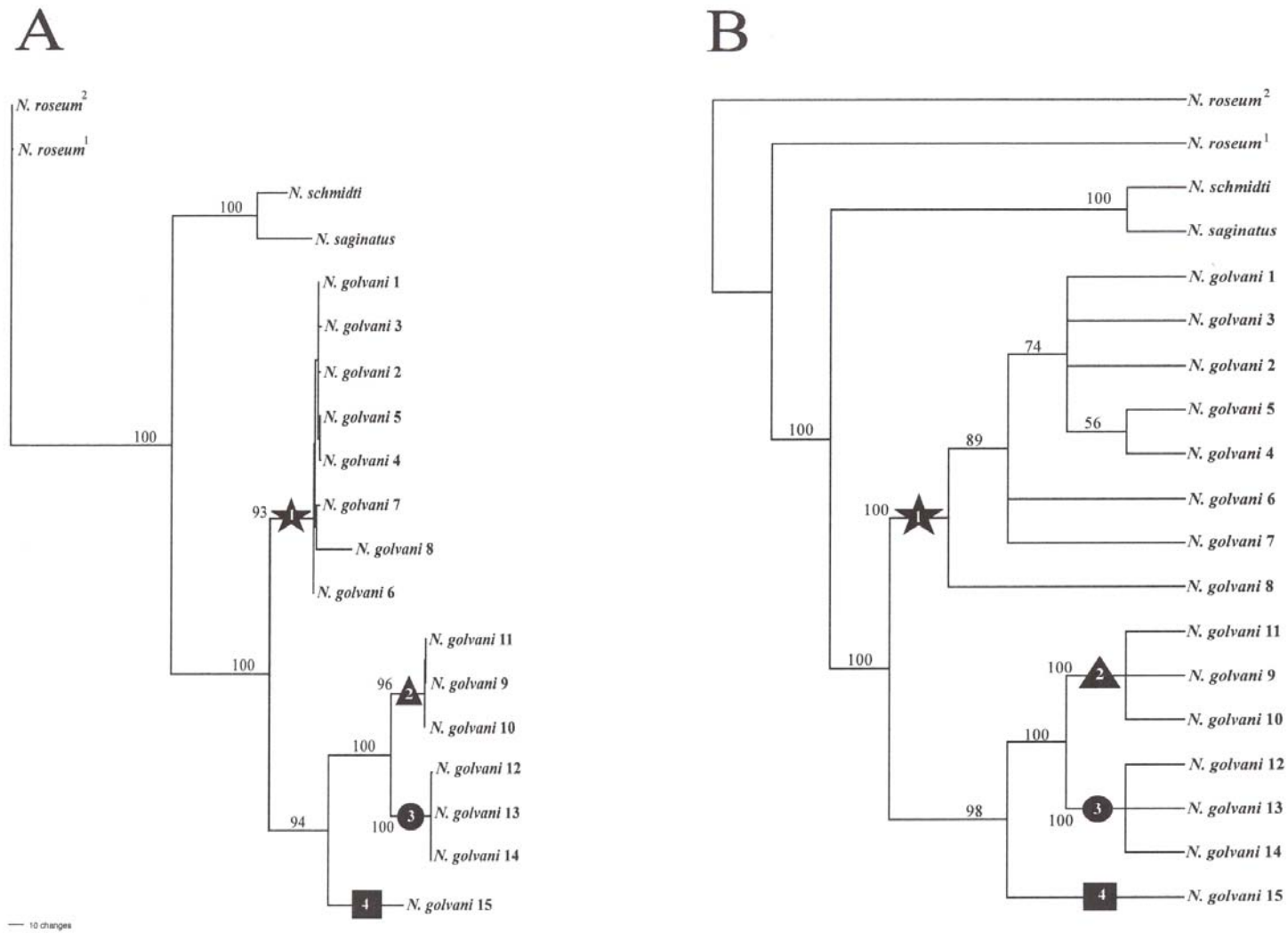


FIGURE 5.

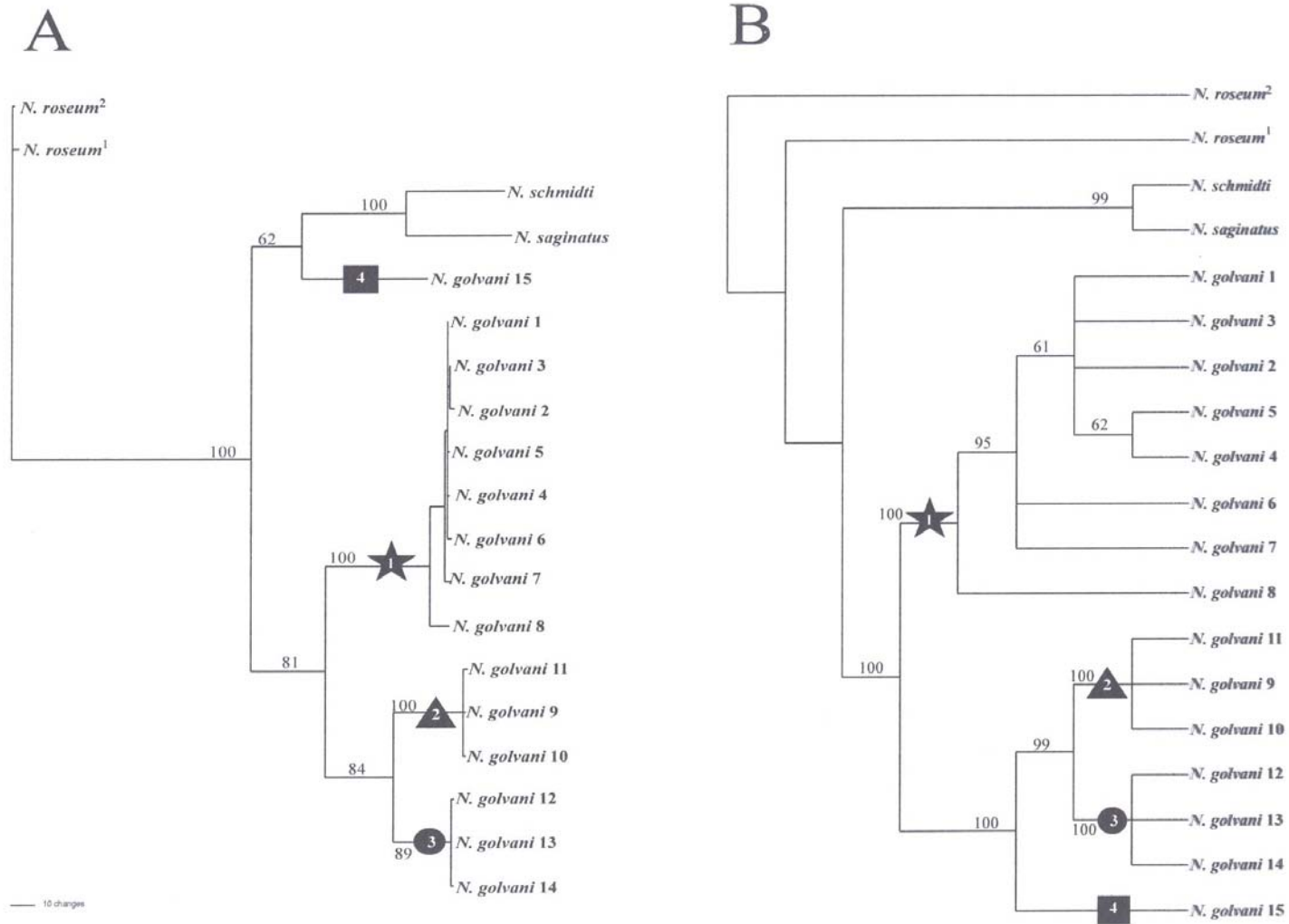


TABLE I. Specimens information, hosts, localities, coordinates, Genbank accession number and catalog number (CNHE) for specimens studies in this work. Sequences marked with asterisk were obtained in this study. Family of freshwater and brackish fishes host of *Neoechinorhynchus golvani* utility in this study: [C] = Cichlidae; [E] = Eleotridae. Nd = Not determined. The sample number of each locality corresponds with the same numbers in the Figures 2 and 3.

| Species /<br>Sample No. | Hosts                                | Locality                                            | Coordinates |             | GeneBank<br>Accession No. |            | Vouchers<br>(CNHE) |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|-------------|---------------------------|------------|--------------------|
|                         |                                      |                                                     | North       | West        | ITS's                     | LSU        |                    |
| <i>N. golvani</i> 1     | <i>Cichlasoma urophthalmus</i> [C]   | Carrizal River, Tabasco                             | 18°1'45''   | 92°55'00''  | xxxxxxxxxx                | xxxxxxxxxx | XXXX               |
| <i>N. golvani</i> 2     | <i>Vieja pearsei</i> [C]             | Chicoasen Dam, Chiapas                              | 16°56'02''  | 93°05'16''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 3     | <i>Vieja pearsei</i> [C]             | Nezahualcoyolt Dam, Malpaso Dam,<br>Chiapas         | 17°10'49''  | 93°36'49''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 4     | <i>Parachromis managuensis</i> [C]   | Canitzan Lake, Tenosique, Tabasco                   | 17°28'57''  | 91°25'27''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 5     | <i>Cichlasoma urophthalmus</i> [C]   | Las Ilusiones Lake, Tabasco                         | 17°59'46''  | 92°56'17''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 6     | <i>Vieja fenestrata</i> [C]          | Catemaco Lake, Veracruz                             | 18°25'      | 95°07'      |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 7     | <i>Amatitlania nigrofasciata</i> [C] | Quebrada Puercos, Santa Rosa, Costa<br>Rica         | 10°51'      | 85°34'      |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 8     | <i>Herichthys cyanoguttatus</i> [C]  | Axtlan de Terrazas, San Luis Potosí                 | 21°26'1''   | 98°52'28''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 9     | <i>Cichlasoma urophthalmus</i> [C]   | Papaloapan River at Tlacotalpan<br>Lagoon, Veracruz | 18°36'      | 95°39'      |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 10    | <i>Cichlasoma urophthalmus</i> [C]   | Papaloapan River at Tlacotalpan<br>Lagoon, Veracruz | 18°36'      | 95°39'      |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 11    | <i>Dormitator maculatus</i> [E]      | Alvarado Lagoon, Veracruz                           | 18°45'      | 95°45'      |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 12    | <i>Dormitator latifrons</i> [E]      | Tres Palos Lagoon, Guerrero                         | 16°47'47''  | 99°44'30''  |                           |            |                    |
| <i>N. golvani</i> 13    | <i>Dormitator latifrons</i> [E]      | Chamela Estuary, Jalisco                            | 19°31'20''  | 104°04'53'' |                           |            |                    |



|                      |                                 |                               |              |              |          |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|----------|
| <i>N. golvani</i> 14 | <i>Dormitator latifrons</i> [E] | Cuitzmala River, Jalisco      | 19°23'27''   | 104°58'28''  |          |
| <i>N. golvani</i> 15 | <i>Petenia splendida</i> [C]    | Champoton River, Campeche     | 19°16'43''   | 90°37'26''   |          |
| <i>N. roseum</i> 1   | <i>Achiurus mazatlanus</i>      | El Caimanero Estuary, Sinaloa | 25°36'30''   | 108°26'25''  |          |
| <i>N. roseum</i> 2   | <i>Citharichthys gilbertei</i>  | La Tovara Estuary, Nayarit    | 21°31'37''   | 105°14'29''  |          |
| <i>N. schmidtii</i>  | <i>Trachemys s. venusta</i>     | Pantanos de Centla, Tabasco   | 18°28'18.9'' | 92°39'14.9'' |          |
| <i>N. saginatus</i>  | Nd                              | Nd                            | Nd           | Nd           | AY829091 |

---

TABLE II. Tree statistics for rDNA datasets. Combined (ITS's + LSU), large-subunit LSU and Internal Transcribed Spacers (ITS's) datasets. Number of informative characters, consistent index and tree length refer to parsimony inference. Pinv (proportion of invariable sites), Gd (shape of gamma distribution), and  $-\ln$  likelihood refer to maximum likelihood inference.

| Statistics               | ITSs + LSU | LSU        | ITSs       |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| Total characteres        | 1108       | 696        | 412        |
| Uninformative characters | 65         | 34         | 31         |
| Constant characters      | 575        | 329        | 183        |
| Informative characters   | 468        | 270        | 198        |
| Consistent index         | 0.7758     | 0.8011     | 0.7465     |
| Tree length              | 1048       | 548        | 501        |
| $-\ln$ likelihood        | 5897.36984 | 3302.18233 | 2517.06499 |
| Pinv                     | 0.4214     | 0          | 0.395      |
| Gd                       | 2.844      | 0.363      | equal      |

TABLE III. Average of genetic divergence of the 4 major clades, within each lineages of *Neoechinorhynchus golvani* and among congeneric species. ITS's (upper matrix) and LSU (lower matrix). Parenthesis inside shows the values of range (minimum and maximum) of genetic divergence. Jukes-Cantor distances are expressed as percentages.

| <b>LSU / ITS</b>    | <i>N. roseum</i>   | <i>N. schmidtii</i> | <i>N. saginatus</i> | <i>N. golvani 1</i> | <i>N. golvani 2</i> | <i>N. golvani 3</i> | <i>N. golvani 4</i> | <b>Intraclade LSU</b> | <b>Intraclade ITSs</b> |
|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>N. roseum</i>    | —                  | 52.4 (52.1 - 52.7)  | 45.8 (45.5 - 46)    | 49.2 (48.4 - 49.8)  | 48.7 (47.9 - 49.8)  | 42.7 (42.1 - 43)    | 45.1                | 0.1                   | 0.01                   |
| <i>N. schmidtii</i> | 29.9 (29.8 - 30)   | —                   | 24.1                | 38.8 (38.6 - 39.4)  | 39.9 (39.8 - 40.2)  | 38.8 (38.7 - 39.1)  | 38.1                | —                     | —                      |
| <i>N. saginatus</i> | 31 (30.9 - 31.1)   | 8.67                | —                   | 43.9 (42.4 - 44.7)  | 40.5 (40.2 - 40.6)  | 42.4 (42.1 - 42.6)  | 39.7                | —                     | —                      |
| <i>N. golvani 1</i> | 31.7 (31.2 - 33.5) | 29.1 (28.3 - 30.5)  | 32.3 (32 - 33.1)    | —                   | 29.5 (28.4 - 30.3)  | 28.9 (28.5 - 29.6)  | 40.9 (40.2 - 42.4)  | 1.4 (0.1 - 4.4)       | 1.6 (0.2 - 4.6)        |
| <i>N. golvani 2</i> | 35.3 (35.2 - 35.4) | 32 (31.9 - 32.2)    | 34.1 (34 - 34.2)    | 19.2 (18.7 - 19.3)  | —                   | 15 (14.8 - 15.4)    | 37.4 (36.9 - 38.1)  | 0.09 (0.14)           | 0.6 (0.5 - 0.7)        |
| <i>N. golvani 3</i> | 35.9 (35.7 - 36.2) | 33.6 (33.5 - 33.7)  | 35.4 (35.3 - 35.6)  | 19.2 (18.7 - 20.6)  | 7.8 (7.7 - 8)       | —                   | 38.2 (37.8 - 38.7)  | 0.09 (0.14)           | 0.3 (0.2 - 0.5)        |
| <i>N. golvani 4</i> | 35.2               | 33.7                | 35.1                | 19.1 (18.7 - 20.1)  | 18.3 (18.2 - 18.4)  | 19.1 (19 - 19.2)    | —                   | —                     | —                      |

## CONCLUSIONES

1. El porcentaje de la divergencia genética interpoblacional en *Neoechinorhynchus golvani*, con base en las secuencias de genes nucleares (ITS1, 5.8S, ITS2 y de la región D2-D3 del 28S rDNA), osciló entre 30-40% y 19%, respectivamente.

2. Con base en los resultados de los análisis filogenéticos, derivados de las bases de datos individuales y del combinado, más el porcentaje de divergencia genética entre las 14 poblaciones, detectamos que *Neoechinorhynchus golvani* es un complejo de especies crípticas formado por cuatro linajes:

Linaje 1. Asociado con huéspedes de la familia Cichlidae.

Linaje 2 y 3. Posiblemente, asociados con huéspedes de la familia Eleotriade.

Linaje 4. Quizás asociado con la historia geológica de las tierras bajas de la Península de Yucatán.

3. Los linajes 2 (vertientes del Pacífico) y 3 (vertientes del Golfo de México), asociados con peces eleótridos, muestran un alto porcentaje de divergencia genética, sugiriendo una supresión del flujo génico entre ambos linajes debido a su aislamiento geográfico.

4. El linaje 4 esta poco sustentado debido a la carencia de muestras (representado por un individuo). Por tanto, se sugiere recolectar más ejemplares de *Neoechinorhynchus golvani* de las tierras bajas de la Península de Yucatán, en donde este parásito se ha registrado asociado con ciclidos.

5. La historia evolutiva de los huéspedes al parecer es la principal causa que explica el proceso de especiación de los cuatro linajes de *Neoechinorhynchus golvani*, pero los eventos vicariantes de la región juegan un papel relevante.

6. Los eventos de host-switching podrían explicar las asociaciones evolutivas entre los linajes de Cichlidae-*N. golvani* y Eleotridae-*N. golvani*.

7. Las asociaciones observadas entre *Neoechinorhynchus golvani* y las otras nueve familias de peces (Ariidae, Belonidae, Centropomidae, Gerridae, Goobidae, Hemiramphidae, Heptapteridae, Ictaluridae y Lutjanidae) pueden deberse a eventos de host-sharing o infecciones accidentales.

## PERSPECTIVAS

Las distancias genéticas, las relaciones filogenéticas, el escenario biogeográfico y las asociaciones ecológico-evolutivas inferidas en el presente trabajo para el complejo de especies crípticas de *N. golvani* dan pauta a generar nuevas preguntas. Sin embargo, el formular cuestionamientos *a posteriori* tendrá que llevar explícitamente contestadas las siguientes preguntas *a priori*: 1. ¿Cuáles son los huéspedes intermediarios de cada uno de los linajes detectados para el complejo de especies crípticas de *N. golvani*?; 2. ¿Existe diferencia genética intrapoblacional dentro del complejo de especies crípticas de *N. golvani*? y; 3. ¿Existen patrones filogeográficos entre el complejo de especies crípticas de *N. golvani*?

El escenario ecológico podría estar jugando un papel preponderante en la evolución de las poblaciones de *N. golvani*, por tanto, es posible formular los siguientes cuestionamientos: ¿algunas poblaciones de *N. golvani* presentan una mayor tasa de evolución?, ¿afecta el ambiente salobre o dulceacuícola en estos linajes?, ¿existen haplotipos diferenciales en función de los huéspedes parasitados en ambientes cerrados como los lagos?, ¿existen patrones filogeográficos en función de la historia evolutiva de los huéspedes?, ¿cuáles son los mecanismos evolutivos que afectan la especiación críptica en cada uno de los linajes de *N. golvani* (selección natural, deriva génica, mutación, migración, endogamia)?, ¿existe diferenciación genética a nivel de huéspedes intermediarios en relación a los definitivos?, ¿pueden reflejar estos patrones microevolutivos la historia filogenética del género *Neoechinorhynchidae*?

Por tanto, realizar estudios ubicados en la delgada línea entre la macro y la microevolución podrá ayudar a comprender, desde una perspectiva ecológico-evolutiva, los procesos, patrones y mecanismos que afectan la evolución de las especies parasitas.

## REFERENCIAS

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

Aguilar-Aguilar R., Contreras-Medina R. y G. Salgado-Maldonado. 2003. Parsimony Analysis of Endemicity (PAE) of Mexican hydrological basins based on helminth parasites of freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 30: 1861-1872.

Aguilar-Aguilar R., Contreras-Medina R., Martínez-Aquino A., Salgado-Maldonado G. y A. González-Zamora. 2005. Aplicación del análisis de parsimonia de endemismos (PAE) en los sistemas hidrológicos de México: Un ejemplo con helmintos parásitos de peces dulceacuícolas. En: Llorente J. y J.J. Morrone (Editores). Regionalización biogeografía en Iberoamérica y tópicos. Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Pp. 227-239.

Aguilar-Aguilar R., Salgado-Maldonado G., Contreras-Medina R. y A. Martínez-Aquino. 2008. Richness and endemism of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 435-444.

Amin O.M. 1985. Classification. En: Crompton D.W.T. y B.B. Nickol (Editores). Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Londres. Pp. 27-72.

Amin O.M. 2000. Acanthocephala in the Neotropical Region. En: Salgado-Maldonado G., García-Aldrete A.N. y V.M. Vidal-Martínez (Editores). Metazoan parasites in the neotropics: A systematic and ecological perspective. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Pp. 167-174.

Amin O.M. 2002. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles & Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology* 53: 1-18.

Amin O.M. y Christison W.K. 2005. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *dorsovaginatus* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the dusky kob *Argyrosomus japonicus* (Sciaenidae) on the southern coast of South Africa. *Systematic Parasitology* 61: 173-179.

Amin O.M., Abdullah M.A.S. y F.T. Mhaisen. 2003. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *zabensis* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from freshwater fish in northern Iraq. *Folia Parasitologica* 50: 293–297.

Arriga-Cabrera L., Aguilar-Sierra V. y J. Alcocer-Durand. 2000. Aguas continentales y diversidad biológica de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F. 327 p.

Awise J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. Pp. 684.



Barger M.A., Thatcher E.V. y B.B. Nickol. 2004. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology* 71: 1-3.

Bell A.S., Sommerville C. y V.E. Tellervo. 2001. A molecular phylogeny of the genus *Ichtyocotylurus* (Digenea, Strigeidae). *International Journal for Parasitology* 31: 833-842.

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

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

Bowles J., Blair D. y D.P. McManus. 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110: 317-328.

Bullock W.L. 1970. The zoogeography and host relations of the acanthocephalan parasites of fishes. Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. Bethesda: The American Fisheries Society. Pp. 162-173.

Brooks D. y Hoberg E.P. 2000. Triage for the biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Parasitology* 67: 1-25.

Criscione C.D. y Blouin M.S. 2004. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution* 58: 198-202

Criscione D.C., Poulin R. y S.M. Blouin. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14: 2247-2257.

De Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En: Howard D.J. y S.H. Berlocher (Editores). *Endless Forms: species and speciation*. Oxford University Press. Pp. 57-75.

Després L., Kruger F.J., Imbert-Establet D. y M.L. Adamson. 1995. ITS2 Ribosomal RNA Indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *International Journal for Parasitology* 25: 1509-1514.

Donald K.M., Kennedy M., Poulin R. y H.G. Spencer. 2004. Host specificity and molecular phylogeny of larval Digenea isolated from New Zealand and Australian topshells (Gastropoda: Trochidae). *International Journal for Parasitology* 34: 557-568.

Ferrusquía-Villafranca I. 1998. Geología de México: una sinopsis. En: Ramamoorthy T.P., Bay R., Lot A. y J. Fa (Editores). *Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 792.

Flores-Villela O. 1998. Herpetofauna de México: Distribución y Endemismo. En: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y J. Fa (Editores). Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 271-278.

García-Varela M., Pérez-Ponce de León G., De la Torre P., Cummings M.P., Sarma S.S.S. y J.P. Laclette. 2000. Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S Ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 50: 532-540.

García-Varela M., Aznar J.A., Pérez-Ponce de León G. y J.P. Laclette. 2005. Molecular phylogeny of *Corynosoma* Lühe, 1904 (Acanthocephala), based on 5.8S and Internal Transcribed Spacer sequences. *Journal of Parasitology* 91: 345-352.

Garey J.R. y Wolstenholme D.R. 1989. Platyhelminth mitochondrial DNA: Evidence for early evolutionary origin of a tRNA<sup>ser</sup> AGN that contains a dihydrouridine-arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *Journal of Molecular Evolution* 28: 374-387.

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

Guo-Chiuan H., Jacobs D.E., Krecek R.C., Gasser R.B. y Chilton N.B. 1996. *Strongylus asini* (Nematoda, Strongyloidea): genetic relationships with other *Strongylus* species determined by ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology* 26: 1407-1411.

Hillis D.M. y Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.

Homan W.L. y Mank T.G. 2001. Human giardiasis: genotyped linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology* 31: 822-826.

Huidobro L., Morrone J.J., Villalobos J.L. y F. Álvarez. 2006. Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography* 33: 731-741.

Jousson O., Bartoli P. y J. Pawlowski. 1998. Molecular phylogeny of Mesometridae (Trematoda, Digenea) with its relation to morphological changes in parasites. *Parasite* 5: 365-369.

Jousson O., Bartoli P. y J. Pawlowski. 2000. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *Journal of Evolutionary Biology* 13: 778-785.

Kennedy C.R. 2006. Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press. 249 p.

Knowlton N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 24: 189-216.

Král'ová-Hromadová I., Tietz D.F., Shinn A.P. y M. Špakulová. 2003. ITS rDNA sequences of *Pomphorhynchus laevis* (Zoega in Müller, 1776) and *P. lucyi* Williams & Rogers, 1984 (Acanthocephala: Palaeacanthocephala). *Systematic Parasitology* 56: 141-145.

Luo H.Y., Nie P., Zhang Y.A., Wang G.T. y W.J. Yao. 2002. Molecular variation of *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Pseudophyllidae) in different fish host species based on ITS rDNA sequences. *Systematic Parasitology* 52: 159-166.

Luo H.Y., Nie P., Zhang Y.A., Yao W.J. y G.T. Wang. 2003. Genetic differentiation in populations of the cestode *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda: Pseudophyllidea) as revealed by eight microsatellite markers. *Parasitology* 126: 493-501.

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

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

Marques J.F., Santos M.J., Gibson D.I., Cabral H.N. y P.D. Olson. 2007. Cryptic species of *Didymobothrium rudolphii* (Cestoda: Spathebothriidae) from the sand sole, *Solea lascaris*, off the Portuguese coast, with an analysis of their molecules, morphology, ultrastructure and phylogeny. *Parasitology* 134: 1057-1072.

Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. En: Claridge M.F., Dawah H.A. y M.R. Wilson (Editores). Species: the units of biodiversity. Chapman y Hall, Londres. Pp. 381-424.

Mayden R.L. 1999. Consilience and a hierarchy of species concepts: Advances toward closure on the species puzzle. *Journal of Nematology* 31: 95-116.

Mayr E. 1991. Principles of systematic zoology. Segunda Edición. McGraw-Hill, Inc. E.U.A. 475 p.

Miller R.R., Minckley W.L. y S.M. Norris. 2005. Freshwater fishes of Mexico. The University of Chicago Press, Chicago. 490 p.

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

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

Monks S. 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Systematic Parasitology* 48: 81-116.

Morgan J.A.T. y Blair D. 1995. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: and aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology* 111: 609-615.

Murrell K.D. y Pozio E. 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology* 30: 1339-1349.

Near T.J. 2002. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integrative and Comparative Biology* 42: 668-677.

Near T.J., Garey J.R. y S.A. Nadler. 1998. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 287-298.

Nieberding C., Morand S., Libois R. y J.R. Michaux. 2004. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceeding of the Royal Society of London* 271: 2559-2568.

O'Mahony E.M., Bradley D.G., Kennedy C.R. y C.V. Holland. 2004. Evidence for the hypothesis of strain formation in *Pomporhynchus leavis* (Acanthocephala): an investigation using mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* 129: 341-347.

Ortega-Gutiérrez R., Sedlock D. y R.C. Speed. 2000. Evolución tectónica de México durante el fanerozoico. En: Llorente B.J., Gonzáles-Soriano E. y N. Papavero (Editores). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su

conocimiento. Volumen II. Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. Pp. 3-59.

Palm H.W., Waeschenbach A. y D.T.J. Littlewood. 2007. Genetic diversity in the trypanorhynch cestode *Tentacularia coryphanae* Bosc, 1797: evidence for a cosmopolitan distribution and low host specificity in the teleost intermediate host. *Parasitology Research* 101: 153-159.

Pérez-Ponce de León G. y Choudhury A. 2005. Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and process. *Journal of Biogeography* 32: 645-659.

Perrot-Minnot M-J. 2004. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomporhynchus laevis* (Acanthocephala). *International Journal for Parasitology* 34: 45-54.

Picca A., Helguera M., Salomón N. y A. Carrera. 2002. Marcadores Moleculares. En: Echenique V., Rubinstein C. y L. Mroginski (Editores). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Pp. 61-68.

Poulin R. y Morand S. 2004. *Parasite Biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 216 p.



Reversat J., Renaud F. y C. Maillard. 1989. Biology of parasite population: the differential specificity of the genus *Helicometra* Odhner, 1902 (Trematoda: Opecoelidae) in the Mediterranean Sea demonstrated by enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 19: 885-890.

Rentería-Alcántara M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L.E., Souza V. y X. Aguirre (Editores). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México D.F. Pp. 541-566.

Salgado-Maldonado G. 1978. Acantocéfalos de peces IV. Descripción de dos especies nuevas de *Neoechinorhynchus* Hamann, 1892 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) y algunas consideraciones sobre este género. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 49: 35-48.

Salgado-Maldonado G. 2006. Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa* 1324: 1-357.

Salgado-Maldonado G. y Kennedy C.R. 1997. Richness and similarity of helminth communities in the tropical cichlid fish *Cichlasoma urophthalmus* from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Parasitology* 114: 581-590.

Schmidt G.D. 1985. Development and life cycles. En: Crompton D.W.T. y B.B. Nickol. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Londres. Pp. 273-305.

Schmidt G.D. 1988. Essentials of parasitology. Wm. C. Brown Publisher. Pp. 298.

Scholz T., Vargas-Vázquez J., Moravec F., Vivas-Rodríguez C. y E. Mendoza-Franco. 1996. Cestoda y Acanthocephala of fishes from cenotes (=sinkholes) of Yucatan, Mexico. *Folia Parasitologica* 43: 141-152.

Sites J.W. y Marshall J.C. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 462-470.

Simpson J. 1997. Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76.

Steinauer M.L., Parham J.E. y B.B. Nickol. 2006. Geographic analysis of host use, development, and habitat use of an acanthocephalan species, *Leptorhynchoides thecatus*. *Journal of Parasitology* 92: 464-472.

Steinauer M.L., Nickol B.B. y G. Ortí. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology* 16: 4097-4109.

Verneau O., Catzeflis F.M. y F. Renaud. 1997a. Molecular relationships between closely related species of *Bothriocephalus* (Cestoda: Platyhelminthes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 201-207.

Verneau O., Renaud F. y F.M. Catzefflis. 1997b. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. *Molecular Biology and Evolution* 14: 630-636.

Vilas R., Criscione C.D. y M.S. Blouin. 2005. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131: 1-8.

Violante-González J., Aguirre-Macedo M.L. y E.F. Mendoza-Franco. 2007. A checklist of metazoan parasites of fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Parasitology Research* 102: 151-161.

Westenberger S.J., Strum N.R. y D. Yanega. 2004. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology* 129:537-547.

**Apéndice.** Registros de *Neoechinorhynchus golvani* en México (Salgado-Maldonado 2006; Violante-Gozález *et al.*, 2007).

| <b>Familia</b>                  | <b>Hospedero</b>                      | <b>Localidad</b>                          | <b>Georreferencias</b>                         |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ariidae                         | <i>Ariopsis (Arius) felis</i>         | Lago El Rosario, Tabasco                  | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
|                                 | <i>Cathorops melanopus</i>            | Lago El Rosario, Tabasco                  | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
| Belonidae                       | <i>Strongylura</i> sp.                | Lago El Rosario, Tabasco                  | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
| Centropomidae                   | <i>Centropomus nigrescens</i>         | Laguna de Tres Palos, Guerrero            | 99°47'N; 16°48'W                               |
|                                 | <i>Centropomus robalito</i>           | Laguna de Tres Palos, Guerrero            | 99°47'N; 16°48'W                               |
| Cichlidae                       | <i>Amphilophus robertsoni</i>         | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche | 18°37'50''N; 91°56'21''W                       |
|                                 | <i>Archocentrus nigrofasciatus</i>    | Río Tempoal, Atlapexco, Hidalgo           | 20°55'16''N; 98°17'27''W                       |
|                                 | <i>Cichlasoma beani</i>               | Río Santiago, Presa Aguamilpa, Nayarit    | 21°46'42''N; 104°55'36''W                      |
|                                 | <i>Cichlasoma geddesi</i>             | Lago Santa Anita, Tabasco                 | 18°22'15''N; 92°53'10''W                       |
|                                 |                                       | Lago El Rosario, Tabasco                  | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
|                                 |                                       | Lago El Vapor, Campeche                   | 18°18'38''N; 91°50'09'' W                      |
|                                 |                                       | Estanque Tucta, Tabasco                   | 18°10'40''N; 92°56'01''W                       |
| <i>Cichlasoma istlanum</i>      | Presa Tepecoacuilco, Guerrero         | 18°18'01''N; 99°28'16''W                  |                                                |
| <i>Cichlasoma octofasciatum</i> | Arroyo San Juan Evangelista, Veracruz | No registrado                             |                                                |

**Apéndice.** Continuación.

| <b>Familia</b>                 | <b>Hospedero</b>                           | <b>Localidad</b>                                  | <b>Georreferencias</b>   |
|--------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Cichlasoma rectangulare</i> |                                            | Lago Santa Anita, Tabasco                         | 18°22'15''N; 92°53'10''W |
|                                |                                            | Lago El Chiribital, Tabasco                       | 17°59'24''N; 93°04'22''W |
|                                |                                            | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W |
|                                |                                            | Río San Pedro, Tabasco                            | 17°45'00''N; 91°23'00''W |
|                                |                                            | Río Vicente Guerrero, Tabasco                     | 18°24'20''N; 92°54'35''W |
|                                |                                            | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche         | 18°37'50''N; 91°56'21''W |
| <i>Cichlasoma salvini</i>      |                                            | Lago Las Ilusiones, Tabasco                       | 17°59'46''N; 92°56'17''W |
| <i>Cichlasoma</i> sp.          |                                            | Lago El Chiribital, Tabasco                       | 17°59'24''N; 93°04'22''W |
| <i>Cichlasoma</i> sp.          |                                            | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W |
| <i>Cichlasoma trimaculatum</i> |                                            | Laguna de Tres Palos, Guerrero                    | 99°47'N; 16°48'W         |
| <i>Cichlasoma urophthalmus</i> |                                            | Lago Santa Anita, Tabasco                         | 18°22'15''N; 92°53'10''W |
|                                |                                            | Río Usumacinta, Emiliano Zapata, Tabasco          | 17°45'00''N; 91°46'00''W |
|                                |                                            | Lago El Chiribital, Tabasco                       | 17°59'24''N; 93°04'22''W |
|                                |                                            | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W |
|                                |                                            | Río San Pedro, Tabasco                            | 17°45'00''N; 91°23'00''W |
|                                |                                            | Río Vicente Guerrero, Tabasco                     | 18°24'20''N; 92°54'35''W |
|                                |                                            | Cenote Chen-há, Yucatán                           | 20°41'24''N; 89°52'36''W |
|                                |                                            | Río Usumacinta, El Corozal (= El Guanál), Tabasco | 17°44'00''N; 91°35'33''W |
|                                |                                            | Lago El Vapor, Campeche                           | 18°18'38''N; 91°50'09''W |
|                                | Laguna de Términos, Río Palizada, Campeche | 18°17'16''N; 91°56'52''W                          |                          |

**Apéndice.** Continuación.

| Familia | Hospedero                       | Localidad                                         | Georreferencias                                |
|---------|---------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|         |                                 | Laguna de Términos, El Cayo, Campeche             | 18°30'10''N; 91°41'20''W                       |
|         |                                 | Laguna de Celestún, Yucactán                      | 20°45'00''-20°58'00''N; 90°15'00''-90°25'00''W |
|         |                                 | Laguna Atasta, Campeche                           | 18°37'08''N; 92°06'15''W                       |
|         |                                 | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche         | 18°37'50''N; 91°56'21''W                       |
|         |                                 | Río Champotón, Campeche                           | 19°21'00''N; 90°40'00''W                       |
|         |                                 | Laguna de Términos, Río Santa Gertrudis, Campeche | 18°26'51''N; 91°49'38''W                       |
|         |                                 | Aguada Santa Elena, Tabasco                       | No registrado                                  |
|         |                                 | Estanque Tucta, Tabasco                           | 18°10'40''N; 92°56'01''W                       |
|         |                                 | Mitza, Yucatán                                    | 21°26'36''N; 89°41'50''W                       |
|         |                                 | Pantanos de Centla, Tabasco                       | 17°57'00''-18°39'00''N; 92°06'00''-92°47'00''W |
|         |                                 | Laguna de Alvarado, Veracruz                      |                                                |
|         |                                 | Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz             | 18°36'00''N; 95°39'00''W                       |
|         | <i>Herichthys cyanoguttatus</i> | Río Tempoal, Atlapexco, Hidalgo                   | 20°55'16''N; 98°17'27''W                       |
|         | <i>Herichthys labridens</i>     | Río Tempoal, Atlapexco, Hidalgo                   | 20°55'16''N; 98°17'27''W                       |
|         | <i>Herichthys pearsei</i>       | Lago Santa Anita, Tabasco                         | 18°22'15''N; 92°53'10''W                       |
|         |                                 | Lago El Chiribital, Tabasco                       | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|         |                                 | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|         |                                 | Río San Pedro, Tabasco                            | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|         |                                 | Río Vicente Guerrero, Tabasco                     | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
|         |                                 | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche         | 18°37'50''N; 91°56'21''W                       |
|         |                                 | Lago El Vapor, Campeche                           | 18°18'38''N; 91°50'09''W                       |

**Apéndice.** Continuación.

| <b>Familia</b> | <b>Hospedero</b>                    | <b>Localidad</b>                                  | <b>Georreferencias</b>                         |
|----------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                | <i>Parachromis friedrichstahlii</i> | Estanque Tucta, Tabasco                           | 18°10'40''N; 92°56'01''W                       |
|                | <i>Parachromis managuensis</i>      | Río Usumacinta, Emiliano Zapata, Tabasco          | 17°45'00''N; 91°46'00''W                       |
|                |                                     | Río Usumacinta, El Corozal (= El Guanal), Tabasco | 17°44'00''N; 91°35'33''W                       |
|                |                                     | Lago El Vapor, Campeche                           | 18°18'38''N; 91°50'09''W                       |
|                |                                     | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche         | 18°37'50''N; 91°56'21''W                       |
|                |                                     | Pantanos de Centla, Tabasco                       | 17°57'00''-18°39'00''N; 92°06'00''-92°47'00''W |
|                |                                     | Lago El Manguito, Tabasco                         | 18°12'50''N; 92°50'05''W                       |
|                |                                     | Lago El Pozo, Tabasco                             | 18°00'35''N; 92°48'11''W                       |
|                |                                     | Río Usumacinta, Balancán, Tabasco                 | 17°45'08''N; 91°32'45''W                       |
|                | <i>Parachromis motaguensis</i>      | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                | <i>Petenia splendida</i>            | Lago El Chiribital, Tabasco                       | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|                |                                     | Río Usumacinta, Emiliano Zapata, Tabasco          | 17°45'00''N; 91°46'00''W                       |
|                |                                     | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco          | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                |                                     | Río San Pedro, Tabasco                            | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|                |                                     | Río Vicente Guerrero, Tabasco                     | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
|                |                                     | Lago Santa Anita, Tabasco                         | 18°22'15''N; 92°53'10''W                       |
|                |                                     | Lago El Vapor, Campeche                           | 18°18'38''N; 91°50'09''W                       |
|                |                                     | Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche         | 18°37'50''N; 91°56'21''W                       |
|                | <i>Thorichthys ellioti</i>          | Arroyo San Juan Evangelista, Veracruz             | No registrado                                  |

**Apéndice.** Continuación.

| <b>Familia</b>              | <b>Hospedero</b> | <b>Localidad</b>                         | <b>Georreferencias</b>                         |
|-----------------------------|------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Thorichthys helleri</i>  |                  | Lago El Rosario, Tabasco                 | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
|                             |                  | Lago Las Ilusiones, Tabasco              | 17°59'46''N; 92°56'17''W                       |
|                             |                  | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
| <i>Thorichthys meeki</i>    |                  | Lago El Chiribital, Tabasco              | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|                             |                  | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                             |                  | Río San Pedro, Tabasco                   | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|                             |                  | Río Vicente Guerrero, Tabasco            | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
| <i>Thorichthys pasionis</i> |                  | Lago El Chiribital, Tabasco              | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|                             |                  | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                             |                  | Río San Pedro, Tabasco                   | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|                             |                  | Río Vicente Guerrero, Tabasco            | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
|                             |                  | Lago Las Ilusiones, Tabasco              | 17°59'46''N; 92°56'17''W                       |
|                             |                  | Estanque Tuca, Tabasco                   | 18°10'40''N; 92°56'01''W                       |
|                             |                  | Camellones Chontales, Tabasco            | 17°45'08''N; 92°35'10''W                       |
|                             |                  | Lago El Pozo, Tabasco                    | 18°00'35''N; 92°48'11''W                       |
| <i>Vieja fenestrata</i>     |                  | Lago Santa Anita, Tabasco                | 18°22'15''N; 92°53'10''W                       |
|                             |                  | Lago El Chiribital, Tabasco              | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|                             |                  | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                             |                  | Río San Pedro, Tabasco                   | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|                             |                  | Río Vicente Guerrero, Tabasco            | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
|                             |                  | Lago de Catemaco, Veracruz               | 18°25'00''N; 95°07'00''W                       |



**Apéndice.** Continuación.

| <b>Familia</b> | <b>Hospedero</b>             | <b>Localidad</b>                                                                                                                                                                                                                                 | <b>Georreferencias</b>                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                | <i>Vieja synspila</i>        | Lago El Rosario, Tabasco<br>Lago Las Ilusiones, Tabasco<br>Lago Santa Anita, Tabasco<br>Lago El Centenario (= Silvituc), Campeche<br>Lago El Vapor, Campeche<br>Lago Atasta, Campeche<br>Estanque Tucta, Tabasco<br>Laguna de Términos, Campeche | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W<br>17°59'46''N; 92°56'17''W<br>18°22'15''N; 92°53'10''W<br>18°37'50''N; 91°56'21''W<br>18°18'38''N; 91°50'09''W<br>18°37'08''N; 92°06'15''W<br>18°10'40''N; 92°56'01''W<br>18°19'13''-18°29'04''N; 91°44'36''-91°51'31''W |
| Eleotridae     | <i>Dormitator latifrons</i>  | Laguna Tres Palos, Guerrero                                                                                                                                                                                                                      | 16°41'00''-16°50'00''N; 99°37'00''-99°47'00''W                                                                                                                                                                                                                           |
|                | <i>Dormitator maculatus</i>  | Laguna de Alvarado, Papaloapan, Veracruz<br>Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz                                                                                                                                                                | 18°45'00''N; 95°45'00''W<br>18°36'00''N; 95°39'00''W                                                                                                                                                                                                                     |
|                | <i>Eleotris picta</i>        | Laguna de Tres Palos, Guerrero                                                                                                                                                                                                                   | 16°48'N; 99°47'W                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                | <i>Gobiomorus dormitor</i>   | Río Tecolutla, Veracruz<br>Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz<br>Río La Antigua, Villa El Salmoral, Veracruz                                                                                                                                  | 20°26'00''N; 97°10'00''W<br>18°36'00''N; 95°39'00''W<br>19°20'00''N; 96°23'00''W                                                                                                                                                                                         |
|                | <i>Gobiomorus maculatus</i>  | Laguna de Tres Palos, Guerrero                                                                                                                                                                                                                   | 99°47'N; 16°48'W                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Gerridae       | <i>Diapterus peruivius</i>   | Laguna de Tres Palos, Guerrero                                                                                                                                                                                                                   | 99°47'N; 16°48'W                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Gobiidae       | <i>Gobionellus sagittula</i> | Laguna de Tres Palos, Guerrero                                                                                                                                                                                                                   | 99°47'N; 16°48'W                                                                                                                                                                                                                                                         |

**Apéndice.** Continuación.

| <b>Familia</b> | <b>Hospedero</b>               | <b>Localidad</b>                         | <b>Georreferencias</b>                         |
|----------------|--------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Hemiramphidae  | <i>Hyporhamphus mexicanus</i>  | Lago El Rosario, Tabasco                 | 17°50'00''-17°56'00''N; 93°45'00''-99°56'00''W |
| Heptapteridae  | <i>Rhamdia guatemalensis</i>   | Río Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz    | 18°36'00''N; 95°39'00''W                       |
| Ictaluridae    | <i>Ictalurus furcatus</i>      | Lago El Chiribital, Tabasco              | 17°59'24''N; 93°04'22''W                       |
|                |                                | Lago El Espino (= El Horizonte), Tabasco | 18°14'57''N; 92°49'59''W                       |
|                |                                | Río San Pedro, Tabasco                   | 17°45'00''N; 91°23'00''W                       |
|                |                                | Río Vicente Guerrero, Tabasco            | 18°24'20''N; 92°54'35''W                       |
| Lutjanidae     | <i>Lutjanus argentiventris</i> | Laguna de Tres Palos, Guerrero           | 99°47'N; 16°48'W                               |

Amin (2002) registró *N. golvani* para Brasil; sin embargo, este registro resulta dudoso para el mismo autor por lo que no es considerado como válido para el presente trabajo (Amin, com. pers.).

