



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

ESTUDIO FILOGENÉTICO Y HELMINTOLÓGICO DE *LITHOBATES MEGAPODA*
EN EL ESTADO DE JALISCO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE VELARDE AGUILAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. VIRGINIA LÉON RÈGAGNON
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: M EN C LUIS GARCÍA PRIETO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2014



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de mayo de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VELARDE AGUILAR MARÍA GUADALUPE** con número de cuenta **512026628** con la tesis titulada **“Estudio filogenético y helmintológico de Lithobates megapoda en el estado de Jalisco”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VIRGINIA LEÓN RÉGAGNON**:

Presidente: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Vocal: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
Secretario: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Suplente: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA
Suplente: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de agosto de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por todas las facilidades prestadas durante la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la elaboración de este trabajo.

Este proyecto se llevo a cabo gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): IN203911 y IN209414.

Al apoyo financiero PAEP 2013, gracias al cual se presentaron avances de este proyecto en el 3er Congreso Nacional sobre la Investigación de Anfibios y Reptiles de la Asociación para la Investigación y Conservación de Anfibios y Reptiles, A. C.

A la Red Temática del Código de Barras de la Vida (MEXBOL) por el apoyo financiero otorgado para asistir como ponente a la 2da Reunión Nacional de la Red.

Deseo expresar un agradecimiento muy especial para la tutora principal de esta tesis, la Dra. Virginia León Règagnon, por todo el apoyo, asesoría y aprendizaje recibido en todo momento.

Agradezco mucho al M. en C. Luis García Prieto y al Dr. Oscar A. Flores Villela, miembros del comité tutorial, por toda la asesoría y ayuda recibida a lo largo de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Víctor Sánchez Cordero, director del Instituto de Biología (IB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme el uso de las instalaciones (Laboratorios, Secuenciador Automático, Microscopio electrónico etc.).

A la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología por todas las facilidades que prestaron para que se realizara este trabajo de investigación.

A todas las personas que son parte del Posgrado en Ciencias Biológicas por su ayuda durante este proceso, de manera muy especial a Rocío por su amable atención en todo momento.

Me siento infinitamente agradecida con la Dra. Virginia León, directora del presente trabajo, por todo el apoyo que he recibido de ella desde el primer día que la conocí, por haberme brindado la confianza y la oportunidad para participar con ella en tantos proyectos. Es un honor haber sido estudiante de una persona tan profesional, tan apasionada de su trabajo, con ideas tan brillantes y desde luego un gran ser humano.

Al M. en C. Luis García Prieto por su asesoría en la identificación de Céstodos, por ser tan amable y paciente al compartir sus conocimientos conmigo y estar siempre dispuesto a ayudarme. También agradezco su colaboración en el depósito y préstamo de ejemplares de la CNHE, muchas gracias por todo Luis, eres una persona muy valiosa para la CNHE.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros del jurado: Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, Dr. Oscar A. Flores Villela, Dr. Alejandro F. Ocegüera Figueroa y Dr. Alejandro Zaldívar Riverón por los valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Agradezco enormemente a las personas que me ayudaron en la recolecta de hospederos y de helmintos: Rodolfo Pérez, Angélica Najar, Angeles Romero, Alejandro Ocegüera, Javier Alcántar, Ricardo Salas, Magdalena Velarde, Ricardo Salazar y Eugenia Aguilar. También agradezco a los señores Juan de Villa Corona y Juan de Jamay, Jalisco, por ayudarme en la recolecta de ranas. Muchas gracias a todos, sin su valiosa ayuda no hubiera sido posible realizar este proyecto.

A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del IB, por la asesoría, ayuda y servicios prestados en el procesamiento de material y obtención de microfotografías de microscopía electrónica de barrido.

A la M. en C. Laura Márquez del Laboratorio de Biología Molecular del IB, por su amable asesoría y apoyo brindados en la amplificación y secuenciación del material de la presente tesis.

A la Universidad de Colima por permitirme el uso de sus instalaciones durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Jesús Lara Chávez del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Colima, porque amablemente nos ha dado hospedaje en su laboratorio.

Al Biól. Ricardo Aguilar Alonso, curador del Museo de Paleontología de Guadalajara por su ayuda y colaboración en el depósito de ejemplares de ranas en la colección ósea.

Agradezco a todos mis profesores de posgrado por todo el valioso conocimiento que me brindaron, gracias al cual fue posible realizar este trabajo de investigación.

Quiero agradecer a Gela Romero, por su valiosa ayuda durante la recolecta de los helmintos de este trabajo, por tanta ayuda que he recibido de ella desde que la conozco en diferentes aspectos desde académicos hasta personales, por tener ser tan buena compañera y amiga. Y por todos los buenos momentos y risas que hemos compartido.

Agradezco a la Dra. Rosario Mata por su amable ayuda en todas las cosas que he necesitado, y por llevar a cabo proyectos conmigo, muchas gracias Chayo estoy segura que seguiremos trabajando juntas por mucho tiempo.

Mi agradecimiento para el Dr. Alejandro Ocegüera por la buena compañía, charlas agradables y conocimiento compartido conmigo, y por ver a la ciencia de una manera visionaria...

Agradezco especialmente a Horacio por su ayuda en todas las etapas de este proyecto, por los buenos y agradables momentos que vivimos, y por hacerme ver la vida y las cosas desde una perspectiva única.

Compañeros lab de helmintología: David Osorio, Gela, Aline, Sonia, David, Rodolfo, Javier, Jorge, Lore, Ulises, Rogelio, Carlos, Aldo, Amalia, Cristy, Ricardo, Nayeli, Lety, Alejandro, Janete, Angie y Antonieta, por ser tan buenos compañeros, siempre con la disposición de ayudar a quien lo necesite, y por brindarme una buena compañía en todo momento.

Viejos amigos: A mis queridos amigos con los que he compartido tantas ideas, tantas conversaciones, tantos buenos momentos, por siempre escucharme y estar ahí para mí cuando lo necesito, mi gracias de todo corazón, saben que tienen todo mi cariño: Mer, Ricky, Xochitl, Cindy, Gilda, Domingo, Joel y Carolina.

Familia: Agradezco a mi amorosa familia por todo el apoyo que recibo de ustedes todos los días de mi vida, por ayudarme y acompañarme en este proyecto de vida y hacer mi estancia en esta tierra muy agradable.

La vida me ha concedido la oportunidad de agregar nuevos miembros a mi familia y de vivir muchas experiencias muy lindas con ellos, es por esto que también agradezco a mis hermanos y sobrinos. Muchas gracias por brindarme el cariño y calor de una familia, y en tan poco tiempo convertirse en personas tan importantes en mi vida: Eduardo, Edith, Lalito, Cristian, Saúl, Ramón, Christopher, Yovani, Mónica y Arlet.

DEDICATORIA

Este trabajo te lo dedico a ti mi querida abue Tomasa Velázquez, porque a pesar que dejaste este mundo hace varios veranos, sigues estando presente en cada proyecto que llevo a cabo. Te llevaré por siempre en mi mente y mi corazón. Muchas gracias por haber sido la mejor abue del mundo, nunca pierdo la esperanza de volver a verte...

A mi adorada ma Eugenia Aguilar Velázquez, porque eres un ser muy comprensivo, amoroso, gentil y uno de los mejores corazones que conozco. Porque tengo la plena confianza en que puedo contar contigo en todo momento, en cada idea, cada proyecto, cada decisión, cada dificultad. Eres una de las personas más importantes en vida, y sin duda la que más ha influido en todo lo que soy. Puedo contarte mis ideas e inquietudes y siempre encuentro a una compañera que mira al mundo como yo lo hago, con esa pasión revolucionaria y visionaria. Me encanta tu sentido del humor, siempre hay algo por lo cual sonreír a pesar de las adversidades. Todo el esfuerzo y dedicación que implica este trabajo está dedicado con todo mi amor para ti. *"Nitechtlazohtla Nonantzin (te amo madrecita)"*

Este trabajo también está dedicado a mi hermana María Magdalena Velarde Aguilar (Mer), por ser una de mis personas favoritas y uno de los seres más hermosos, agradables, divertidos, sinceros e inteligentes que he conocido. Eres uno de los mejores regalos que pude haber recibido en esta vida, eres mi inspiración, mi motor para seguir adelante y mi compañera de camino en cada paso que doy, pero sobre todas las cosas, eres y serás siempre mi mejor amiga. Me siento dichosa de compartir esta tierra contigo, y de haber vivido tantas cosas hermosas a tu lado, tantas alegrías, emociones, melancolías, revoluciones, proyectos, aventura. Mi eterno agradecimiento por apoyarme en todo, por todo el amor y comprensión que me has brindado en todo momento. Te amo mi niña hermosa.

A mi querido amigo, hermano y cuñis favorito Ricardo Salazar Navarro, por el cariño tan especial que te tengo, por todos los grandiosos momentos que vivido contigo, por todo el aprendizaje de vida que he recibido de ti, por ser un humano tan visionario, noble, sincero y transparente. Por hacerme parte de tu vida y de tu corazón, y por alegrar mi vida con tu buen humor y agradable compañía. Eres un gran hombre Ricardo, un hombre libre...

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 OBJETIVOS.....	7
3 ANTECEDENTES GENERALES.....	8
3.1 Características de <i>Lithobates megapoda</i>	8
3.2 Características del área de estudio	9
4 METODOLOGÍA GENERAL	16
4.1 Recolecta de hospederos.....	16
 SECCIÓN I. HELMINTOFAUNA	
5 ANTECEDENTES	18
5.1 Registro helmintológico de <i>Lithobates megapoda</i>	18
6 METODOLOGÍA	20
6.1 Recolecta de helmintos	20
6.2 Estudio morfológico de helmintos	21
6.3 Estudio molecular de helmintos	21
6.4 Análisis ecológico	24
6.4.1 Caracterización de las infecciones.....	24
6.4.2 Análisis de comunidades	25
6.4.3 Análisis de similitud.....	26
7 RESULTADOS.....	28
7.1 Registro hemintológico	28
7.2 Caracterización morfológica de los helmintos de <i>Lithobates megapoda</i>	29
7.2.1 Phylum: <i>Platyhelminthes</i> Gegenbaur 1859.....	29
7.2.2 Phylum: <i>Acanthocephala</i> Rudolphi 1801.....	43
7.2.3 Phylum: <i>Nematoda</i> Cobb 1932	47
7.3 Caracterización molecular de los helmintos de <i>Lithobates megapoda</i>	72
7.4 Caracterización de las infecciones	73
7.5 Comunidades de helmintos	78
7.5.1 Componente de comunidad.....	78
7.5.2 Infracomunidades	79
7.6 Análisis de similitud cuantitativa y cualitativa.....	80
8 DISCUSIÓN	82

SECCIÓN II. UBICACIÓN FILOGENÉTICA DE *LITHOBATES MEGAPODA*

9 ANTECEDENTES	89
9.1 La controversia del género <i>Lithobates</i>	89
9.2 <i>Lithobates megapoda</i> en el contexto de la filogenia de <i>Lithobates</i> spp. 91	
9.3 Características de <i>Lithobates megapoda</i>	91
10 METODOLOGÍA	94
10.1 Análisis genético de <i>Lithobates megapoda</i> de las localidades estudiadas.....	94
10.2 Análisis filogenético de las especies del género <i>Lithobates</i>	97
11 RESULTADOS	102
11.1 Análisis genético de <i>Lithobates megapoda</i>	102
11.2 Análisis filogenético del género <i>Lithobates</i>	103
12 DISCUSIÓN.....	108
13 CONCLUSIONES	113
14 BIBLIOGRAFÍA	115
15 APÉNDICES	127
15.1 Apéndice I. Tinción con Paracarmín de Meyer.....	127
15.2 Apéndice II. Aclarado con Glicerina-etanol	127
15.3 Apéndice III. Análisis genético de <i>Rhabdias</i> spp.....	128

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Localidades de recolecta de <i>L. megapoda</i> .	16
Tabla 2. Registro helmintológico de <i>L. megapoda</i> .	19
Tabla 3. Helmintos caracterizados molecularmente en el presente estudio.	22
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio para amplificar la región COI del Código de Barras en Helmintos.	23
Tabla 5. Helmintofauna de <i>L. megapoda</i> de las tres localidades del presente estudio.	28
Tabla 6. Comparación morfométrica de algunas <i>Ophiotaenia</i> spp.	39
Tabla 7. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en <i>L. megapoda</i> del Lago de Atotonilco, Jal.	74
Tabla 8. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en <i>L. megapoda</i> del Lago de Cajititlán, Jal.	75
Tabla 9. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en <i>L. megapoda</i> del Lago de Chapala, Jal.	76
Tabla 10. Componente de comunidad de helmintos de <i>L. megapoda</i> en las tres localidades del presente estudio.	78
Tabla 11. Estructura de las infracomunidades de helmintos de <i>L. megapoda</i> en las localidades del presente estudio.	79
Tabla 12. Patrones de similitud cualitativa y cuantitativa entre las localidades estudiadas.	81
Tabla 13. Muestras de <i>L. megapoda</i> caracterizadas molecularmente.	94
Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio para amplificar la región 12S ARNr, el gen ARNt-Val y una región parcial de 16S ARNr mitocondriales.	95
Tabla 15. Relación de las secuencias del 12S ARNr-ARNt val-16S ARNr publicadas en Hillis y Wilcox (2005), utilizadas en el presente trabajo	98
Tabla 16. Relación de las secuencias obtenidas en GenBank no incluidas en Hillis y Wilcox (2005).	100
Tabla 17. Secuencias de <i>Rhabdias</i> spp. utilizadas en el presente estudio obtenidas de Martínez-Salazar (2008).	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rango de distribución de <i>L. megapoda</i> .	8
Figura 2. Lago de Atotonilco.	11
Figura 3. Lago de Cajititlán.	13
Figura 4. Lago de Chapala.	15
Figura 5. Mapa de las localidades estudiadas en el estado de Jalisco.	17
Figura 6. Microscopía óptica de <i>Glyphelmins quieta</i> .	33
Figura 7. Desarrollo y transmisión de <i>Glyphelmins quieta</i> .	34
Figura 8. Microscopía óptica de <i>Ophiotaenia</i> sp.	40
Figura 9. Microscopía óptica de <i>Ophiotaenia</i> sp.	41
Figura 10. Desarrollo y transmisión de <i>Ophiotaenia filaroides</i> .	42
Figura 11. Polymorphidae gen. sp.	45
Figura 12. Desarrollo y transmisión de la familia Polymorphidae.	46
Figura 13. Microscopía electrónica de barrido de <i>Eustrongylides</i> sp.	50
Figura 14. Microscopía óptica de <i>Eustrongylides</i> sp.	51
Figura 15. Desarrollo y transmisión de <i>Eustrongylides</i> spp.	52
Figura 16. Filograma de NJ con secuencias de COI de <i>Rhabdias</i> spp.	55
Figura 17. Filograma de NJ con secuencias parciales de ITS/5.8S ADNr.	55
Figura 18. Microscopía Electrónica de Barrido de <i>Rhabdias</i> n. sp.	56
Figura 19. Microscopía óptica de <i>Rhabdias</i> n. sp.	57
Figura 20. Desarrollo y transmisión de <i>Rhabdias ranae</i> .	58
Figura 21. Microscopía electrónica de barrido de <i>Contracaecum</i> sp.	62
Figura 22. Microscopía óptica de <i>Contracaecum</i> sp.	63
Figura 23. Desarrollo y transmisión de <i>Contracaecum</i> spp.	64
Figura 24. MEB de <i>Foleyellides striatus</i> , macho.	68
Figura 25. MEB de <i>Foleyellides striatus</i> , hembra.	69
Figura 26. Microscopía óptica de <i>Foleyellides striatus</i> .	70
Figura 27. Desarrollo y transmisión de <i>Foleyella flexicauda</i> .	71
Figura 28. Filograma de NJ de la región COI de nemátodos.	73
Figura 29. Filograma de NJ de la región COI de platelmintos.	73
Figura 30. Curva de acumulación de las especies <i>L. megapoda</i> en la localidad del Lago de Atotonilco, Jalisco.	74
Figura 31. Curva de acumulación de las especies <i>L. megapoda</i> en la localidad del Lago de Cajititlán, Jalisco.	75
Figura 32. Curva de acumulación de las especies <i>L. megapoda</i> en la localidad del Lago de Chapala, Jalisco.	77
Figura 33. Dendrogramas de UPGMA utilizando el índice de similitud de Sorensen y el porcentaje de similitud para las localidades estudiadas.	81
Figura 34. Especímenes de <i>L. megapoda</i> .	93
Figura 35. Red mínima de haplotipos generada mediante TCS derivados de secuencias de 12rRNA-tRNAval-16SrRNA.	103
Figura 36. Árbol de consenso estricto de Máxima Parsimonia de <i>Lithobates</i> spp.	105
Figura 37. Árbol filogenético de ML de <i>Lithobates</i> spp.	106
Figura 38. Árbol filogenético de Inferencia bayesiana de <i>Lithobates</i> spp.	107

RESUMEN

Lithobates megapoda (Amphibia: Anura) es un ránido endémico de México, predominantemente acuático que habita y se reproduce en lagos, ríos y cuerpos de agua permanentes en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán y Guanajuato, ha sido alimento para los pobladores locales desde la época prehispánica. Sin embargo, a pesar de la importancia biológica y económica de este anuro, aún no ha sido sujeto de estudios helmintológicos sistemáticos, y tampoco se conoce su posición filogenética dentro del género *Lithobates*. En el presente estudio se recolectaron un total de 30 individuos de *L. megapoda* provenientes de los Lagos de Chapala, Atotonilco y Cajititlán en el estado de Jalisco, y se realizó la caracterización morfológica y molecular de su helmintofauna y también se realizó un análisis ecológico a nivel de componente de comunidad e infracomunidades. La helmintofauna de *L. megapoda* consistió en: Polymorphidae gen. sp. (Acantocephala); *Glythelmins quieta* (Trematoda); *Ophiotaenia* sp. (Cestoda); *Foleyellides striatus*, *Rhabdias* n. sp., *Contraecum* sp. y *Eustrongylides* sp. (Nematoda). Todas las especies registradas constituyen nuevos registros de localidad, a excepción de *G. quieta* de Chapala. Asimismo, *Ophiotaenia* sp. y Polymorphidae gen. sp. son nuevos registros de hospedero y la especie de *Rhabdias* representa una nueva especie. En cada una de las localidades dominó una especie distinta: *Foleyellides striatus* en Atotonilco, *Eustrongylides* sp. en Cajititlán y *Contraecum* sp. en Chapala. Estas dos últimas especies pueden ser transmitidas al humano (zoonóticas) y su presencia abundante sugiere que el lago está eutroficado. Los análisis genéticos de *L. megapoda* con las regiones mitocondriales 12S rRNA, tRNA val y 16S rRNA, indican que los individuos de todas las localidades pertenecen a la misma especie. En el contexto filogenético del género *Lithobates*, esta especie pertenece al grupo Lacusirana, propuesto por Hillis y Wilcox (2005).

ABSTRACT

Lithobates megapoda (Amphibia: Anura) is an endemic aquatic ranid of Mexico that lives and breeds in permanent lakes, rivers and water bodies in the states of Nayarit, Jalisco, Michoacan and Guanajuato, and has been a source food for local people since prehispanic time. However, although the biological and economic importance of this anuran it has not yet been subject of systematic helminth studies, nor its phylogenetic position within the genus *Lithobates* is known. In the present study a total of 30 individuals of *L. megapoda* from the Lakes of Chapala, Atotonilco and Cajititlán in Jalisco state were collected and the morphological and molecular characterization of their helminths was performed, as well as, ecological analysis at component community and infracommunities levels. The helminth fauna consisted of: Polymorphidae gen. sp. (Acantocephala), *Glyphelmins quieta* (Trematoda); *Ophiotaenia* sp. (Cestoda); *Foleyellides striatus*, *Rhabdias* n. sp., *Contracaecum* sp. and *Eustrongylides* sp. (Nematoda). All registered species are new locality records, except for *G. quieta* from Chapala; moreover, *Ophiotaenia* sp. and Polymorphidae gen. sp. are new host records and *Rhabdias* sp. is a new species. In each one of the localities, the helminth communities were dominated by a distinct species: *F. striatus* in Atotonilco, *Eustrongylides* sp. in Cajititlán and *Contracaecum* sp. in Chapala, the latter two may be transmitted to humans (zoonotic) and the abundant presence of them suggest that the habitat is highly eutrophicated. Analysis of the DNA mitochondrial regions 12S rRNA, 16S rRNA and tRNA val, indicates that individuals from all localities belong to the same species. In the phylogenetic context of genus *Lithobates*, this species turns out to be part of the group *Lacusirana* proposed by Hillis and Wilcox (2005).

1 INTRODUCCIÓN

Los parásitos están entre los organismos más exitosos y sofisticados del mundo, pueden transformar los cuerpos de otras criaturas en lugares habitables, pueden evadir al sistema inmune, e incluso pueden alterar el comportamiento y fisiología de sus hospederos, gracias a estas características podría decirse que el parasitismo es una de las estrategias de vida más extendida en la naturaleza (Marcogliese, 2004).

Los parásitos han evolucionado independientemente en numerosos linajes animales, por lo que no constituyen un grupo natural, de manera que no existen características consistentes que puedan definir al “grupo”. Tradicionalmente las definiciones de parásito se han basado en algún aspecto ecológico de la relación parásito-hospedero, ya sea por la forma de alimentación y la dependencia metabólica, la especificidad por el hábitat que ocupan en sus hospederos, lo que deriva en cierto grado de adaptación estructural, o bien por el daño que causan, sin llegar a la muerte del hospedero (cuando el daño al hospedero invariablemente causa la muerte, se le denomina parasitoide) (Poulin, 2006).

Existen muchas otras variantes de esta definición, por ejemplo Price 1980 incluye a los insectos fitopatógenos como parásitos, pero excluye a las moscas que succionan sangre. Bernard 1990 nombra a los parásitos de acuerdo a su comportamiento, como el caso de muchas aves que no son fisiológicamente dependientes de sus hospederos pero los explotan de otras maneras, por ejemplo robando su comida. Combes 2001 incluso incluye a fragmentos de ADN como entidades parásitas (ver en Poulin, 2006).

El estudio de los parásitos es particularmente importante para entender y conocer mejor la diversidad de los animales y lo que la causa, por al menos dos razones. Primero, las múltiples transiciones independientes al parasitismo permite a los investigadores el estudio de los procesos evolutivos (en lo referente a las tasas de especiación y diversificación), en varios grupos monofiléticos con estilos de vida similares, esto podría descubrir tendencias evolutivas generales, de manera más sencilla que con el estudio de los animales de vida libre. De igual manera existe mucha evidencia de que la especiación simpátrica puede ser más común en la diversificación de los linajes de parásitos. Los parásitos por tanto, pueden ser modelos biológicos ideales para el estudio de la especialización ecológica, mecanismos de especiación y diversificación. En segundo lugar, desde el punto de

vista de la salud pública, varios parásitos podrían haber colonizado al humano a partir de animales silvestres o domésticos. La comprensión del fenómeno que facilita la transferencia de hospederos, su subsecuente especiación y diversificación, es por tanto de gran relevancia (Poulin y Morand, 2001).

Las interacciones ecológicas de los parásitos a menudo son difíciles de observar, muchos viven sus vidas en secreto, invisibles para el mundo exterior, pero en íntimo contacto con su hospedero. Salvo algunas notables excepciones (por ejemplo, las tenias), los parásitos también tienden a ser muy pequeños. Puede ser entonces fácil suponer que puesto que los parásitos son por lo general poco visibles, son menos importantes en la ecología de las comunidades, en comparación con los organismos de vida libre (Preston y Johnson, 2010). Sin embargo, los avances en el campo de la ecología de las enfermedades han revelado que los parásitos no sólo son ecológicamente importantes, sino que a veces pueden ejercer influencias que igualan o rebasan a las de los organismos de vida libre en la conformación de la estructura de la comunidad (De Meeûs y Renaud, 2002).

Actualmente se reconoce que los parásitos influyen en el comportamiento del hospedero, en su estado físico, y pueden regular el tamaño de las poblaciones, a veces con efectos profundos en las redes tróficas e interacciones tróficas, la competencia y la diversidad de las especies clave. Estas interacciones sugieren que los parásitos son componentes integrales en la conformación de la estructura de la comunidad y del ecosistema (Preston y Johnson, 2010).

La relación tan estrecha que algunos parásitos -como los helmintos- forman con sus hospederos, los convierten en una herramienta muy útil para dilucidar redes tróficas en los ecosistemas, ya que podemos saber quién se come a quién, conociendo el ciclo de vida del helminto, así como los hospederos intermediarios y definitivos que intervienen. Esto también nos puede brindar información acerca de la riqueza de los vertebrados e invertebrados de un hábitat en particular. De igual manera, la ausencia-presencia de ciertos helmintos puede indicar alteraciones ambientales (Marcogliese, 2004).

El conocimiento de la diversidad de parásitos que habitan nuestro planeta es de suma importancia a fin de que puedan brindarnos toda la información anteriormente mencionada, sin embargo, hoy en día es imposible saber cuantas especies existen, por diversas razones: Los parásitos sólo se describen después de que sus hospederos han

sido identificados científicamente, y aún estamos lejos de poder conocer a todas las especies de vida libre que habitan en nuestro planeta. Además, aún cuando la especie de hospedero sea bien conocido, algunos poseen un tamaño muy pequeño por lo que podrían pasar desapercibidos muy fácilmente (Poulin y Morand, 2001).

Por otro lado, una especie de parásito puede estar presente en varias especies de hospedero, pero con pequeñas diferencias morfológicas en cada hospedero, esta variación fenotípica ha sido observada en varias especies de helmintos, y podría ocasionar que una sola especie sea dividida en varias. Contrariamente, varias especies distintas pueden ser agrupadas en una sola. O bien, se pueden encontrar los estadios larvarios, pero su identificación a nivel específico ocurrirá, en la gran mayoría de los casos, hasta que se cuente con el adulto (Poulin, 2001).

Estos problemas se han visto matizados con la utilización de caracteres moleculares, como lo son los códigos de barras genéticos, los cuales han demostrado ser útiles para muchos grupos, incluyendo helmintos en la detección de especies crípticas, de morfotipos y para ligar estadios larvarios con adultos (Velarde-Aguilar, 2011; Prosser *et al.*, 2013; Alcántar-Escalarea *et al.*, 2013). No obstante, actualmente no se cuenta con una base de datos robusta para estos organismos, pero en la medida en que se vayan incorporando más datos, se espera que la identificación de helmintos pueda realizarse de manera cada vez más rutinaria, rápida y sencilla.

La biodiversidad de parásitos en México se conoce poco, particularmente para anuros, dado que sólo se han estudiado 51 de las 361 especies de este grupo que habitan en el país; en dichos hospederos se tienen registradas 151 especies de helmintos, pero se estima que el número de especies que restan por describir asciende a unas 830 (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2002; Paredes-León *et al.*, 2008).

En México uno de los géneros más diversos de anuros, en cuanto al número de especies es *Lithobates* (= *Rana*) con 27 especies descritas y otras tantas identificadas molecularmente pero no descritas formalmente. De este género se han estudiado las relaciones filogenéticas de casi todas las especies formalmente descritas, pero todavía quedan algunas pendientes como *L. megapoda*, *L. brownorum*, *L. chichicuahutla*, *L. johni*, *L. lemosespinali* y *L. pueblae* (Hillis y Wilcox, 2005).

Con respecto a los estudios helmintológicos, de las especies de este género sólo se tienen registros de 15 especies en nuestro país en las que se han encontrado

predominantemente tremátodos y nemátodos, con una menor proporción de céstodos y acantocéfalos (Paredes-León *et al.*, 2008).

Por otro lado, los estudios de los hospederos también forman una parte fundamental de la parasitología, ya que a partir de su correcta identificación y con la ayuda de hipótesis filogenéticas robustas, se puede documentar la historia de las asociaciones parásito-hospedero y realizar estudios comparativos de las tasas de especiación y coevolución en diferentes organismos (Page, 1993).

En el presente trabajo se realizó el registro helmintológico de *Lithobates megapoda* en tres localidades del estado de Jalisco. Se analizaron varios aspectos ecológicos de su helmintofauna, y se hizo un análisis comparativo entre las localidades estudiadas. Por último se verificó que todos los hospederos recolectados pertenecieran a la misma especie, y se exploró su relación filogenética con el resto de las ranas del género *Lithobates*.

La información del presente estudio está contenida en dos secciones, en la primera se encuentra la investigación relacionada con la helmintofauna de *L. megapoda*, y en la segunda sus afinidades filogenéticas.

2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la helmintofauna de *L. megapoda* en tres localidades del estado de Jalisco, e investigar sus afinidades filogenéticas.

Objetivos particulares:

- I. Documentar y caracterizar morfológica y molecularmente a la helmintofauna encontrada.
- II. Describir y comparar las infracomunidades de helmintos de cada una de las tres localidades utilizando atributos como abundancia, riqueza, diversidad y equidad.
- III. Comparar las infracomunidades de *L. megapoda* de las tres localidades estudiadas de manera cualitativa y cuantitativa.
- IV. Incorporar a *L. megapoda* en el análisis filogenético de las ranas del nuevo mundo.

3 ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Características de *Lithobates megapoda*

Biología y distribución

Lithobates megapoda es una especie endémica de México con un rango de distribución restringido a los estados de Nayarit, Jalisco, Guanajuato y Michoacán. Presenta un intervalo de elevación de 823 a 1,520 msnm (Webb, 1996) (Figura 1).

Esta rana es predominantemente acuática. Los individuos frecuentan lagos, estanques y pantanos a lo largo de carreteras y pequeños arroyos en bosque de matorral y pino-encino (Webb, 1996; Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004a).

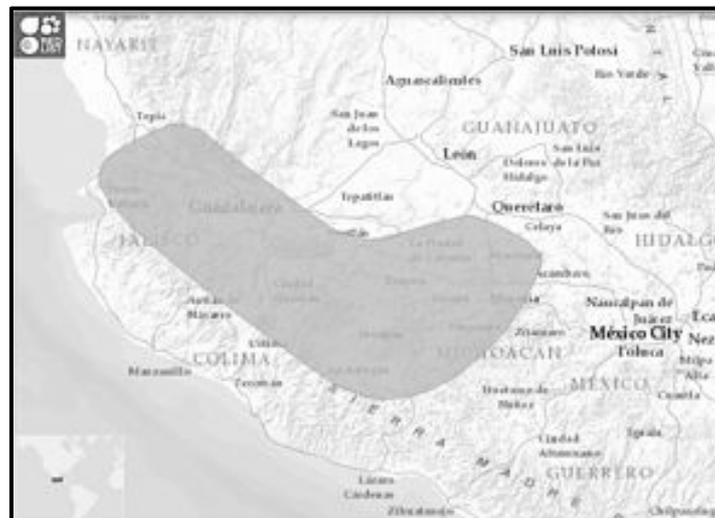


Figura 1. Rango de distribución de *L. megapoda*. Fuente del mapa: Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004a.

Amenazas y conservación

Lithobates megapoda solía ser una especie común, pero ha habido un declive en sus poblaciones, especialmente hacia el sur de su distribución. Las principales causas de esto son la contaminación del agua, la destrucción y degradación del hábitat, así como su extracción para consumo humano (Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004a).

Es por esto que dicha especie se encuentra protegida por las leyes mexicanas bajo la categoría de protección especial (Pr) (NOM-059-SEMARNAT-2010) y en la lista roja de especies amenazadas como especie vulnerable (Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004a).

Importancia cultural y económica

El consumo de la rana “patona”, como la conocen los pobladores, ha sido una práctica común desde la época prehispánica. Un estudio antropológico realizado por Porcasi (2010), revela que esta especie fue un elemento fundamental en la dieta de los pobladores ribereños de la laguna de Magdalena en Jalisco y su consumo perduró tras la llegada de los españoles, a pesar de la gran cantidad de animales domesticados que trajeron consigo.

Además de la importancia gastronómica, posiblemente esta rana poseía también un valor simbólico para los pobladores mexicanos, puesto que en un contexto funerario se han encontrado cuentas talladas minuciosamente en forma de rana y algunas elaboradas en jade, un material muy apreciado por las culturas prehispánicas (Porcasi, 2010).

Actualmente, la rana patona es utilizada tanto para consumo humano como para fines medicinales. La venta de esta rana representó durante muchos años una fuente importante de empleo para los pobladores locales. Sin embargo, hoy en día esta actividad es cada vez menos lucrativa, puesto que la captura y comercialización de esta especie está prohibida (obs. pers.).

3.2 Características del área de estudio

El área de estudio forma parte de la región hidrológica prioritaria No. 58 de acuerdo al programa de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Este programa tiene como objetivo identificar las principales subcuencas y sistemas acuáticos del país, considerando la biodiversidad y patrones socio-económicos para establecer una referencia que pueda considerarse por diferentes sectores para el desarrollo de planes de investigación, conservación, uso y manejo sostenido (CONABIO, 2012).

Esta región comprende a los siguientes recursos hídricos lénticos: Lagos de **Chapala**, Sayula, **Cajitlán**, El Molino, San Marcos, Zacoalco, Atoyac, **Atotonilco**, Zapotlán, La Magdalena, Camécuaro, presas Guaracha, Poncitlán, Jaripo, Corona y Colesio, Ciénega de Chapala, manantiales Los Negritos y La Luz. Los sistemas marcados en negritas corresponden a los sitios de muestreo de la presente tesis (Figura 5).

Lago de Atotonilco

El lago de Atotonilco fue nombrado sitio RAMSAR en el 18 de marzo del 2006. La información que a continuación se presenta son de la ficha informativa de los humedales Ramsar (FIR) (Gómez-Reyna *et al.*, 2005) (Figura 2).

Localización: Se encuentra en el occidente de México, en la región neotropical o Americana, dentro del eje Neovolcánico mexicano. A un nivel más regional, se encuentra a 40 Km. al sur poniente de la ciudad de Guadalajara, entre los municipios de Villa Corona y Zacoalco de Torres en la región Centro del Estado de Jalisco.

Altitud: El intervalo de altitud de la cuenca de Atotonilco es de 1,532 a 2,959 msnm. La altitud del vaso lacustre es de 1,532 msnm.

Área: El área del lago es de 2,850ha, de las cuales 1,400ha han estado cubiertas de agua durante el periodo 2004-2005.

Profundidad: La profundidad actual es de 0.5m.

Clima: De acuerdo al Sistema de Clasificación Climática de Köppen modificado para México por E. García 1987 (en Gómez-Reyna *et al.*, 2005), corresponde al grupo de climas semicálido subhúmedo; en las laderas con bosques de pino-encino el clima es templado subhúmedo y en las partes elevadas de las montañas el clima es frío. La precipitación promedio de la Cuenca es de 711mm anuales. Las condiciones de temperatura anual se encuentran entre los 20.5°C con una mínima de 5°C y una máxima de 29°C.

Tipos de vegetación: Con base en la clasificación de Rzedowsky 1978, se encuentran bosque de pino-encino, selva baja caducifolia, bosque de encino, bosque de *Abies*, pastizal inducido, bosque de pino *P. hartweggii*, bosque mesófilo, zacatonal y vegetación acuática y semi-acuática.

Impacto antropogénico: Gran parte de la laguna se encuentra totalmente rodeada por asentamientos humanos, que rápidamente van cambiando de zonas rurales a semiurbanas, por lo que la demanda de recursos naturales y espacio va en aumento. Las principales actividades productivas de zona son ganadería, agricultura, pesca y turismo.

Medidas de conservación: La Universidad de Guadalajara (U de G) principalmente el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), ha formado un grupo interdisciplinario que se dedica principalmente a desarrollar investigación para la rehabilitación y restauración de la cuenca y el lago, y a desarrollar actividades de

educación ambiental entre los habitantes de la zona. Actualmente se tienen firmados convenios para elaborar un plan de manejo de la zona entre el gobierno del municipio de Villa Corona y la U de G. La importancia y trascendencia de la rehabilitación de la cuenca y el lago, han permitido que se considere como uno de los modelos integrales más importante en el manejo de cuencas.



Figura 2. Lago de Atotonilco. Fotografías por MGVA.

Lago de Cajitlán

El lago de Cajitlán no cuenta con ningún tipo de nombramiento para su conservación, a pesar de estar localizado en una de las zonas metropolitanas más importantes de México. La información que a continuación se presenta, salvo algunas excepciones señaladas, se tomó de la enciclopedia de los municipios de México (INAFED, 2005) y de la ficha técnica No. 58 de regiones hidrológicas prioritarias de la CONABIO (CONABIO, 2012) (Figura 3).

Localización: Este lago se localiza en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, mismo que forma parte de la zona metropolitana de Guadalajara, hacia el suroeste de ésta, en

la zona centro del estado de Jalisco. Los poblados ribereños de este lago son: Cajititlán, Cuexcomatitlán, San Miguel Cuyutlán, San Lucas Evangelista y San Juan Evangelista.

Altitud: 1,554.480 msnm

Área: 1,563ha.

Profundidad: A la mitad del lago la profundidad es de 4m, y en las orillas llega a ser hasta de 0.5m

Clima: Semiseco con otoño, invierno y primavera secos, y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 19.7°C, con máxima de 29°C y mínima de 12.1°C. El régimen de lluvias se registra entre los meses de junio y diciembre, con una precipitación media de 821.9mm.

Tipo de vegetación: En el municipio de Tlajomulco hay bosque de encino, pastizales y selva mediana.

Impacto antropogénico: Los bordes del lago se encuentran poblados y se desarrollan actividades agrícolas, pesqueras, turísticas y comerciales. Esto aunado a los desechos que el municipio de Tlajomulco vierte en sus aguas, lo hacen un lago sumamente contaminado con agua turbia, alta concentración de materia orgánica, proliferación de malezas acuáticas y una pobre calidad bacteriológica. Además de la polución, el fantasma de la desecación ronda el lugar debido a las grandes cantidades de agua que se extraen para el abastecimiento de fraccionamientos aledaños y de la zona urbana del municipio.

Medidas de conservación: Existen promotores de la designación del lago como sitio RAMSAR, sin embargo, les espera un largo camino por recorrer, puesto que no hay políticas públicas que frenen la contaminación del lago. Un ejemplo claro de ello es que a un año de su construcción, la planta tratadora de aguas de Cajititlán quedó parada por falta de recursos (Castillo, 2007).



Figura 3. Lago de Cajititlán. Fotografías por MGVA.

Lago de Chapala

El lago de Chapala es el más grande de la República Mexicana y el tercero en tamaño en América Latina. Tiene una enorme importancia nivel local por ser regulador de temperatura, abastecedor de agua y fuente de trabajo y alimento para cientos de familias ribereñas. Y lo es también a nivel global puesto que existe una importante cantidad de rutas migratorias de aves, provenientes principalmente de EUA y Canadá, que convergen en ese sitio. Fue nombrado sitio RAMSAR el 2 de febrero de 2009, y la información aquí presentada pertenece a la publicada en la Ficha Informativa de Humedales de Ramsar (FIR) (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2008) (Figura 4).

Localización: Se ubica en el occidente de México, al este de Jalisco con 90% de su superficie y el restante 10% en el noreste de Michoacán, a 50km de la zona metropolitana de Guadalajara. Los municipios que rodean el lago son Ocotlán, Jamay, Poncitlán, Chapala, Jocotepec, Tuxcueca, Tizapán en Jalisco, Cojumatlán de Régules, Venustiano Carranza y Briseñas en Michoacán.

Altitud: 1,524.60 msnm

Área: La superficie inundada es de 114,659ha.

Profundidad: La profundidad promedio es de 7.7m, aunque es variable; por ejemplo en las inmediaciones de Jocotepec es de 4 a 5m, en aguas abiertas es de unos 10.9m; en las riberas del norte y sur entre 3.8 y 4.7m y al este alrededor de 2.5m.

Clima: El clima está clasificado como semicálido subhúmedo, con lluvias en verano; la temperatura promedio anual es de 19.9°C. La temperatura máxima es de 30°C y la mínima de 9°C. La precipitación anual es de 1,912mm. En la vertiente norte, a los 1,800 msnm y en la vertiente sur hasta 1,760 msnm, se encuentra un clima semiseco con lluvias en verano, semicálido y sin cambio invernal bien definido. En la vertiente sur, hasta los 1,800 msnm, se encuentra un clima húmedo, con lluvias en verano, semicálido y sin cambio invernal definido. Las cimas de los cerros del Viejo y Prieto, dada la altitud, se caracterizan por un clima semifrío.

Tipo de vegetación: vegetación acuática, matorral subtropical, bosque tropical caducifolio y bosque de encino-pino, además de varios tipos de vegetación inducidos formando grandes áreas de cultivos de frutales como ciruelos, aguacates y mangos, así como, chayoterías y cultivos de alfalfa, entre otros.

Impacto antropogénico: La ciénega de Chapala, se caracteriza por ser un gran valle agrícola en donde se siembra principalmente sorgo, alfalfa, trigo, maíz, avena, maíz y fresa. Además actividades pesqueras, pecuarias, turismo, manufactura, comercio, transporte, servicios, minería y construcción. Por tal motivo, el lago está sumamente impactado por contaminación de origen doméstico, agrícola e industrial, no sólo provenientes de la región, sino también de las zonas industriales de Toluca y Querétaro. Además, el incremento desproporcionado de las zonas urbanas, que requieren cada vez más de recursos naturales, hace que la extracción de agua del lago sea una de las principales amenazas de desecación.

Medidas de conservación: Actualmente el lago de Chapala está inmerso en un proceso de recuperación de su vasta cuenca. En marzo de 2010 se dio a conocer el programa de conservación y manejo. Este programa está enfocado en los criterios y compromisos adquiridos por la convención Ramsar y considera la protección, manejo, restauración, conocimiento, comunicación y gestión de recursos para el lago de Chapala. Algunos beneficios de este plan serían la cooperación institucional para el uso y aprovechamiento sustentable de sus recursos naturales, la obtención de fondos

económicos nacionales e internacionales, y la capacitación para la gestión integral de los municipios ribereños. Actualmente este programa se encuentra en evaluación por parte de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).



Figura 4. Lago de Chapala. A, Vista del lago (Ocotlán, Jal.); B y C, Vista del lago (Jamay, Jal.); D, Río en Tizapán el Alto, Jal., a unos cuantos metros del lago. Fotografías por MGVA.

4 METODOLOGÍA GENERAL

4.1 Recolecta de hospederos

Treinta individuos de *L. megapoda* fueron recolectados durante la temporada de lluvias, en el periodo del 23 de julio al 9 de septiembre de 2012. La recolecta fue nocturna entre las 22:00 y 02:00 hrs. en tres lagos del estado de Jalisco (Tabla 1, Figura 5). Debido al gran tamaño del lago de Chapala, se muestreó en dos localidades, una en el municipio de Ocotlán, hacia el norte del lago y otra en el municipio de Tizapán el Alto hacia el sur del mismo (Figura 4).

Tabla 1. Localidades de recolecta de *L. megapoda*

Sitio de colecta	Lago	Coordenadas	Altitud (msnm)	Número de individuos
Villa Corona	Atotonilco	20°24.782'N 103°40.842'W	1,360	12
Cajititlán	Cajititlán	20°26.008'N 103°18.807'W	1,554	5
Tizapán el Alto	Chapala	20°09.665'N 103°02.217'W	1,537	3
Ocotlán	Chapala	20°18.663'N 102°46.440'W	1,530	10

Los hospederos recolectados se mantuvieron en bolsas plásticas, con provisión suficiente de aire, a temperatura templada y el menor tiempo posible antes de realizar la disección.

Lithobates megapoda es una especie bajo protección especial, por lo que las recolectas se realizaron bajo el amparo del permiso de recolector científico FAUT-005, con autorización de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre con oficio Núm. SGPA/DGVS/02526/12, a nombre de la Dra. Virginia León Règagnon, con aval para María Guadalupe Velarde Aguilar.

Un macho y una hembra del lago de Atotonilco se depositaron en la Colección Osea del Museo de Paleontología de Guadalajara Federico A. Solórzano Barreto, los cuales servirán como material de referencia para la identificación de material fósil. La hembra tiene el número de catálogo MGP-O-123 y el macho MGP-O-124.



Figura 5. Mapa de las localidades estudiadas en el estado de Jalisco. 1, Lago de Atotonilco, Villa Corona; 2, Lago de Cajititlán, Cajititlán; 3, Lago de Chapala, Tizapán el Alto; 4, Lago de Chapala, Ocotlán. Modificado de www.esri.com.

SECCIÓN I. HELMINTOFAUNA

5 ANTECEDENTES

5.1 Registro helmintológico de *Lithobates megapoda*

Son muy escasos los estudios helmintológicos de este ránido mexicano, ya que sólo se ha colectado en dos localidades del estado de Michoacán (Manantiales de Cointzio y Lago de Cuitzeo) y una en Jalisco (Lago de Chapala) (Tabla 2).

La helmintofauna de tremátodos digéneos asociada a *L. megapoda* a la fecha consta de seis especies: *Megalodiscus americanus*, *Gorgoderina attenuata*, *Haematoloechus complexus*, *Glyphelmins californiensis*, *Glyphelmins quieta* y *Ochetosoma* sp., las cuales pertenecen a cinco familias. Para el *phylum* Nematoda se tienen registradas cuatro especies: *Contracaecum* sp., *Eustrongylides* sp., *Spiroxys* sp. y *Foleyellides striatus*, provenientes de cuatro familias.

La única localidad del presente estudio de la que se tienen registros previos es el lago de Chapala, con la especie *Glyphelmins quieta*, reportada por Pérez-Ponce de León *et al.* (2000).

Los estudios ecológicos sobre *L. megapoda* y su asociación con helmintos son nulos. Asimismo en México para nuestro conocimiento, sólo existen dos estudios publicados sobre comunidades de helmintos en hospederos del género *Lithobates*: *L. dumni* del Lago de Pátzcuaro, Mich. (García-Altamirano, 1993) y *L. vaillanti* de los Tuxtlas, Ver. (Paredes-Calderón, 2004).

Tabla 2. Registro helmintológico de *L. megapoda*.

Grupo taxonómico	Especie	Sitio de infección	Localidad	Registro
TREMATODA				
Cladorchiidae	<i>Megalodiscus americanus</i> (Chandler, 1923)	Intestino	Manantiales de Cointzio, Mich. y Lago de Cuitzeo, Mich.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000
Gorgoderidae	<i>Gorgoderina attenuata</i> (Stafford, 1902)	Vejiga urinaria	Manantiales de Cointzio, Mich.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000
Haematoloechidae	<i>Haematoloechus complexus</i> (Seely, 1906)	Pulmones	Manantiales de Cointzio, Mich.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000
Macroderoididae	<i>Glyphelmins quieta</i> (Stafford, 1900)	Intestino	Lago de Cuitzeo, Mich. Manantiales de Cointzio, Mich. Lago de Chapala, Jal.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000 Razo <i>et al.</i> , 1999; Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000 Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000
Plagiorchiidae	<i>Ochetosoma</i> sp. (metacercaria)	Pared intestinal e hígado	Manantiales de Cointzio, Mich.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 2000
NEMATODA				
Anisakidae	<i>Contracaecum</i> sp. (larva)	Cavidad corporal, intestino, mesenterio	Lago de Cuitzeo, Mich.	Paredes-León <i>et al.</i> , 2008
Dictiophymatoidae	<i>Eustrongylides</i> sp. (larva)	Cavidad corporal, mesenterio, músculo esquelético	Lago de Cuitzeo, Mich.	Ramírez-Lezama y Osorio-Sarabia, 2002
Gnathostomatidae	<i>Spiroxys</i> sp.	Intestino, mesenterio, estómago	Lago de Cuitzeo, Mich.	Paredes-León <i>et al.</i> , 2008
Onchocercidae	<i>Foleyellides striatus</i> (Ochoterena & Caballero, 1932)	Cavidad corporal, mesenterio	Lago de Cuitzeo, Mich.	Paredes-León <i>et al.</i> , 2008

Mich.= Michoacán; Jal.= Jalisco.

6 METODOLOGÍA

6.1 Recolecta de helmintos

Los hospederos fueron anestesiados con aplicación tópica de clorhidrato de lidocaína al 2% (20mg/mL), y sacrificados con una sobredosis intracerebral de pentobarbital sódico (50mL/Kg de peso).

Cada individuo se diseccionó ventralmente, se observó la cavidad corporal, luego se extrajeron las vísceras y se separaron por órgano en cajas de Petri adicionando solución salina (0.65% de NaCl) para evitar desecación. Cada órgano fue revisado por desgarramiento con agujas de disección bajo un microscopio estereoscópico. El examen incluyó intestino, hígado, riñones, vesícula biliar, pulmones, corazón, gónadas, vejiga urinaria y mesenterios, además de boca y músculo. Los helmintos se extrajeron con pinceles finos y se colocaron en solución salina al 0.65% (Lamothe-Argumedo, 1997).

Los individuos de cada especie se contaron y luego se fijaron para dos tipos de análisis: **molecular**, para el cual se colocaron directamente en etanol absoluto y **morfológico**, para lo cual se procedió a fijar y conservar los parásitos dependiendo del grupo taxonómico de acuerdo con las técnicas descritas por Lamothe-Argumedo (1997)

Platelmintos: La solución salina excedente se retiró y se adicionó formol caliente al 4%. Posteriormente se colocaron en etanol al 70% a temperatura ambiente.

Nemátodos: Se retiró el exceso de solución y se le agregó etanol al 70% caliente. Posteriormente los organismos se transfirieron a etanol al 70% para su conservación.

Acantocéfalos: Se colocaron en una caja petri con agua destilada y se refrigeraron a 4°C hasta que evaginaron la proboscis. Una vez ocurrido esto se colocaron en etanol al 70% para su preservación.

6.2 Estudio morfológico de helmintos

La preparación de los ejemplares se realizó como lo describe Lamothe-Argumedo (1997), dependiendo del grupo taxonómico. Para los platelmintos y acantocéfalos se realizó una tinción con paracarmín de Mayer (Apéndice I). Una vez teñidos, los platelmintos se montaron en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá. Los nemátodos pequeños fueron aclarados en preparaciones temporales con glicerina-etanol 1:1 y los grandes con lactofenol (Apéndice II).

Una vez montados, todos los ejemplares fueron observados bajo el microscopio óptico en busca de estructuras diagnósticas para su identificación.

Posteriormente, se midieron las estructuras morfológicas de algunos ejemplares con el fin de realizar la caracterización de las especies, para lo cual se utilizó un microscopio óptico calibrado y un ocular micrométrico. Algunos organismos se esquematizaron con una cámara clara adaptada al microscopio.

Algunos ejemplares fueron observados con Microscopía Electrónica de Barrido. Para este tipo de estudio se eligieron los ejemplares conservados en alcohol al 70%, fueron deshidratados con concentraciones graduales de alcohol hasta llegar a alcohol absoluto. Los ejemplares fueron subsecuentemente llevados a punto crítico con CO₂, se montaron, se cubrieron con oro y finalmente se observaron en el microscopio electrónico de barrido Hitachi® modelo SU1510 del Instituto de Biología, UNAM.

La identificación de los helmintos se realizó con base en claves taxonómicas relevantes para cada grupo y en descripciones de especies. Ejemplares de todas las especies de helmintos encontradas en el presente estudio fueron depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM.

6.3 Estudio molecular de helmintos

Se procesaron para la obtención de secuencias de ADN 16 especímenes asignados a cuatro especies de nemátodos, un tremátodo y un céstodo. Todos estos ejemplares fueron recolectados de individuos de *L. megapoda* procedentes de los lagos de Chapala, Atotonilco y Cajititlán, todos ellos situados en el estado de Jalisco (Tabla 3).

Tabla 3. Helmintos caracterizados molecularmente en el presente estudio.

Especie	Localidad	No. de individuos procesados
Nematoda		
<i>Foleyellides striatus</i>	Lago Chapala (Ocotlán)	1
	Lago Atotonilco	1
	Lago Cajititlán	1
<i>Eustrongylides</i> sp.	Lago Chapala (Ocotlán)	1
	Lago Atotonilco	1
	Lago Cajititlán	1
<i>Contracaecum</i> sp.	Lago Atotonilco	2
	Lago Chapala (Ocotlán)	1
<i>Rhabdias</i> n. sp.	Lago de Chapala (Ocotlán)	3
Platyhelminthes		
<i>Glypthelmins quieta</i>	Lago Atotonilco	2
	Lago Chapala (Ocotlán)	1
<i>Ophiotaenia</i> sp.	Lago Cajititlán	1

Extracción de ADN total

Se extrajo ADN total de 16 especímenes completos utilizando el kit Wizard SV Genomic DNA Purification System, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega). El ADN de los especímenes de gran tamaño (*Foleyellides* sp., *Eustrongylides* sp. y *Contracaecum* sp.) fue resuspendido en 250 μ L de H₂O destilada y los pequeños (*Rhabdias* n. sp., *Ophiotaenia* sp. y *G. quieta*) en 25 μ L del mismo solvente.

Amplificación por PCR y secuenciación

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo para amplificar el fragmento de COI utilizado en el Código de Barras de la Vida, también llamada región Folmer, con las siguientes concentraciones finales: Buffer 1 X, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 0.625 U de Amplificasa ® BioTecMol (5 U/ μ L), 2-3 μ L de ADN, MgCl₂ 2mM y H₂O destilada hasta completar un volumen final de 25 μ L.

Para los nemátodos se utilizó el coctel de oligonucleótidos de Prosser *et al.*, (2013) (Tabla 4), con los ciclos térmicos siguientes: 94°C por 1 min, 5 ciclos de 94°C por 40 s, 45°C por 40 s, 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 s, 51°C

por 40 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Los amplificadores se observaron en geles de agarosa al 1% y se secuenciaron bidireccionalmente utilizando M13F y M13R como oligonucleótidos de secuenciación. La reacción de secuenciación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de BigDye 3.1 Terminator de Applied Biosystems, con el siguiente programa de amplificación: 96°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96°C por 10 s, 55°C por 5 s, 60°C por 2.5 min y una extensión final de 60°C por 5 min (Prosser *et al.*, 2013).

Para los platelmintos se utilizaron los oligonucleótidos de Moszczyńska *et al.*, (2009) (Tabla 4) con los siguientes ciclos térmicos: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Los amplificadores se observaron en geles de agarosa al 1%, fueron secuenciados bidireccionalmente utilizando M13F y M13R como oligonucleótidos de secuenciación de acuerdo al protocolo de BigDye 3.1 Terminator, con el siguiente programa de secuenciación: 96°C por 3 min, 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min y una extensión final de 60°C por 4 min (Applied Biosystems).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio para amplificar la región COI del Código de Barras en Helminthos. Las colas M13F y M13R están en negritas y minúsculas.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Fuente
NemF1_t1	tgtaaacgacggccagt CRACWGTWAATCAYAAARAATATTGG	Prosser <i>et al.</i> , 2013
NemF2_t1	tgtaaacgacggccagt ARAGATCTAATCATAAAGATATYGG	Prosser <i>et al.</i> , 2013
NemF3_t1	tgtaaacgacggccagt ARAGTTCTAATCATAARGATATTGG	Prosser <i>et al.</i> , 2013
NemR1_t1	caggaaacagctatgact AAACTTCWGGRTGACCAAAAAATCA	Prosser <i>et al.</i> , 2013
NemR2_t1	caggaaacagctatgact AWACYTCWGGRTGMCCAAAAAYCA	Prosser <i>et al.</i> , 2013
NemR3_t1	caggaaacagctatgact AAACCTCWGGATGACCAAAAAATCA	Prosser <i>et al.</i> , 2013
MPlatCOX1dF	tgtaaacgacggccagt TTWCITTRGATCATAAG	Moszczyńska <i>et al.</i> , 2009
MPlatCOX1dR	caggaaacagctatgact GAAAYAAAYAIIGGATCICCACC	Moszczyńska <i>et al.</i> , 2009
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	Messing, 1993
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing, 1993

Además de las amplificaciones de la región del código de barras (región Folmer), también se llevaron a cabo amplificaciones de otra región de COI, obtenida con los primers JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') y JB4.5 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') (Bowles *et al.*, 1993) para *G. quieta*, con el fin de poder ser comparadas con las secuencias disponibles en GenBank para estos organismos y así corroborar molecularmente la identificación de la especie. El

programa de amplificación consistió en: 96°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 40 s y 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Las reacciones de amplificación y secuenciación se realizaron de acuerdo al protocolo anteriormente descrito.

Todas las secuencias de helmintos generadas en el presente estudio serán depositadas en la base de datos de BOLD (<http://www.boldsystems.org/>).

Análisis de distancias genéticas

El análisis de distancias genéticas de los fragmentos del código de barras se realizó por el método de Neighbor joining (NJ) usando el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) implementado en MEGA versión 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011) y los valores de bootstrap con 1,000 réplicas se realizó en PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2001).

En el análisis de nemátodos se incorporaron tres secuencias de *Contracaecum* sp., dos provenientes del Lago de Atotonilco y una de Chapala, tres secuencias de *Foleyellides striatus*, provenientes de las tres localidades, y tres secuencias de *Rhabdias* n. sp. del lago de Chapala. Como grupo externo se utilizó en nemátodo de la clase Enoplea *Platycoma* sp. con número de acceso a GenBank KC015000.

Para el análisis de platelmintos se utilizaron tres secuencias de *Glypthelmins quieta* del Lago de Chapala y una secuencia de *Ophiotaenia* sp. del lago de Cajititlán. Como grupo externo se utilizó el tremátodo *Diplostomum baeri* con número de Genbank FJ477194.

6.4 Análisis ecológico

6.4.1 Caracterización de las infecciones

La caracterización de las infecciones se realizó utilizando los parámetros de prevalencia, abundancia media, intensidad promedio e intervalo de intensidad, de acuerdo con Bush *et al.*, (1997).

- **Prevalencia:** Porcentaje de hospederos infectados por una especie particular de parásito en una muestra dada.
- **Abundancia:** Número promedio de individuos de una especie particular de parásito por hospedero revisado en la muestra.

- **Intensidad promedio:** Número promedio de individuos de una especie particular de parásito por hospedero infectado en la muestra.
- **Intervalo de intensidad:** Número mínimo y máximo de individuos de una especie en particular de parásito encontrados en la muestra.

6.4.2 Análisis de comunidades

Las comunidades se analizaron a dos niveles, infracomunidad y componente de comunidad. Se define como infracomunidad a todos los parásitos presentes en cada hospedero individual estudiado, y componente de comunidad al conjunto de infracomunidades en una población de hospederos (Esch y Fernandez, 1993). Los siguientes atributos fueron analizados para las comunidades de cada localidad en el programa Ecological Methology versión 7.2 (Krebs, 2011): riqueza, abundancia, diversidad, equidad y dominancia.

Riqueza: Se define como el número total de especies de helmintos encontrados en una población de hospederos estudiada. A nivel de infracomunidades, se obtiene un promedio de todas las infracomunidades estudiadas en una población de hospedero determinada.

Abundancia: Es el número total de helmintos presentes en una población de hospederos estudiada. Para el análisis de infracomunidades se obtuvo un promedio de todas las infracomunidades de la población de hospederos.

Dominancia: Ofrece una medida de abundancia proporcional, con valores de 0 a 1, de la especie dominante tanto a nivel de infracomunidad como de componente de comunidad (mientras más cercano a 0 menos dominancia). Se obtuvo por medio del índice de Berger-Parker:

$$BP = \frac{Ni_{max}}{N}$$

Donde: BP= Berger-Parker, Ni= número de individuos máximos de una especie,
N= número total de individuos de todas las especies.

Diversidad: Es una medida cuantitativa que refleja el número de especies que existen en determinada población, y al mismo tiempo toma en consideración qué tan uniforme se distribuye la abundancia de los individuos. En el presente estudio se utilizó el índice de Brillouin, el cual es considerado como un índice heterogéneo. Este

índice es empleado cuando una comunidad está completamente censada y es sensible a las abundancias de las especies raras. Está dado por:

$$\hat{H} = \frac{1}{N} \log \left(\frac{N!}{n_1! n_2! n_3! \dots L} \right)$$

Donde: \hat{H} = índice de Brillouin; N = número total de individuos en toda la colección; n_1 = número de individuos perteneciente a la especie 1; n_2 = número total de individuos pertenecientes a la especie 2.

Equidad: Refleja la distribución de las abundancias proporcionales de las especies presentes en la comunidad. Muchas medidas de la equidad han sido propuestas y la literatura es confusa acerca de cuál es la mejor. Para el presente estudio se siguieron los criterios de Smith y Wilson (1996), los cuales sugieren que se utilice la equidad del índice de Simpson cuando se desea dar el mismo peso a las especies raras y a las comunes, y cuando un mínimo de cero sea requerido para cualquier número de especies. Lo más importante es que el índice de Simpson es matemáticamente independiente de la riqueza (Smith y Wilson, 1996). La equitatividad estimada a partir del índice posee valores cercanos a 0 cuando la mayoría de los individuos pertenecen a pocas especies, y cercano a 1, cuando las especies son casi igualmente abundantes, y se calcula de la siguiente manera:

Índice de Simpson:

$$D = \sum p_i^2$$

Donde: D = índice de Simpson; p_i = proporción de especies i en la comunidad.

Equitatividad a partir del índice de Simpson:

$$E_{1/D} = \frac{1}{\hat{D}}$$

Donde: $E_{1/D}$ = medida de equidad de Simpson; \hat{D} = índice de Simpson; S = número de especies en la muestra.

6.4.3 Análisis de similitud

Porcentaje de similitud

La similitud cuantitativa de las infracomunidades se calculó mediante porcentaje de similitud, también llamado índice de Renkonen. Para calcular dicho índice, cada infracomunidad debe estar estandarizada como porcentajes, de modo

que todas las abundancias relativas sumen el 100% de cada muestra. Este coeficiente es uno de las mejores medidas de similitud cuantitativas disponibles, es relativamente poco afectado por el tamaño de muestra y la diversidad de especies. Este índice tiene un rango de 0 (no similares) a 1 (completamente similares) (Krebs, 2011). La fórmula es:

$$P = \sum_i \text{minimum} (\rho_{1i}, \rho_{2i})$$

Donde: P= porcentaje de similitud entre la muestra 1 y 2, ρ_{1i} = porcentaje de especies i en la comunidad de la muestra 1, ρ_{2i} = porcentaje de especies i en la comunidad de la muestra 2.

Coeficiente de Sorensen:

Para el análisis cualitativo de las infracomunidades se utilizó el coeficiente de similitud de Sorensen, el cual empleado primero por Czekanowski en 1913 y descubierto nuevamente por Sorensen en 1948. Este es un índice binario que le da más peso a las coincidencias en la composición de especies de dos muestras que a las incongruencias, el rango de valores es de 0 (sin congruencias) a 1 (completamente similares) (Krebs, 2011). Se calcula como sigue:

$$S_s = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde: S_s = índice de Sorensen; a= número de especies en muestra A y muestra B (ocurrencias en ambas muestras); b= especies en muestras B pero no en A; c= especies en muestra A pero no en B.

Agrupamiento por UPGMA

Los valores promedios de los análisis de similitud cuantitativa por el método de porcentaje de similitud, y de la similitud cualitativa por el índice Sorensen para cada par de localidades evaluada fueron agrupados a mano por el método *Unweighted Pair-group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA), mediante la fórmula:

$$S_{j(k)} = \frac{1}{t_j t_k} (\sum S_{jk})$$

$S_{j(k)}$ = Promedio de similitud entre los agrupamientos j y k ; t_j = número de muestras en los agrupamientos j ; t_k = número de muestras en los agrupamientos k ; S_{jk} = Coeficiente de similitud entre cada muestra en j y k .

7 RESULTADOS

7.1 Registro hemintológico

Se recolectaron siete especies de helmintos provenientes de *Lithobates megapoda* de las localidades de Lago de Atotonilco, Lago de Cajititlán y Lago de Chapala. Los nemátodos fueron el grupo más abundante y diverso con cuatro especies, seguido de los platelmintos con dos y una especie de acantocéfalos. Tres de estas especies representan nuevos registros para el hospedero (Tabla 5).

Tabla 5. Helmintofauna de *L. megapoda* de las tres localidades del presente estudio.

Especie	Sitio de infección	Lago Atotonilco	Lago Cajititlán	Lago de Chapala
Platyhelminthes				
<i>Glypthelmins quieta</i> ^{*1}	Intestino	X		X
<i>Ophiotaenia</i> sp. § ¹²	Intestino		X	
Nematoda				
<i>Contracaecum</i> sp. ²	Varios órganos	X		X
<i>Eustrongylides</i> sp. ²	Varios órganos	X	X	X
<i>Foleyellides striatus</i> ¹	Mesenterio	X	X	X
<i>Rhabdias</i> n sp. § ^{*1}	Pulmón	X		X
Acanthocephala				
Polymorphidae gen. sp. ^{§*2}	Varios órganos	X		X

* Registrada únicamente en Ocotlán, Jal.; § nuevo registro de hospedero; 1=adulto; 2= formas larvarias.

Cuatro de las siete especies son típicas de anuros con excepción de *Contracaecum* sp., *Eustrongylides* sp. y Polymorphidae gen. sp. que concluyen su ciclo de vida en aves piscívoras y utilizan a los peces como segundos hospederos intermediarios.

Contracaecum sp., *Eustrongylides* sp. y Polymorphidae gen. sp. se encontraron sólo en su etapa larvaria, *Ophiotaenia* sp. se recolectó tanto en estadio de plerocercoides como adulto y el resto sólo en etapa adulta.

Las larvas se encontraron enquistadas en el exterior de diversos órganos internos, siéndoles estos sitios de infección los más comunes, seguido del intestino y pulmón.

Todas las especies llegan a *L. megapoda* mediante ingestión, con excepción de *Foleyellides striatus* y *Rhabdias* n. sp., cuyo patrón de infección es la penetración cutánea.

A continuación se presenta la caracterización morfológica de las especies encontradas en el presente estudio. Además de incluyen comentarios taxonómicos, aspectos de su distribución en México, hospederos donde se ha registrado previamente, así como su desarrollo y transmisión.

7.2 Caracterización morfológica de los helmintos de *Lithobates megapoda*

7.2.1 Phylum: Platyhelminthes Gegenbaur 1859

7.2.1.1 *Glyphelminis quieta*

Clase: **Trematoda** Rudolphi 1808

Subclase: **Digenea** Carus 1863

Orden: **Plagiorchiida** La Rue 1957

Superfamilia: **Plagiorchioidea** Lühe 1901

Familia: **Glyphelminthidae** Cheng 1959

Género: ***Glyphelminis*** Stafford 1905

Glyphelminis quieta (Stafford 1900) Stafford 1905

Hábitat: Intestino anterior

Estadio: Adulto

Localidad: Lago de Atotonilco y Lago de Chapala (Ocotlán)

No. CNHE: 9049-9050

Descripción general: Digéneos de cuerpo alargado y extremos redondeados. Poseen prominentes glándulas prefaríngeas a ambos extremos de la faringe, agrupadas en forma de racimo, localizadas desde el borde anterior de la faringe y posteriormente sobrepasan la bifurcación cecal. Posee testículos simétricos. Las glándulas vitelógenas se extienden desde el esófago hasta el segundo tercio del cuerpo. Las asas uterinas son transversales y se localizan en la región cecal e intercecal (Figura 6).

Diagnosis [Basado en 12 individuos maduros (dos del lago de Atotonilco y 10 del Lago de Chapala en Ocotlán) salvo excepciones señaladas medidas dadas en mm]: Cuerpo elongado de 1.77 ± 0.34 (1.41-2.56) de largo, por 0.54 ± 0.05 (-0.47-0.67) de

ancho a nivel del acetábulo. Anchura máxima en la región testicular 0.58 ± 0.08 (0.50-0.74); extremos redondeados, aunque el posterior es más pronunciado que el anterior. Ventosa oral subterminal, redondeada, ligeramente más ancha que larga con 0.22 ± 0.02 (0.19-0.24) de largo por 0.24 ± 0.02 (0.22-0.29) de ancho; con la boca redonda abierta al centro de la ventosa oral y dirigida anteroventralmente con 95 ± 20 (66-149) μm de largo por 89 ± 10 (66-124) μm de ancho. Acetábulo situado en el primer tercio del cuerpo, anterior a los testículos y debajo de la bifurcación cecal. De forma esférica y más pequeño que la ventosa oral con 0.28 ± 0.01 (0.10-0.15) de largo por 0.15 ± 0.01 (0.12-0.16) de ancho. Faringe redonda y musculosa con 0.12 ± 0.03 (0.01-0.2) de largo por 0.15 ± 0.01 (0.12-0.19) de ancho; a cada lado se encuentran glándulas prefaríngeas, en forma de racimo que se extienden desde el borde anterior de la faringe hasta sobrepasar la bifurcación cecal. El esófago se ubica por debajo de la faringe y se bifurca para formar los ciegos intestinales a 0.43 ± 0.06 (0.37-0.58) del borde anterior del cuerpo, los ciegos se localizan simétricamente laterodorsalmente, extendiéndose casi hasta el final del cuerpo. El ciego izquierdo mide 1.0 ± 0.2 (0.83-1.45) de largo por 0.09 ± 0.01 (0.07-0.1) de ancho y termina a 0.28 ± 0.06 (0.18-0.45) del borde posterior del cuerpo. El ciego derecho mide 0.91 ± 0.09 (0.83-1.17) de largo por 0.9 ± 0.01 (0.07-0.15) de ancho y termina a 0.30 ± 0.08 (0.20-0.49) del borde posterior del cuerpo. Posee dos testículos intercecales, o en ocasiones sobrelapando los ciegos, se localizan preecuatorialmente y posteriores al acetábulo; poseen forma esférica u ovoide, situados uno al lado del otro. El testículo izquierdo mide 0.20 ± 0.03 (0.17-0.25) de largo por 0.20 ± 0.01 (0.15-0.22) de ancho. El derecho mide 0.18 ± 0.03 (0.17-0.25) de largo por 0.20 ± 0.02 (0.17-0.25) de ancho. El ovario es esférico, intercecal, ventral, preecuatorial y se encuentra a la izquierda del acetábulo o en ocasiones invade el borde del acetábulo y mide 0.14 ± 0.01 (0.11-0.17) de largo por 0.15 ± 0.01 (0.13-0.17) de ancho. El útero es sinuoso, y ocupa el área intercecal y cercal; posee numerosas asas transversales localizadas desde la región anterior de los testículos hasta el borde posterior del cuerpo. El poro genital se localiza anterior al acetábulo a 0.5 ± 0.06 (0.44-0.63) del borde anterior del cuerpo y a 33 ± 7 (21-43) μm del acetábulo. Las glándulas vitelógenas varían en su forma y distribución, puesto que en ocasiones se extienden hasta la faringe, a la bifurcación cecal o a las glándulas prefaríngeas y posteriormente sobrepasan a los testículos; los folículos tienen una posición extracecal e intercecal con la mayoría de ellos ubicados extracecalmente;

tienen una longitud total de 0.7 ± 0.07 (0.6-0.81) por 0.17 ± 0.05 (0.08-0.25) de ancho. Los huevos presentan cáscara de color amarillo y miden 40 ± 2 (36-43) μm de largo por 16 ± 1 (15-17) μm de ancho (n=50). La vesícula excretora tiene forma de "I" y abre en un poro excretor localizado en el borde posterior del cuerpo.

Comentarios taxonómicos: En 1900 Stafford describió a *Distomum quietum* del intestino de anuros de Canadá. En 1905 el mismo autor erigió el género *Glyphelmins* transfiriendo a *D. quietum* y la colocó como especie tipo, sin embargo, no hizo una descripción detallada del género, ni lo asignó a ninguna categoría taxonómica mayor (Razo-Mendivil *et al.*, 2006).

Esto ha ocasionado una gran controversia en la taxonomía de *Glyphelmins*, ya que especies incluidas en éste género han sido alternadamente asignadas a los géneros *Margeana*, *Haplometrana*, *Rauschiella* y *Choledocystus*, por mencionar algunos. La posición del género dentro del orden Plagiorchiida, ha sido controversial también, puesto que se le ha colocado por diversos autores dentro de las familias Plagiorchiidae, Brachycoelidae y Macroderoididae (Razo-Mendivil *et al.*, 2006).

Razo-Mendivil *et al.* (2006) realizaron un análisis filogenético con secuencias del gen ribosomal 28S, para dilucidar la relación de *Glyphelmins* con otros plagiorquidos y concluyeron que *Glyphelmins sensu lato* como tradicionalmente se ha clasificado no es monofilético, asimismo señalaron que no pertenece a ninguna de las familias anteriormente mencionadas.

Razo-Mendivil y Pérez-Ponce de León (2008) proponen que *Glyphelmins sensu stricto* es un género válido, formado por las siguientes 10 especies: *G. quieta*, *G. californienesis*, *G. parva*, *G. intestinalis*, *G. shastai*, *G. facioi*, *G. pennsylvaniensis*, *G. hyloreus*, *G. brownorumae* y *G. tuxtlanensis*.

Por último, Razo-Mendivil y Pérez-Ponce de León (2011) con un análisis filogenético que incluye 26 caracteres morfológicos, cuatro marcadores nucleares (18S, 5.8 ITS2 y 28S) y uno mitocondrial (*cox1*) confirmaron la monofilia de *Glyphelmins* integrado por las especies mencionadas por Razo-Mendivil y Pérez-Ponce de León (2008) y coinciden con Tkach (2008) en erigir la familia monogénica Glyphelminthidae Cheng, 1959, con *G. quieta* como especie tipo.

El material aquí estudiado fue asignado a *Glyphelmins quieta* debido a la presencia de dos prominentes glándulas prefaríngeas ubicadas a cada lado de la

faringe. Esta especie es la única que posee dicho carácter dentro del género (Razo-Mendivil y Pérez-Ponce de León, 2008). Además de la identificación morfológica, también se corroboró su identidad molecularmente al comparar un fragmento de COI (amplificado con los primers de JB3 y JB4.5 de Bowles *et al.*, 1993) contra la base de datos del GenBank mediante BLAST, dando como resultado una identidad de 99% con la secuencia HM137621.1 de *G. quieta* (Razo-Mendivil y Pérez-Ponce de León, 2011).

Registros previos: Ésta especie ha sido registrada en las siguientes localidades y hospederos de México: Colima, Coquimatlán: *Lithobates magnaocularis*, *Lithobates* sp. D. F., Lago de Xochimilco: *Lithobates montezumae*. Estado de México, Ciénega de Lerma: *Lithobates montezumae*; Lago de Texcoco: *Lithobates montezumae*. Jalisco, Atenquique: *Lithobates psilonota* (Romero-Mayén, 2011), *Lithobates* sp.; Lago de Chapala: *Lithobates megapoda*; Tapalpa: *Lithobates neovolcanica*. Michoacán, Lago de Cuitzeo: *Lithobates megapoda*; Lago de Pátzcuaro, Lago de Zacapu: *Lithobates dunnii*; Manantiales de Cointzio: *Lithobates megapoda*, *Lithobates neovolcanica*. Oaxaca, Huitzo: *Lithobates spectabilis*. Sinaloa, *Lithobates magnaocularis*; Yecora: *Lithobates tarahumarae* (Paredes-Calderón *et al.*, 2008 a menos que se señale otra fuente).

Desarrollo y transmisión: Los adultos habitan en el intestino delgado de anuros, luego los huevos de estos se dispersan con las excretas del huésped. Posteriormente un caracol de la especie *Physa gyrina* (Physidae) ingiere las heces y se convierte en el primer hospedero intermediario donde los huevos eclosionan en el intestino y se liberan los miracidios, los cuales dan origen a un esporocisto madre e hijo. Estos últimos originan a xifidiocercarias armadas con estiletes. Las xifidiocercarias salen al medio acuático perforando el cuerpo del caracol y buscan a su segundo hospedero intermediario y definitivo, que puede ser ranas o sapos. Cuando localizan al huésped adecuado se adhieren a la piel de éste mediante dos ventosas y posteriormente la penetran. En ese momento pierden la cauda y se enquistan, dando lugar así a la metacercaria. Finalmente los sapos o ranas se infectan al comer la muda de su piel llena de metacercarias. Una vez en el interior, la metacercaria madura en el intestino hasta convertirse en adulto (Figura 7) (Leigh, 1946).

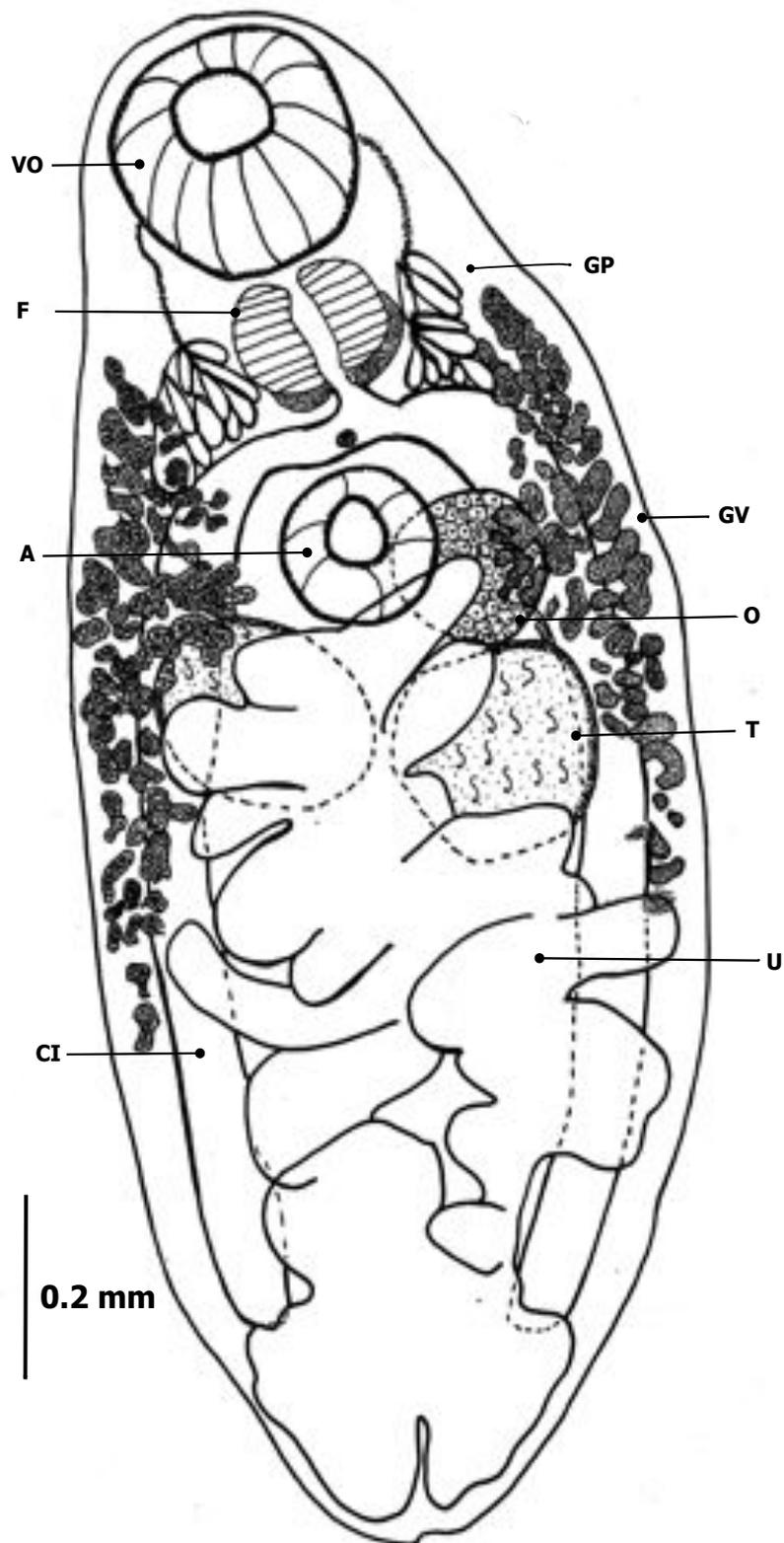


Figura 6. Microscopía óptica de *Glypthelmins quieta*, vista ventral de un ejemplar adulto. A= acetábulo; CI= ciegos intestinales; F= Faringe; GP= glándulas prefaríngeas; GV= glándulas vitelógenas; O= ovario; T= testículos; U= útero; VO= ventosa oral.

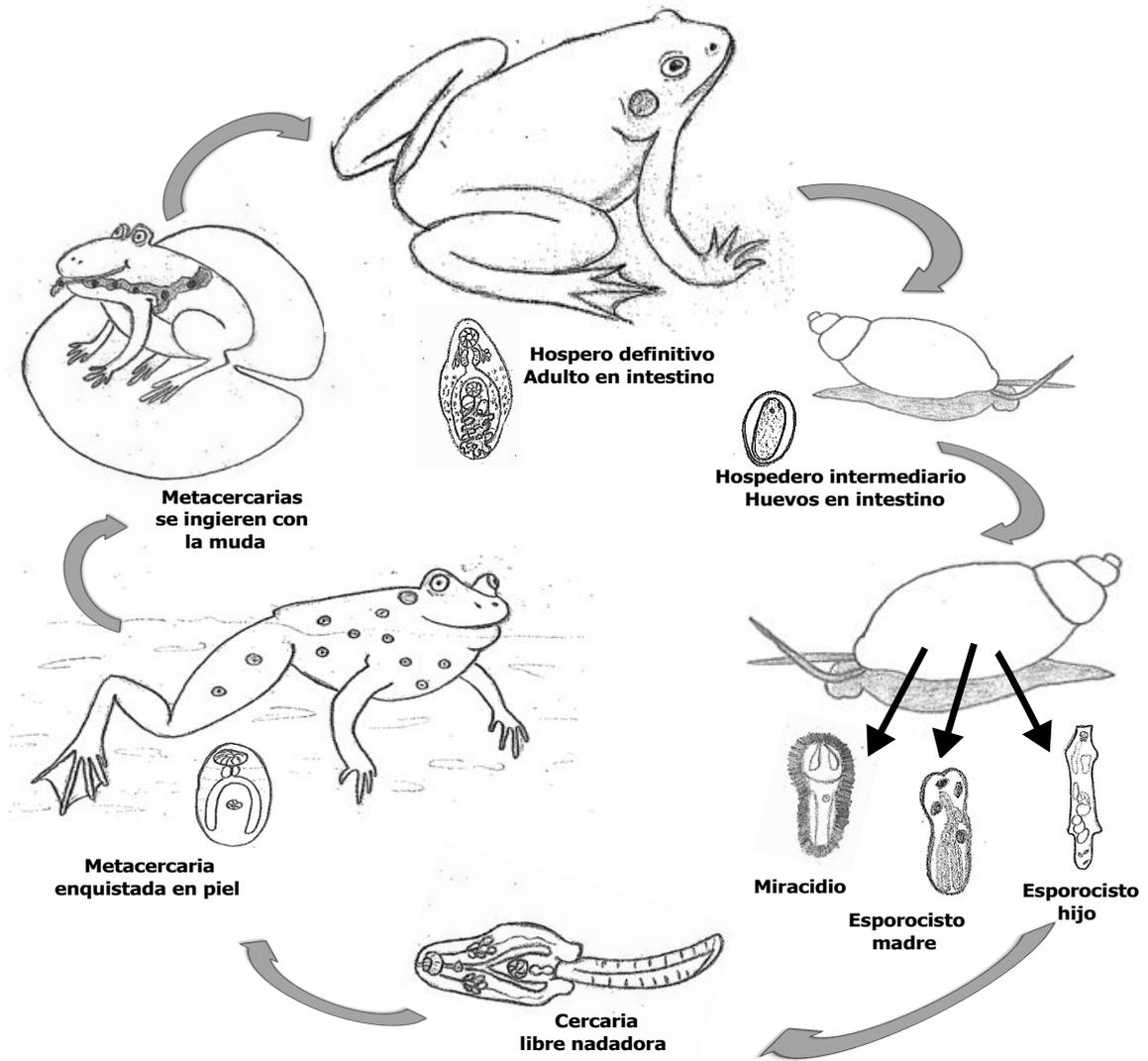


Figura 7. Desarrollo y transmisión de *Glythelmins quieta* de acuerdo con Leigh (1946) Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.1.2 *Ophiotaenia* sp.

Clase: **Cestoidea** Rudolphi 1808

Subclase: **Eucestoda** Southwell 1930

Orden: **Proteocephalidea** Mola, 1928

Familia: **Proteocephalidae** La Rue 1911

Subfamilia: **Proteocephalinae** Mola 1929

Género: **Ophiotaenia** La Rue 1911

***Ophiotaenia* sp.**

Hábitat: Intestino anterior e hígado

Estadio: Adulto y plerocercario

Localidad: Lago de Cajititlán

No. CNHE: 9051-9052

Descripción general: Gusanos pequeños, delgados, aplanados. Color blanco, en vida algo translúcidos. Estrobilación no evidente con surcos superficiales intersegmentales. Superficie lisa. Escolex globoso, aplanado dorsoventralmente, sin rostelo ni espinas.

Diagnosis [Basada en un individuo, salvo excepciones señaladas medidas dadas en mm]: Anchura máxima 0.79. Estróbilo acraspedote, compuesto por proglótidos maduros, pregrávidos y grávidos. Proglótidos maduros más anchos que largos (0.62-0.79 de ancho por 0.37-0.52 de largo n=5); proglótidos grávidos más largos que anchos (0.74-0.87 de ancho por 0.93-1.08 de largo n=5) y pregrávidos mucho más largos que anchos (0.64-0.79 de ancho por 1.14-1.77 de largo n=5). Escolex con cuatro ventosas uniloculadas de 0.8-0.9 de ancho por 0.12-0.13 de largo (Figura 8).

Musculatura longitudinal interna bien desarrollada, formada por paquetes anastomosados de fibras musculares. Canales osmoregulatorios ventrales bien desarrollados, que sobrelapan con los testículos y el ovario, los dorsales no se pudieron observar (Figura 9).

Testículos medulares, elongados a ovals de 54.25-69.44µm de largo por 30.38-49.91µm de ancho (n=10), bien separados en dos campos laterales, el número por proglótido va de 84-112 (n=7), nunca llegan al margen anterior del ovario. Conducto deferente fuertemente enroscado, alcanzando la línea media de los proglótidos. Bolsa del cirro elongada de pared delgada, 140-210µm de larga (n=10), ocupa del 29.3-32.6% (n=5) del ancho del proglótido, lo que representa una relación

bolsa del cirro/ancho del proglótido de 1:3-1:3.33 (n=5). Poros genitales irregularmente alternados, situados pre-ecuatorialmente hacia el primer 5º aproximadamente (Figura 8).

Ovario medular, compacto, bilobulado de 541-666 µm de ancho, ocupando el 83-91% de la anchura del proglótido (n=5); de largo mide 230-395µm, ocupando 16-25% de la longitud total del proglótido (n=5). Vagina siempre anterior a la bolsa del cirro. Folículos vitelógenos medulares, ovales, arreglados en dos bandas laterales en el lado dorsal del proglótido, interrumpidos ventral y dorsalmente al nivel de los genitales (bolsa del cirro y vagina) y se ven disminuidos, o no continúan después de la bolsa del cirro en algunos proglótidos. Las bandas de los folículos no llegan al margen anterior de los segmentos (Figura 8).

Útero medular, con 32-42 (n=7) ramas uterinas laterales en cada lado en proglótidos maduros. En proglótidos pregrávidos el número de ramas uterinas alcanza las 60 (Figura 8).

Comentarios taxonómicos: *Ophiotaenia* es el segundo género más especioso de los céstodos proteocefálicos con aproximadamente 74 especies parásitas de anfibios y reptiles, de las cuales 24 parasitan anfibios (de Chambrier *et al.*, 2006). La sistemática del género no está satisfactoriamente resuelta, especialmente por las descripciones incompletas basadas en material fijado y procesado inadecuadamente, y puesto que la existencia del material tipo de muchas especies es desconocido es imposible confirmar los caracteres diagnósticos a nivel específico (de Chambrier *et al.*, 2012).

El material estudiado fue incluido en el género *Ophiotaenia* La Rue, 1911, por la posición medular de los folículos vitelógenos, el escolex desarmado con ventosas uniloculadas y los testículos formando dos hileras separadas (Ammann y de Chambrier, 2008; de Chambrier *et al.*, 2012).

Nuestros ejemplares poseen caracteres compartidos con *O. filaroides* La Rue 1909 descrita de *Ambystoma californiense* (= *Ambystoma tigrinum*) de Nebraska y Kansas, EUA, redescrita por Mead y Olsen (1971) y con *O. bonneti* de Chambrier, Coquille y Brooks 2006, de *Lithobates vaillanti* (= *Rana vaillanti*) en San Gerardo, Guanacaste, Costa Rica (Tabla 6). Según de Chambrier *et al.*, (2006) la única diferencia entre *O. filaroides* y *O. bonneti* es la ausencia de órgano apical en ésta

última. Desafortunadamente el escolex de nuestro material se encuentra en muy mal estado de preservación por lo que no fue posible observar dicho carácter.

Un carácter que diferencia a nuestro material de estas dos especies es la distribución de las glándulas vitelógenas, mientras que en nuestro material siempre sobrelapan con el ovario, en las otras dos especies no ocurre esto (basándose en las ilustraciones). Además, en algunos proglótidos de nuestro material no se presentan vitelógenas anteriormente a la bolsa del cirro, mientras que no se menciona esta característica en *O. bonneti* (sólo se menciona que las vitelógenas se ven disminuidas en esta área) y en *O. filaroides* a juzgar por las ilustraciones tampoco hay ausencia de vitelógenas en dicha área.

Sin embargo, de acuerdo a de Chambrier *et al.*, (2006) debido a que *Ophiotaenia* presenta una alta especificidad hospedatoria y geográfica, es muy probable que *O. filaroides* no exista en México y que las registradas en éste país sean más bien especies nuevas. Dada la morfología tan parecida de nuestro material con dicha especie no es posible diferenciarla de una manera contundente, y ya que tampoco existen secuencias de ADN disponibles en GenBank, tampoco fue posible realizar la identificación con caracteres moleculares.

De acuerdo con los criterios de especificidad hospedatoria de de Chambrier *et al.*, (2006), es muy probable que nuestra material tampoco pertenezca a *O. bonneti*, ya que *Lithobates vaillanti* no se distribuye en los mismos lugares que *L. megapoda*. Mientras que *L. vaillanti* habita hacia el sureste mexicano, *L. megapoda* se encuentra en el centro-occidente de México (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2006a; Ochoa-Ochoa *et al.*, 2006b).

Registros previos: Las especies de este género registradas en México son: *O. filaroides*, *O. magna*, *O. nattereri*, *O. perspicua*, *O. racemosa*, y *O. variabilis*, las dos primeras registradas únicamente en ranas y las últimas cuatro en reptiles. Los hospederos y localidades de las registradas en ranas son:

Ophiotaenia filaroides: *Lithobates montezumae*, Lago de Xochimilco, D. F. *Lithobates montezumae*, Lago de Texcoco, Estado de México. *Lithobates dunnii*, Lago de Pátzcuaro, Michoacán. *Lithobates berlandieri*, La Laguna, Nuevo León (Paredes-León *et al.*, 2008).

Ophiotaenia magna: *Lithobates montezumae*, Lago de Xochimilco, D. F. *Lithobates tarahumarae*, Yecora, Sonora (Paredes-León *et al.*, 2008).

Desarrollo y transmisión de *Ophiotaenia filaroides*: El ciclo de vida fue dilucidado experimentalmente por Mead y Olsen (1971). Copépodos de la especie *Cyclops vernalis* se infectan con huevos de *Ophiotaenia filaroides* liberados en las heces del hoppedero definitivo, la salamandra tigre *Ambystoma tigrinum*. En el copépodo se lleva a cabo el desarrollo a procercoide a los 8-9 días y luego a plerocercoides a los 10-11 días postinfección. La salamandra ingiere los copépodos y se lleva a cabo el desarrollo al estadio adulto en el intestino. El canibalismo entre salamandras se presenta tanto en campo como en condiciones de laboratorio, particularmente entre larvas, y podría ser un importante medio para la transmisión de este parásito (Figura 10).

Tabla 6. Comparación morfométrica de algunas *Ophiotaenia* spp.

Carácter	La Rue, 1909§	Mead y Olsen, 1971	de Chambrier, Coquille y Brooks, 2006	Presente estudio
Helminto	<i>Ophiotaenia filaroides</i>	<i>Ophiotaenia filaroides</i>	<i>Ophiotaenia bonneti</i>	<i>Ophiotaenia</i> sp.
Hospedero	<i>Ambystoma californiense</i> (= <i>Ambystoma tigrinum</i>)	<i>Ambystoma californiense</i> (= <i>Ambystoma tigrinum</i>)	<i>Lithobates vaillanti</i> (=Rana <i>vaillanti</i>)	<i>Lithobates megapoda</i> (= <i>Rana megapoda</i>)
Localidad	Kansas y Nebraska, EUA	Experimental	San Gerardo, Guanacaste, Costa Rica	Lago de Cajititlán, Jalisco, México
Longitud estrobilar	80-110 mm	88-247 mm	60-380 mm	ND
Órgano apical	Vestigial	Presente	Ausente	ND
# Testicular	70-117	53-183	100-177	84-112
Distribución testicular	2 campos	ND	2 campos	2 campos
Distribución de las vitelógenas	Se distribuyen a lo largo de todo el proglótido, sin sobrelapar con el ovario*	ND	Ocupan del 78-90% de la longitud total del proglótido disminuyendo en los extremos, especialmente a nivel de la bolsa del cirro	Ocupan el 90% de la longitud del proglótido, no alcanzan la región anterior del proglótido y sobrelapan con el ovario
Abertura vaginal	Anterior a la bolsa del cirro	ND	Anterior a la bolsa del cirro	Anterior a la bolsa del cirro
# De ramas uterinas	25-35	18-40	18-32	32-42
Relación lbc/ap	1:2.9*	1:2.0 - 1:4.9	1:6.66 - 1:4.16	1:3-1:3.33
Posición del ovario/can. osm.	Canales excretores pasan sobre el ovario*	ND	Canales excretores pasan sobre el ovario	Canales excretores pasan sobre el ovario
Posición del poro genital	Al final del primer 5º	ND	Final del primer 5º	Final del primer 5º

* Estructuras observadas en ilustraciones de las publicaciones; § Fuente: La Rue, 1914; ND= No hay datos

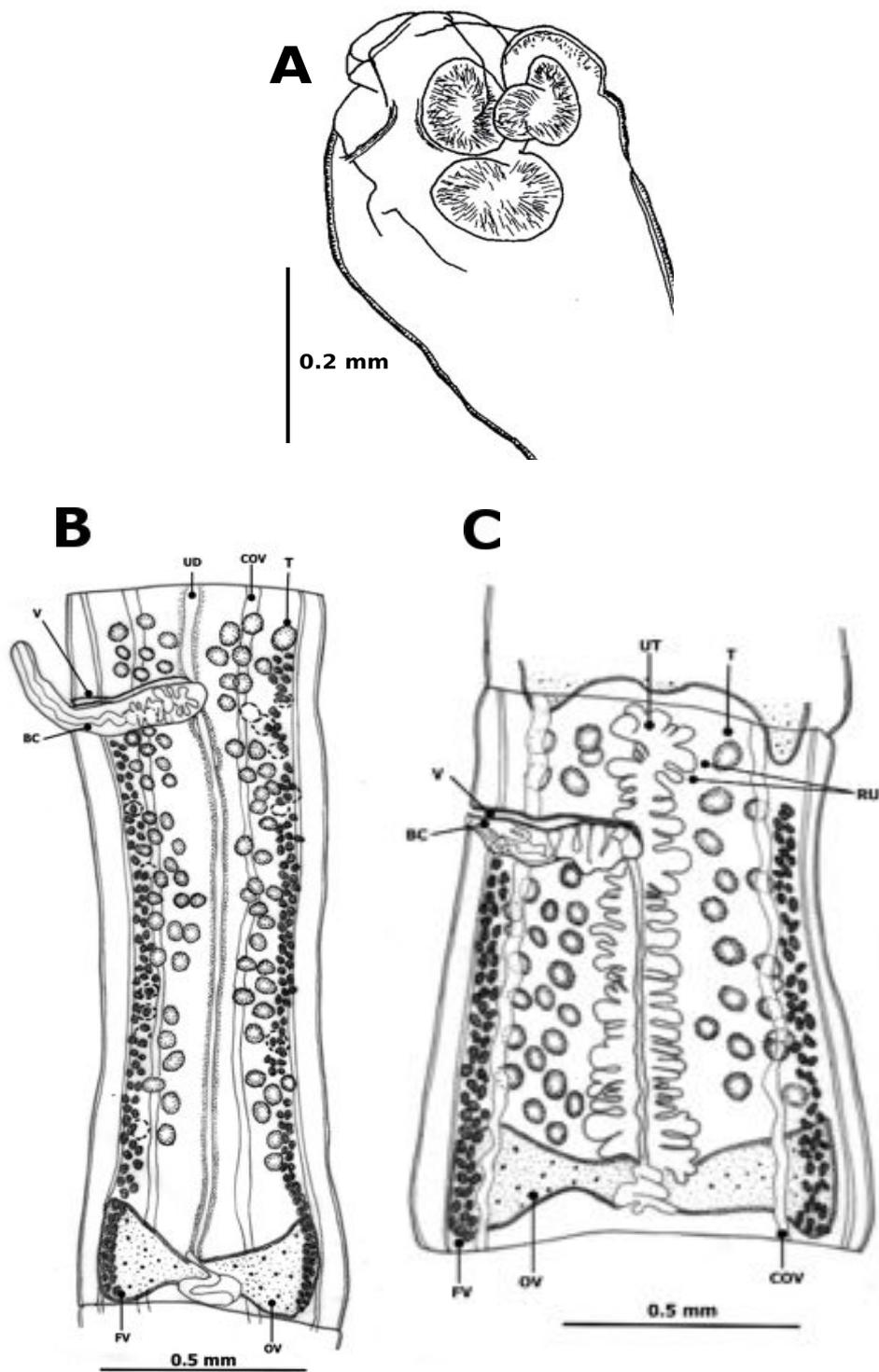


Figura 8. Microscopía óptica de *Ophiotaenia* sp. de *L. megapoda*, lago de Cajitilán, Jal. A, Excolex, vista dorsoventral; B, proglótido maduro, vista dorsal; C, proglótido pre grávido, vista ventral. BC= bolsa del cirro, COV= canal osmoregulador ventrales, FV= folículos vitelógenos, OV= ovario, RU= ramas uterinas, T= testículos, UT= utero, V= vagina.

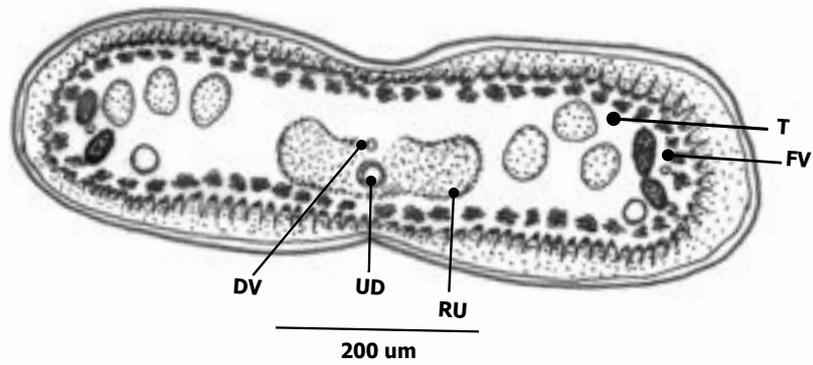
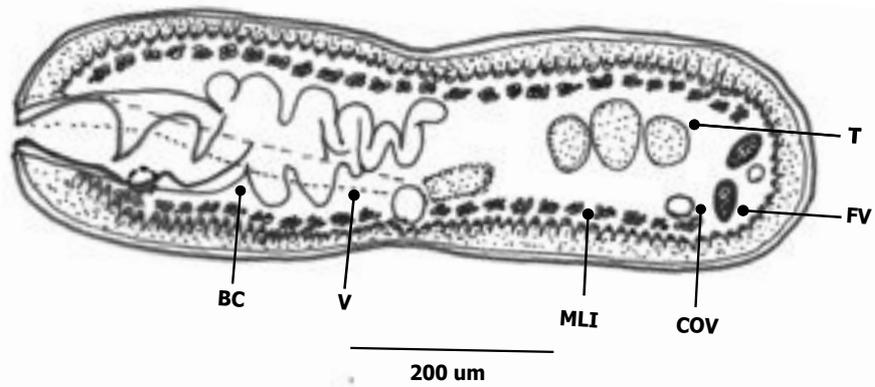
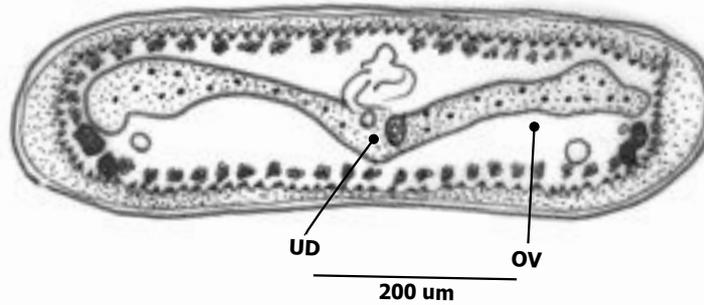
A**B****C**

Figura 9. Microscopia óptica de *Ophiotaenia* sp. A, corte a nivel de los testículos; B, corte a nivel de la bolsa del cirro; C, corte a nivel del ovario. BC= bolsa del cirro, COV= canal osmoregulador ventral, DV= ducto vaginal, FV= folículos vitelógenos, MLI= musculatura longitudinal interna, OV= ovario, RU= ramas uterinas, T= testículos, U= utero, UD= uteroducto, V= vagina.

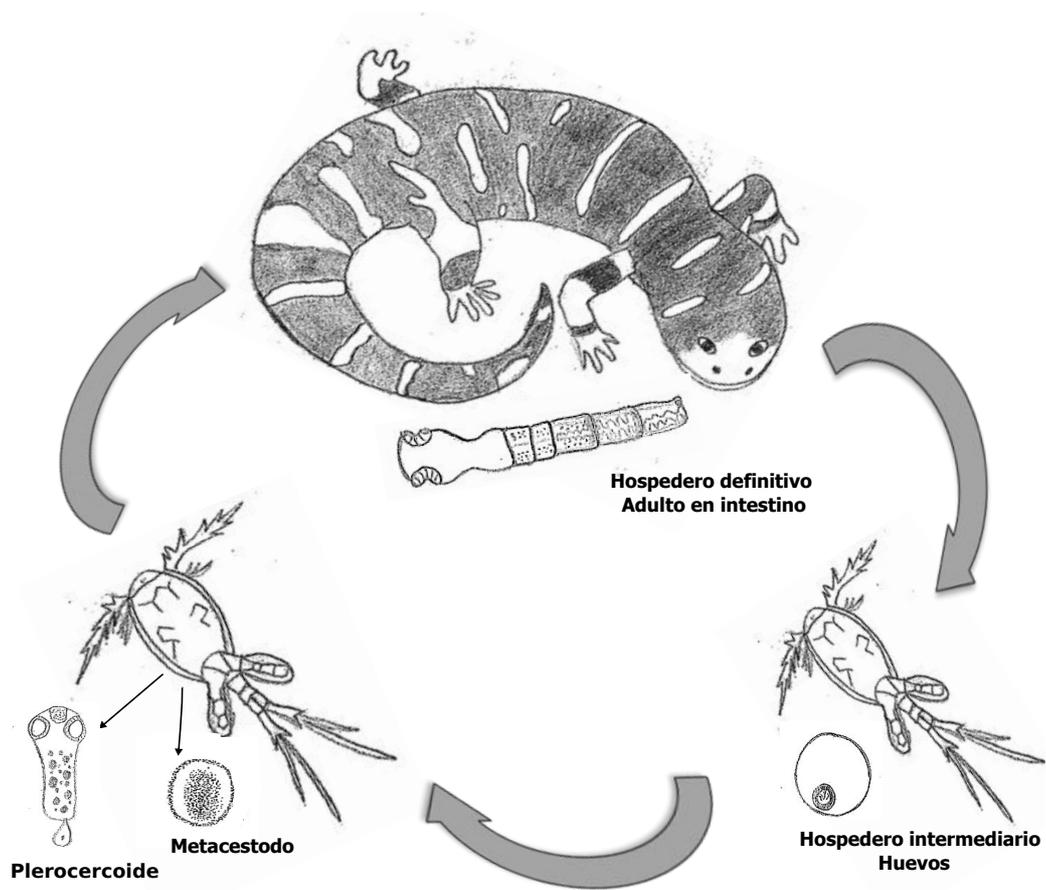


Figura 10. Desarrollo y transmisión de *Ophiotaenia filaroides* de acuerdo con Mead y Olsen (1971). Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.2 *Phylum: Acanthocephala Rudolphi 1801*

7.2.2.1 *Polymorphidae gen. sp.*

Clase: **Palaeacanthocephala** Meyer 1931

Orden: **Polymorphida** Petrochenko 1956

Familia: **Polymorphidae** Meyer 1931

Polymorphidae gen. sp.

Hábitat: Cavidad

Estadio: Cistacanto

Localidad: Lago de Atotonilco

Diagnosis: (Basado en un individuo). Longitud total de 4.62mm y anchura total de 0.75mm. Proboscis ovoide, con la anchura máxima encontrada en el nivel medio, la cual está separada del tronco por un cuello relativamente largo y está armado por 18 hileras longitudinales de ganchos, con aproximadamente 12 ganchos por hilera (Figura 11). El receptáculo de la proboscis posee doble pared de 1 mm de largo por 0.2 mm de ancho. Los leminiscos se extienden a través de primera mitad del tronco y terminan ligeramente anterior al final del receptáculo de la proboscis.

Comentarios taxonómicos: La familia Polymorphidae posee aproximadamente 127 especies, clasificadas en 12 géneros distribuidos a nivel mundial (García-Varela *et al.*, 2011). En estadio adulto se asocian con aves ictiófagas y mamíferos marinos como hospederos definitivos y crustáceos como hospederos intermediarios (Nickol *et al.*, 2002). Esta familia se diagnostica por poseer un tronco espinoso, proboscis bulbosa, receptáculo de la proboscis con doble pared y usualmente cuatro a ocho glándulas de cemento, y recientemente mediante estudios moleculares se ha observado que es uno de los grupos más derivados dentro de la clase Palaeacanthocephala (Amin, 1987; García-Varela *et al.*, 2013).

Nuestro material fue asignado a esta familia debido a la forma de la proboscis y a la doble pared que presenta el receptáculo de la misma, así como por la característica que el hospedero (*L. megapoda*) se encuentra habitando un sistema lacustre donde abundan las aves ictiófagas, y al presentarse en estadio de cistacanto este anuro estaría actuando como hospedero paraténico, tal como lo sugiere la

literatura (Nickol *et al.*, 2002), además de que ya se ha registrado esta familia en el Lago de Chapala (García-Prieto *et al.*, 2010).

No se pudo realizar la identificación a un nivel taxonómico menor, debido a que las características diagnósticas de los géneros y especies no se observaron con claridad en nuestro material.

Registros previos: *Polymorphus brevis* es el único miembro de la familia Polymorphidae que se ha registrado en alguna de las localidades del presente estudio. Se encontró en el Lago de Chapala, Jalisco en los siguientes hospederos: *Chapalichthys encaustrus*, *Ictalurus dugesii*, *Ictalurus* sp. *Poecilia sphenops* y *Poeciliopsis infans* (Peces), así como en *Thamnophis eques* y *Thamnophis melanogaster* (Reptiles) (García-Prieto *et al.*, 2010).

Desarrollo y transmisión: Los miembros de la familia Polymorphidae son parásitos intestinales de mamíferos marinos y aves piscívoras. Los huevos salen de las hembras con las heces de los hospederos y son ingeridos por crustáceos (anfípodos, copépodos o decápodos), quienes juegan el papel de hospederos intermediarios, en los cuales se lleva a cabo el desarrollo a cistacanto. Los hospederos definitivos se infectan al ingerir hospederos intermediarios infectados. Una vez ingeridos el cistacanto se desenquista y madura a acantocéfalo adulto. Como hospederos paraténicos puede incluir a peces, anuros y serpientes (Figura 12) (Nickol *et al.*, 2002).

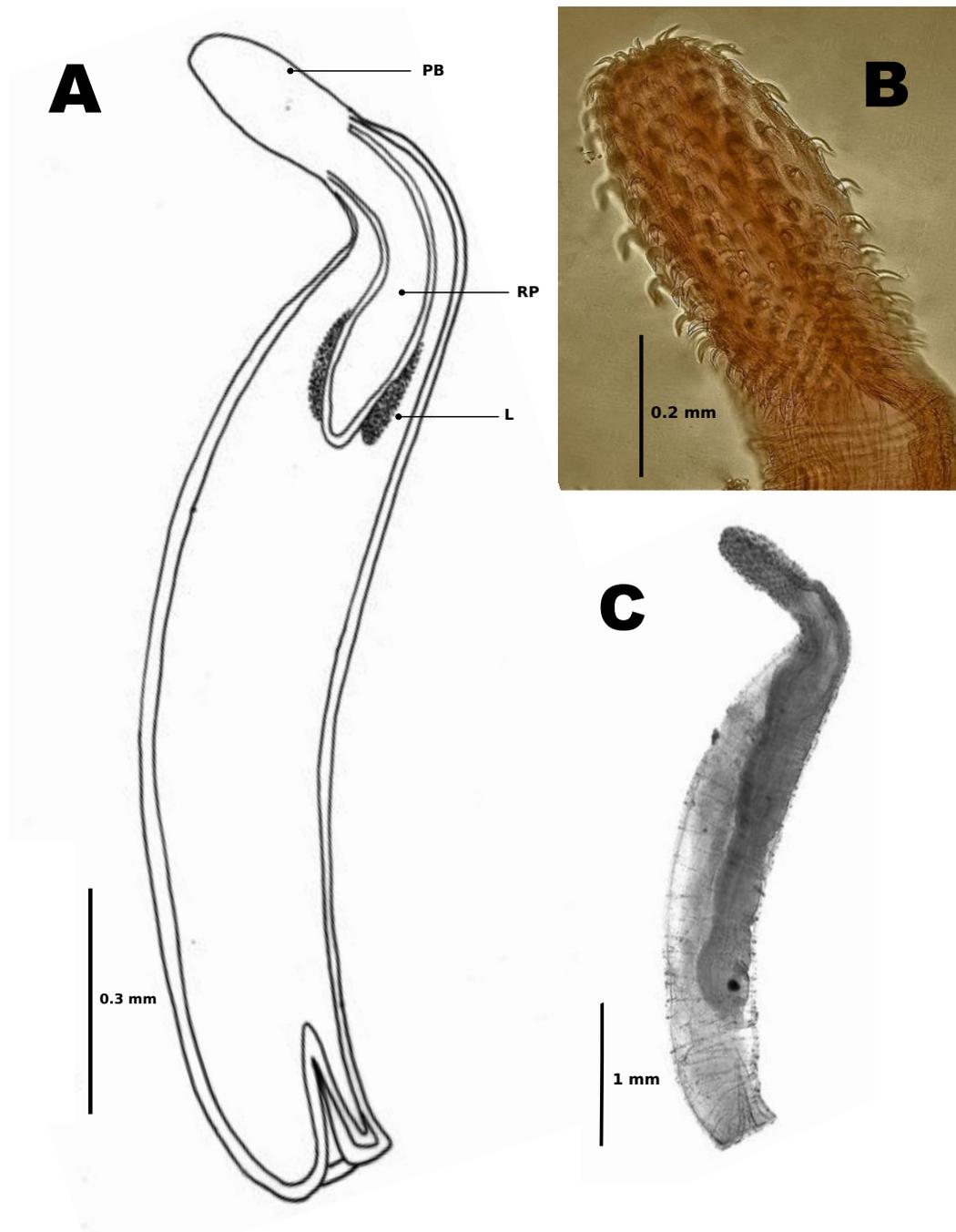


Figura 11. Polymorphidae gen. sp. A, microscopía óptica de contorno del cuerpo; B, micrografía de la proboscis; C, micrografía de todo el cuerpo. L= leminiscos, PB= proboscis, RB= receptáculo de la proboscis.

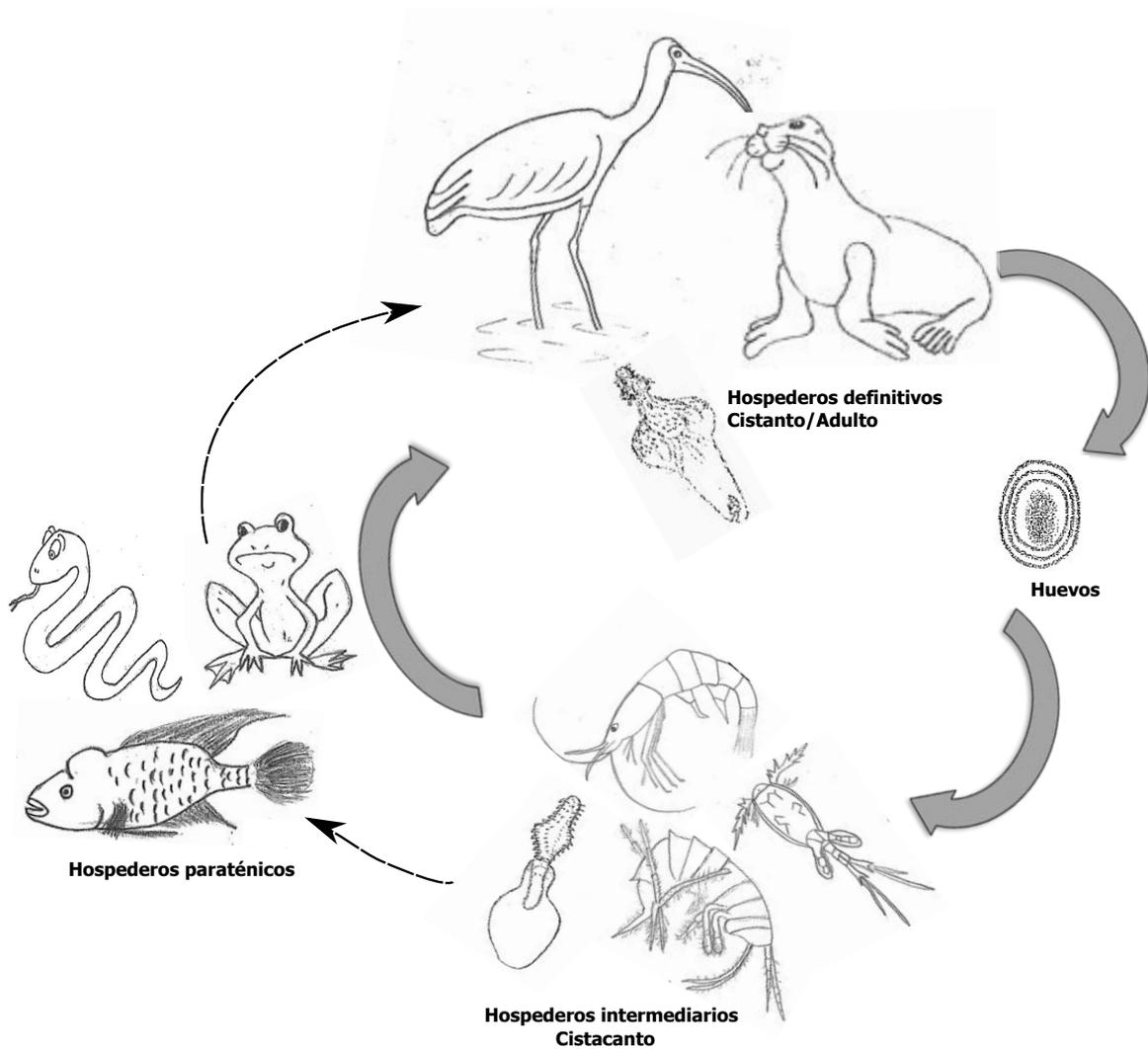


Figura 12. Desarrollo y transmisión de los miembros de la familia Polymorphidae. De acuerdo con Nickol *et al.*, (2002). Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.3 *Phylum: Nematoda Cobb 1932*

7.2.3.1 *Eustrongylides sp.*

Clase: **Dorylaimea** Hodda 2007

Subclase: **Trichocephalia** Hodda 2007

Superorden: **Trichocephalica** Hodda 2007

Orden: **Diectophymatida** Ryzhikov y Sonin 1981

Suborden: **Diectophymatina** Chitwood 1993

Superfamilia: **Diectophymatoidea** Railliet 1915 (Roman 1965)

Familia: **Diectophymatidae** Railliet 1915

Género: **Eustrongylides** Jagerskiold 1909

Eustrongylides sp.

Hábitat: Enquistado en diversos órganos internos y músculo también se encontró libre en intestino posterior.

Estadio: Larva cuarto estadio

Localidad: Lago de Atotonilco, Lago de Chapala (Tizapán y Ocotlán) y Lago de Cajititlán.

No. CNHE: 9163-9166

Descripción general: Nemátodos enquistados en la cavidad y en músculo esquelético. El primer tercio de la región anterior de la larva está teñida de blanco a rosa, mientras que el resto del cuerpo es de un rojo brillante. La extremidad cefálica es cónica (Figura 13). La boca abre en forma de hendidura, sin labios. Alrededor de la boca hay dos círculos de papilas cefálicas bien desarrolladas con seis papilas en cada círculo y cuatro papilas más pequeñas en cada lado entre el círculo interior y el exterior. Las papilas del círculo interior son delgadas con forma de espina, las del círculo exterior robustas con una base más amplia (Figura 13). Anfidios no distinguibles. La cutícula carece de ala, espinas e inflaciones, posee estrías transversales, especialmente marcadas en los extremos del cuerpo. Papilas somáticas extendiéndose en una sola hilera sobre los nervios laterales, más cercanamente espaciadas en la región rectal. Los primordios genitales de las larvas de hembras y machos están bien desarrollados (Figura 14). La longitud total de los machos y hembras no difirió significativamente.

Macho (basado en 10 individuos de las tres localidades: salvo excepciones señaladas valores dados en mm): Longitud del cuerpo 9.05 ± 1.23 (6.1-10.4) cm. Anchura a la mitad del cuerpo 0.74 ± 0.06 (0.66-0.83). Anchura a nivel del anillo nervioso 0.35 ± 0.05

(0.29-0.45). Longitud del esófago 15.43 ± 1.98 (11.56-18.01). Anillo nervioso al extremo anterior del cuerpo 0.26 ± 0.05 (0.17-0.33). Región posterior dividida desigualmente en recto y cloaca. El orificio cloacal es muscular y está dentro de la copa de la bursa. El margen de la bursa completo, sin incisiones. Longitud del inicio del recto hasta el extremo posterior del cuerpo, es decir recto más la cloaca y la bursa 0.97 ± 0.06 (0.87-1.06).

Hembra (Basado en cuatro individuos de todas las localidades: medidas salvo excepciones señaladas dadas en mm): Longitud total 12.62 ± 2.22 (10.4-15) cm. Anchura a la mitad del cuerpo 0.83 ± 0.18 (0.64-1.04). Anchura a nivel del anillo nervioso 0.39 ± 0.10 (0.29-0.53). Longitud del esófago 17.42 ± 1.70 (15.2-19.95). Anillo nervioso al extremo anterior del cuerpo 0.30 ± 0.05 (0.23-0.37). Vagina estrecha con paredes gruesas; recto más ancho con paredes delgadas. Longitud del recto 1.11 ± 0.35 (0.62-1.45).

Comentarios taxonómicos: Las especies del género *Eustrongylides* se caracterizan por poseer de 12 a 20 papilas cefálicas alrededor de la boca arregladas en dos o tres círculos, la vulva está cerca del ano y carece de espinas cuticulares (Panesar y Beaver, 1979). Dichas características fueron observadas en nuestros ejemplares, por lo que fueron asignados a este género.

La determinación a nivel específico no fue posible, debido a que las larvas de los machos no presentan los caracteres diagnósticos completamente desarrollados, como lo son la forma y proyecciones cuticulares de la ventosa de la bursa y el tamaño y forma de la espícula (Xiong *et al.*, 2009).

También se encontraron nemátodos libres en el intestino posterior de un tamaño mucho menor que el de los encontrados enquistados (No tomados en consideración para la caracterización morfológica).

Registros previos: Larvas de este género ya se ha registrado en *L. megapoda* en el Lago de Cuitzeo, Michoacán. También en los anuros *Lithobates dunnii* en el lago de Pátzcuaro, Michoacán (en Paredes-León *et al.*, 2008) y en *Lithobates pisonota* de Atenquique, Jalisco (Romero-Mayén, 2011). En el lago de Chapala, Jalisco se ha registrado en el pez *Ictalurus dugesii* (en Salgado-Maldonado, 2006).

Desarrollo y transmisión: Sus hospederos definitivos son aves piscívoras. La primer larva (L1) se desarrolla dentro de los huevos que salen del útero de las hembras grávidas. Posteriormente los huevos son ingeridos por oligoquetos acuáticos. En esos oligoquetos toma lugar el desarrollo al segundo y tercer estadio (L2-L3) en el cual adquiere su conspicuo color rojo brillante y su tamaño. Posteriormente, los peces ingieren a los oligoquetos, y se desarrolla el cuarto estadio larval (L4). Si los peces infectados son depredados por otros peces, anuros o serpientes. Estos últimos funcionarán como hospederos paraténicos o reservorios, hasta que sean depredados por el hospedero definitivo. Finalmente, cuando las aves consumen a los hospederos intermediarios o paraténicos, la larva penetra el ventrículo (estómago) y rápidamente adquiere su madurez sexual. Experimentalmente se ha observado que los oligoquetos son necesarios como hospederos intermediarios pero los peces como segundos hospederos intermediarios no, ya que se la logrado infectar a ranas y serpientes con oligoquetos infectados con L3. También existe la infección accidental en humanos (Figura 15) (Panesar y Beaver, 1979; Anderson, 2000; Xiong *et al.*, 2009).

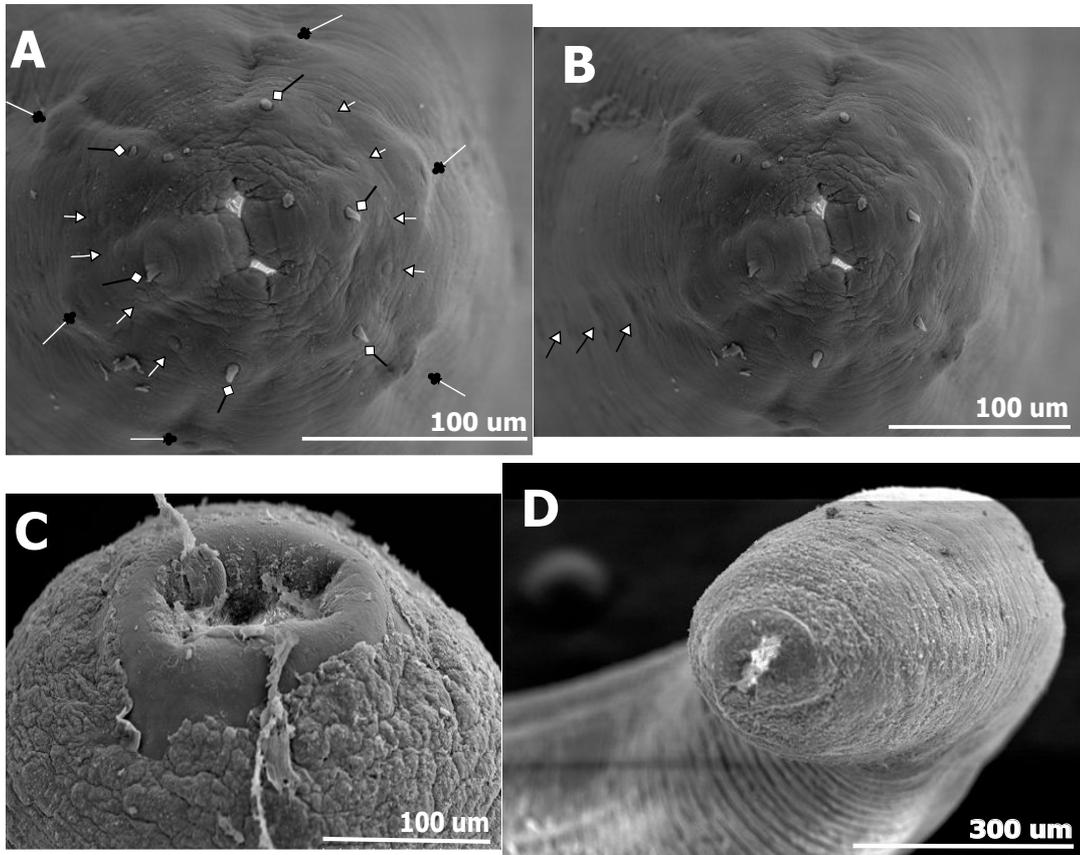


Figura 13. Microscopía electrónica de barrido de *Eustrongylides* sp. larva cuarto estadio. A, Vista apical de la región cefálica, los cuadros señalan las seis papilas que forman el primer círculo alrededor de la boca, las flechas las ocho papilas del segundo círculo y los tréboles las seis del tercer círculo; B, vista apical de la región cefálica, las flechas señalan la hilera de papilas somáticas que recorren el cuerpo; C, detalle del extremo posterior; D, vista general de la región posterior donde se observan las estrías transversales de la cutícula.

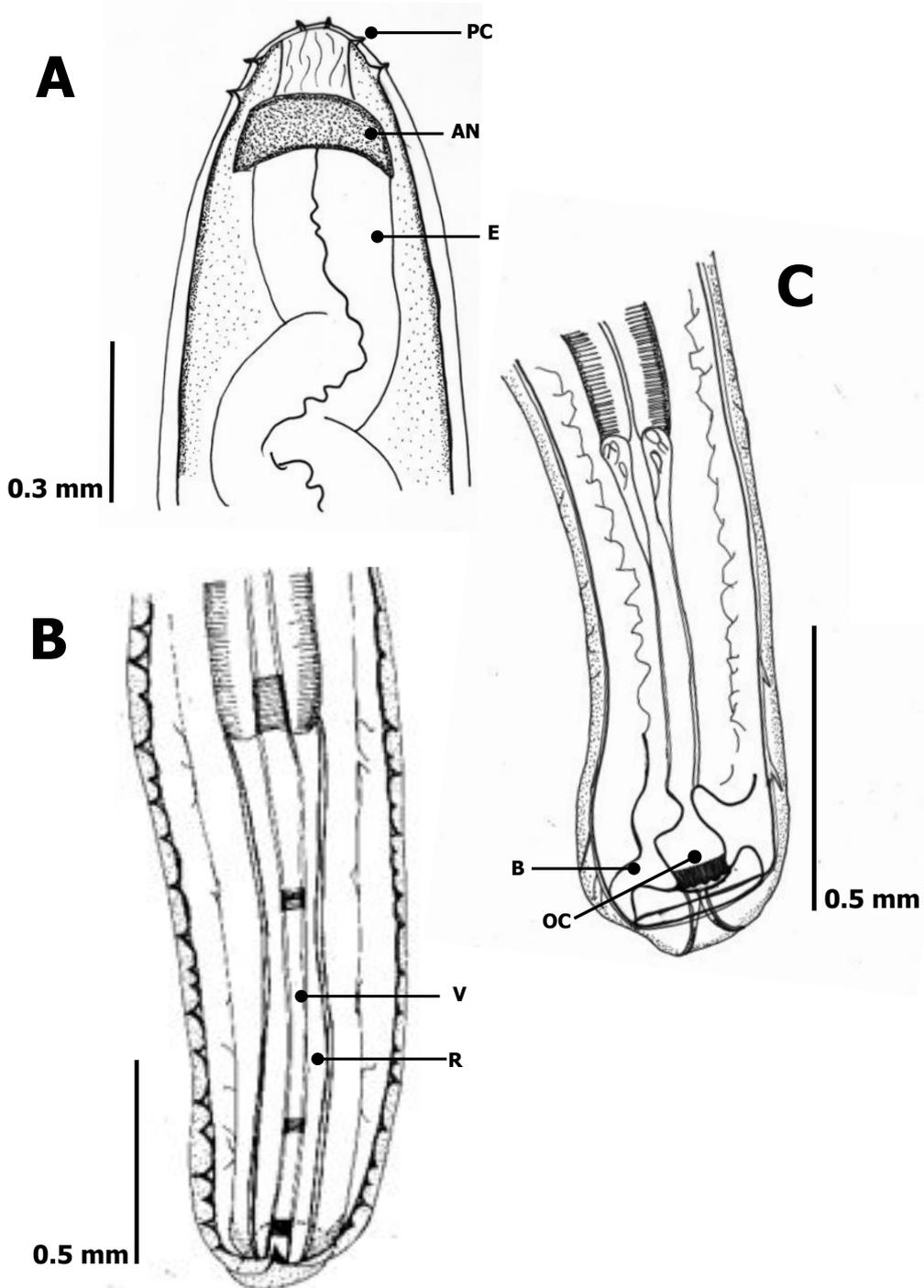


Figura 14. Microscopía óptica de *Eustrongylides* sp. larva cuarto estadio. A, vista lateral de la región anterior de una hembra; B, vista ventral de la región posterior de una hembra; C, vista lateral de la región posterior de un macho. AN= anillo nervioso, B= bursa, E= esófago, OC= orificio cloacal, PC, papilas cefálicas, R= recto, V= vulva.

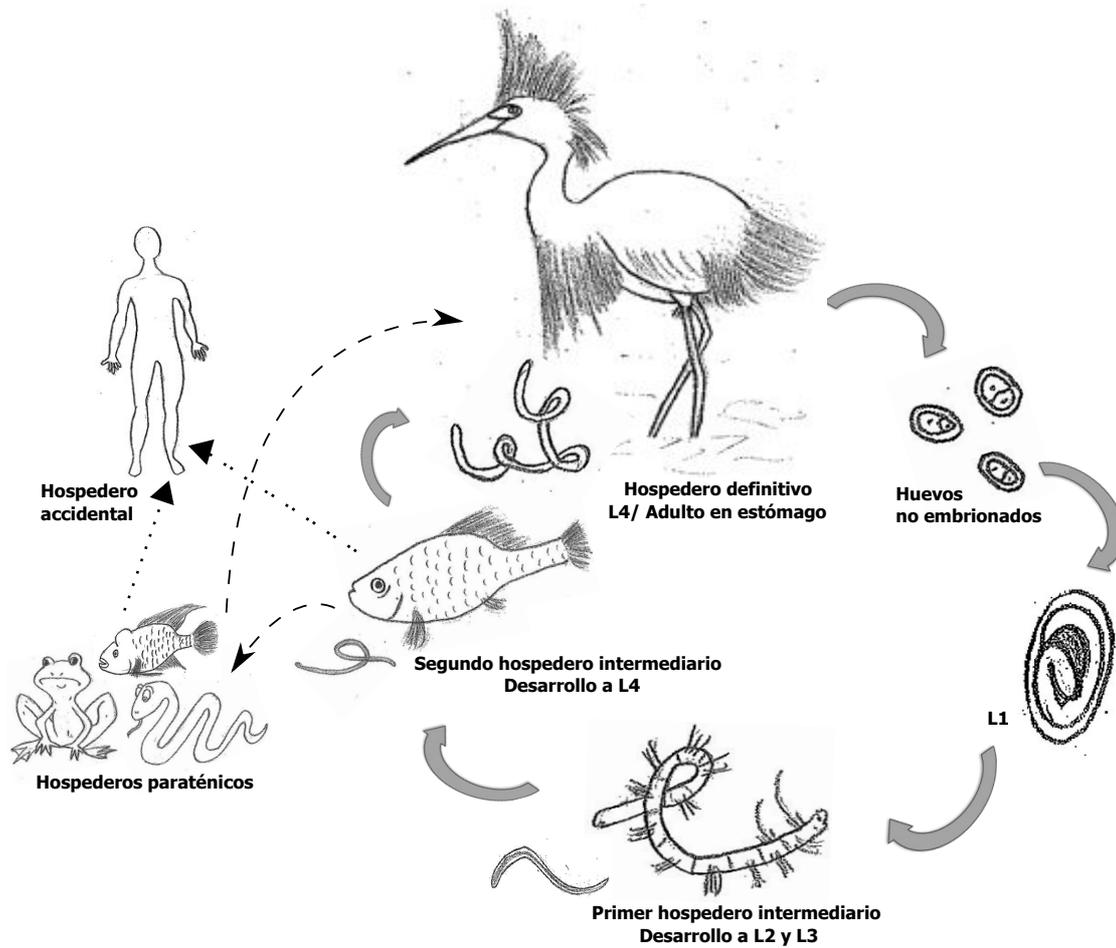


Figura 15. Desarrollo y transmisión de *Eustrongylides* spp. de acuerdo con Anderson (2000) y Xiong *et al.*, (2009). Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.3.2 *Rhabdias n. sp.*

Clase: **Chromadorea** Inglis 1983

Subclase: **Plectia** Hodda 2007

Superorden: **Rhabditica** Hodda 2007

Orden: **Panagrolaimida** Hodda 2007

Suborden: **Panagrolaimina** Hodda 2007

Superfamilia: **Strongyloidoidea** Chitwood y MacIntosh 1934

Familia: **Rhabdiasidae** Railliet 1916

Género: **Rhabdias** Stiles y Hassall 1905

Rhabdias n. sp.

Hábitat: Pulmones

Estadio: Adulto

Localidad: Lago de Atotonilco y Lago de Chapala (Ocotlán)

Descripción general: Nemátodos pequeños. Extremo anterior truncado, extremo posterior cónico. Cuerpo cubierto completamente por cutícula, a excepción de la placa cefálica y el extremo de la cola, ensanchada hacia la región posterior del cuerpo. Abertura oral angosta rodeada por cuatro labios poco desarrollados (dos subdorsales y dos subventrales) y dos pseudolabios laterales. Cada labio posee una papila sencilla pequeña. Útero lleno con numerosos huevos, ovalados, larvados, cubiertos por una cutícula delgada (Figura 18).

Diagnosis (basada en 10 individuos grávidos: uno del lago de Atotonilco y nueve del lago de Chapala en Ocotlán, valores dados en mm, salvo excepciones señaladas): Longitud del cuerpo 3.52 ± 1.07 (1.69–4.8), anchura máxima de 0.29 ± 0.02 (0.25–0.34). Esófago con forma de cachiporra de 0.45 ± 0.02 (0.42–0.52) de largo por 39.68 ± 9.85 (30–50) μm de ancho en la región anterior, 40.31 ± 2.47 (37.5–42.5) μm en la región muscular y 37.5 ± 8.75 (27.5–50) μm en la región glandular. Bulbo esofágico de 67.77 ± 4.91 (62.5–75) μm de ancho. Anillo nervioso a 0.17 ± 0.01 (0.15–0.19) del extremo anterior. Vulva post-ecuatorial a 2.28 ± 0.73 (1.1–3.17) del extremo anterior del cuerpo, 64.51 ± 3.87 (56.08–69.93) % de la longitud total del cuerpo. Labios vaginales indistinguibles. Cola cónica 0.16 ± 0.02 (0.12–0.21) del ano al extremo posterior, con el final puntiagudo. Útero lleno con numerosos huevos, ovalados, larvados, cubiertos por una cutícula delgada. Tamaño de huevos 85 ± 3 –53 (80–90) μm de largo por 49 ± 4.44 (40–55) μm de ancho (n=20) (Figura 19).

Comentarios taxonómicos: Nuestro material no pudo ser asignado a alguna especie puesto que sus caracteres no corresponden con ninguna registrada previamente en México. La especie más parecida es *Rhabdias ranae*, con la cual comparte los siguientes caracteres: seis labios (cuatro submediales y dos laterales), vulva postecuatorial, distribución neártica y parásita de ránidos (Martínez-Salazar, 2008). Sin embargo, de acuerdo con la redescrición de Kuzmin *et al.* (2003), nuestro material es mucho más pequeño que *R. ranae* 3.52 (1.69–4.8) mm vs 6.61 (4.99-8.24) mm respectivamente, carácter sumamente importante en la taxonomía de este género (Martínez-Salazar, 2008).

Cabe señalar que por un largo periodo, la mayoría de los ejemplares de *Rhabdias* spp. encontrados en anfibios Norteamericanos (excepto sapos) eran identificadas como *R. ranae*. Sin embargo, muchos de dichos registros han sido confusiones con otras especies como *R. joaquinensis* y las recientemente descritas *R. ambystomae* y *R. bakeri* determinados tanto morfológica como molecularmente (Kuzmin *et al.*, 2003; Tkach *et al.*, 2006; Dare *et al.*, 2008) y según los datos de distribución de *R. ranae*, esta especie es más común en ranas del norte de Estados Unidos y Canadá que en el Sur de Estados Unidos (Kuzmin *et al.*, 2003).

Por otro lado, en México varios de los registros de *R. ranae* ya han sido refutados por Martínez-Salazar (2008). Los que continúan siendo válidos, según Martínez-Salazar (2008) (Tabla 17), no corresponden con nuestro material, de acuerdo con los análisis de *Neighbor joining* que realizamos con un fragmento de COI de la mitocondria (fragmento de primers JB3 y JB 4.5) (metodología en Apéndice III) (Figura 16). En este análisis nuestra especie se separa del resto de los ejemplares de *Rhabdias* cf. *ranae* y con una distancia genética mayor al 2% con respecto a las demás especies, lo cual según la evidencia encontrada por Avise (2000; ver Hebert *et al.*, 2003) y Velarde-Aguilar (2011), sugiere que se trata de especies distintas. Desafortunadamente Martínez-Salazar (2008) no proporciona datos morfométricos de los ejemplares de *Rhabdias* cf. *ranae* analizados en su trabajo, por lo que no fue posible comparar nuestro material desde este punto de vista.

Por otro lado, cuando se comparó la secuencia ITS1-ITS2/5.8S de nuestro material con *R. ranae*, *R. bakeri* y *R. joaquinensis* provenientes de Estados Unidos, siendo estas dos últimas muy parecidas a *R. ranae*. Queda claro que *Rhabdias* n. sp. de

L. megapoda que caracterizamos ahora son independientes de todas estas especies (metodología en Apéndice III).

En conclusión, dado que los ejemplares recolectados son genéticamente distintos a las especies con las que presenta parecido morfológico de México y Estados Unidos y considerando que es la primera vez que se registra *Rhabdias* spp. en este hospedero y localidad, podemos sugerir que es una especie nueva.

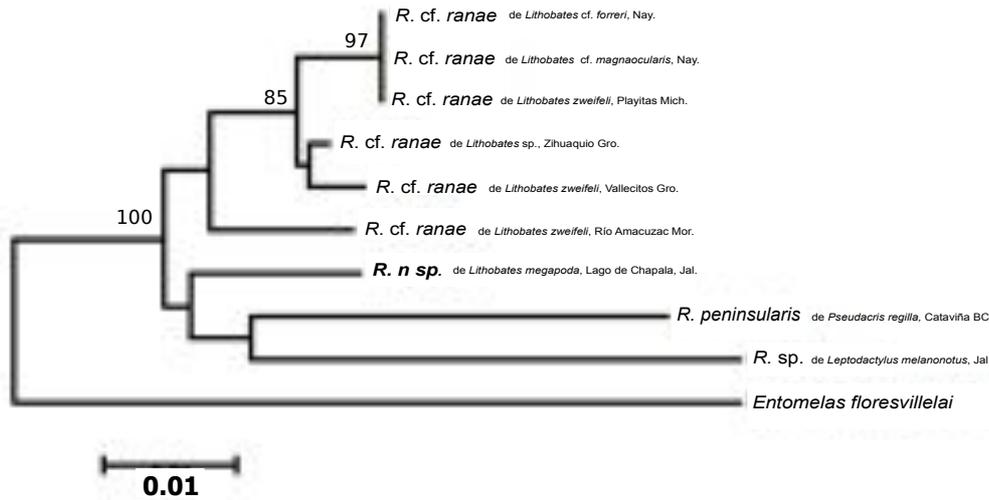


Figura 16. Filograma de Neighbor joining de secuencias parciales de COI de *Rhabdias* spp. obtenidas de Martínez-Salazar, 2008 y del presente estudio. En los nodos se muestran valores de bootstrap >70%.

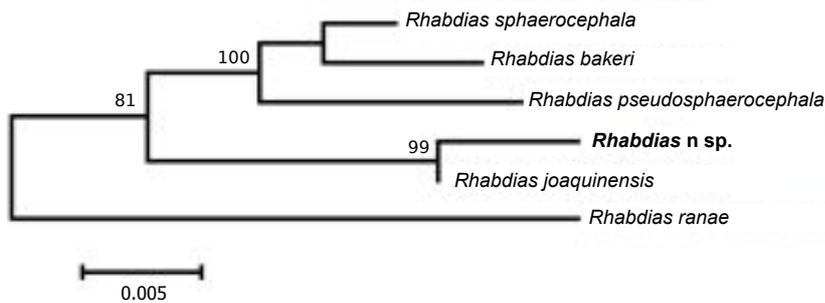


Figura 17. Filograma de Neighbor joining de secuencias parciales de ITS/5.8S ADNr. Las secuencias incluyen *Rhabdias sphaerocephala* (DQ845739), *Rhabdias bakeri* (JX826433), *Rhabdias pseudosphaerocephala* (DQ845734), *Rhabdias n. sp.* (presente estudio), *Rhabdias joaquinensis* (JX826443) y *Rhabdias ranae* (DQ264769). En los nodos se muestran valores de bootstrap >70%.

Desarrollo y transmisión: *Rhabdias ranae* es un nemátodo que incorpora una fase de vida libre, así como una fase parasitaria, ambas ejemplificadas por adultos separados. La fase parasitaria es hermafrodita protándrica; se inicia como un macho y más tarde se transforma en una hembra. Usa el esperma almacenado de su existencia sexual inicial para fertilizar los óvulos de su forma sexual posterior. Las cápsulas de huevos producidos por fertilización son liberados por la ahora-hembra en los pulmones, pasan por la tráquea y entran al intestino, donde eclosionan y se transforman en larvas rabbitiformes. La defecación libera a las larvas al exterior donde sufren cuatro mudas, convirtiéndose en machos y hembras adultos de vida libre. Después de la cópula, las hembras de vida libre producen cápsulas de huevos (óvulos fertilizados), algunos de los cuales nacen dentro de las hembras y consumen los tejidos de la madre. Estas larvas emergen como filariformes y penetran en la piel de los hospederos adecuados. Las larvas se abren camino a los pulmones, donde se convierten en los adultos hermafroditas protándricos (primero se desarrollan los machos y después las hembras). Este ciclo de vida demuestra la relación y la posible evolución de los nemátodos parásitos a partir de los de vida libre sugiriendo que pudo haber etapas de transición entre vida libre y existencias parasitarias (Figura 20) (Gendron *et al.*, 2003).

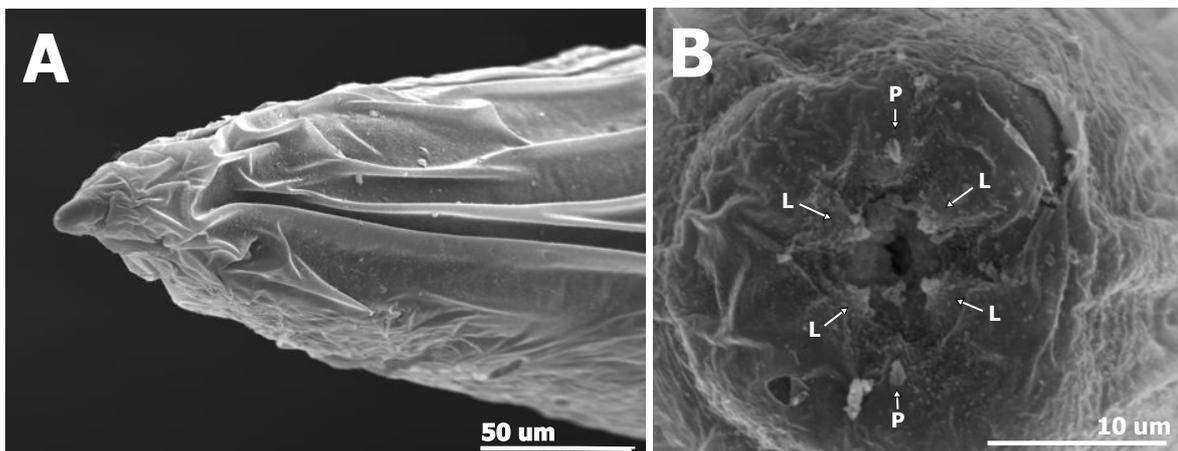


Figura 18. Microscopía Electrónica de Barrido de *Rhabdias* n. sp. A, vista general de la región posterior; B, vista apical de la región cefálica. L= labios, P= pseudolabios.

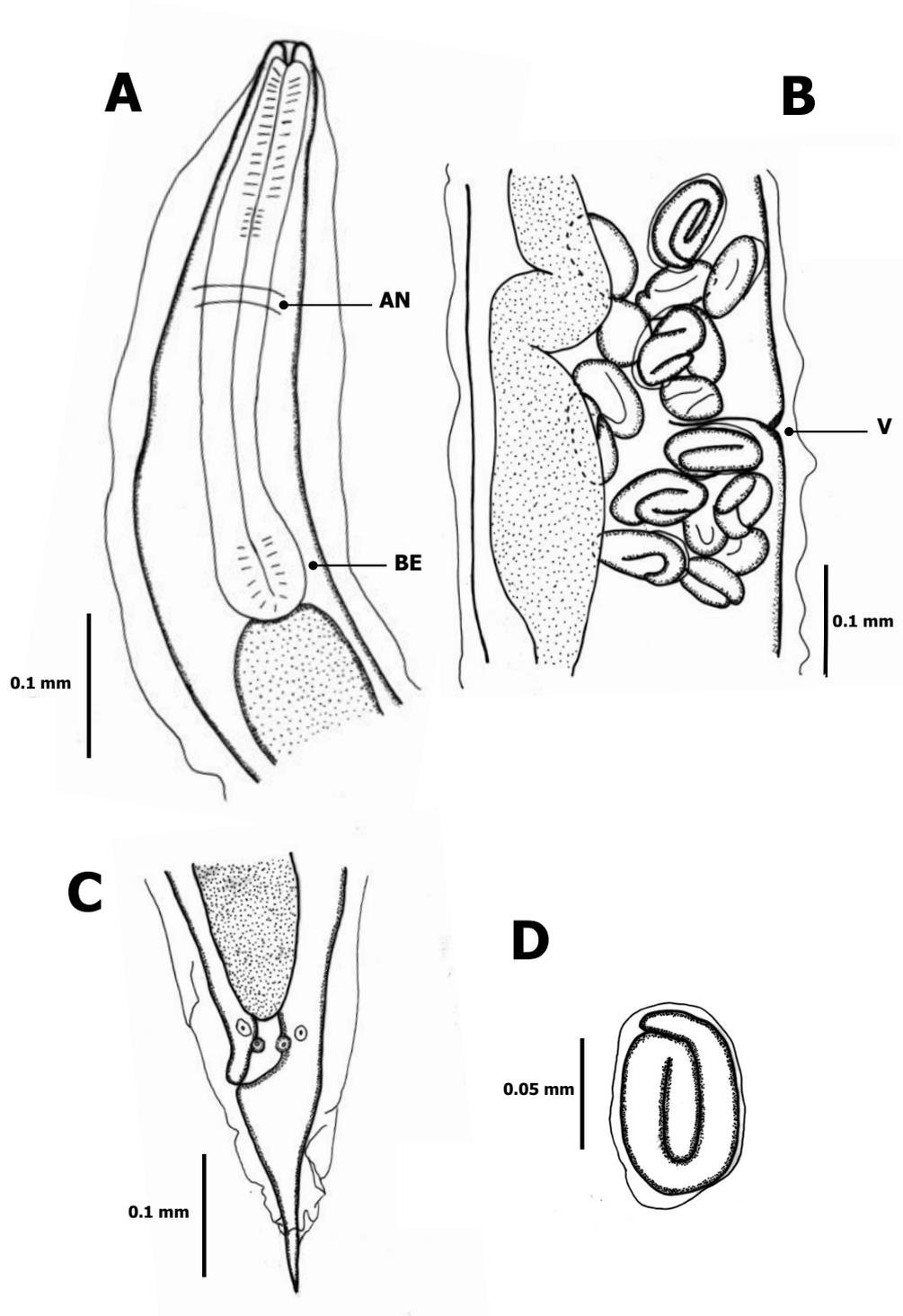


Figura 19. Microscopía óptica de *Rhabdias n. sp.* A, vista lateral de la región anterior de una hembra; B, vista lateral de la zona vulvar; C, vista lateral de la región posterior; D, Huevo larvado. AN= anillo nervioso, BE= bulbo esofágico, V= vulva.

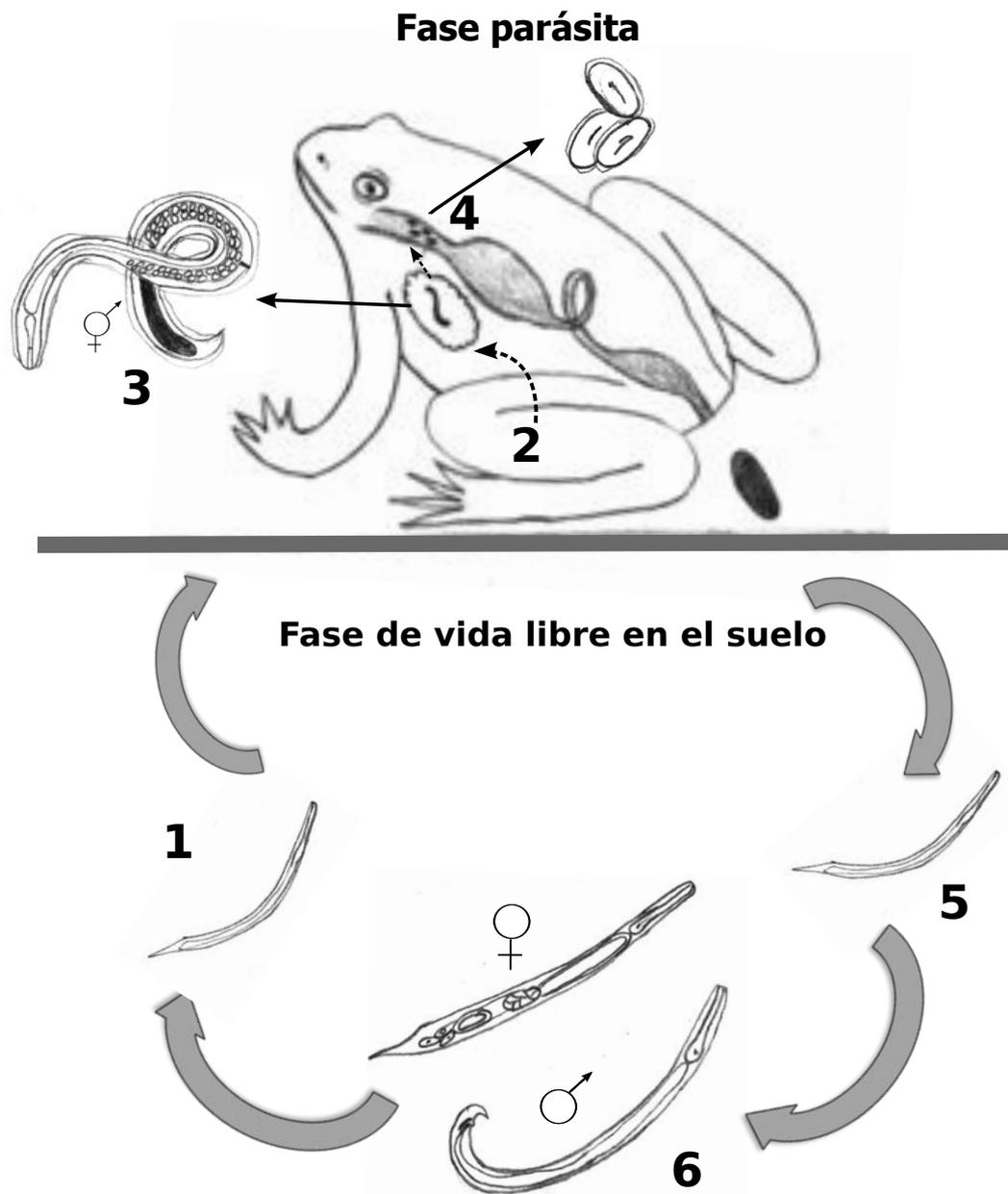


Figura 20. Desarrollo y transmisión de *Rhabdias ranae*. (1) La larva infectiva penetra la piel del hospedero (2) migra hacia los pulmones (3) se convierte en hermafrodita protándrico (4) produce huevos que viajan a la traquea (5) mudan a larva y salen con las heces (6) en el suelo se desarrollan a hembra y macho, se aparean, las larvas ovovivíparas escapan de las hembras y son infectivas (Gendron *et al.*, 2003). Ver más detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.3.3 *Contracaecum* sp.

Orden: **Spirurida** Railliet 1914

Suborden: **Ascaridina** Inglis 1983

Superfamilia: **Ascaridoidea** Baird 1853 (Skryabin 1915)

Familia: **Anisakidae** Railliet y Henry 1912 (Skryabin y Karokhin 1945)

Género: ***Contracaecum*** Railliet y Henry 1912

***Contracaecum* sp.**

Hábitat: Enquistado en diversos órganos internos y libre en intestino posterior.

Estadio: Larva tercer estadio

Localidad: Lago de Atotonilco y Lago de Chapala (Tizapán y Ocotlán)

No. CNHE: 9167-9169

Descripción general: Nemátodos de color blanquecino, con la cutícula transversalmente estriada a lo largo de todo el cuerpo, más marcada hacia los extremos del cuerpo. El extremo anterior es redondeado y se observa un pequeño diente larval característico de la familia Anisakidae. La boca es terminal, rodeada por tres labios poco desarrollados. El anillo nervioso está situado en la parte anterior del esófago y el poro excretor en la base del diente larval. El ciego intestinal es largo, aunque ligeramente más pequeño que el esófago, y se encuentra direccionado hacia la región anterior. El ventrículo es pequeño y redondo, con un apéndice ventricular corto, en el extremo posterior se encuentra una cola cónica, con dos glándulas anexas, no muy alargada y con punta mucronada (Figuras 21 y 22).

Diagnosis (basada en 10 individuos: cinco del lago de Atotonilco y cinco de Chapala [cuatro de Ocotlán, una de Tizapán]; valores dados en mm, salvo excepciones señaladas): Las larvas se encontraban dentro de la vaina cuticular de la segunda muda; su cuerpo sin la cutícula vieja fue de 21.80 ± 4.00 (16.64–27.66) de largo con un ancho máximo de 0.69 ± 0.09 (0.58–0.83). Entre los labios ventro-laterales esta situado un diente cefálico de 9.11 ± 0.91 μm (8.68–10.85) de largo. El anillo nervioso está localizado a 0.29 ± 0.02 (0.24–0.33) del extremo anterior. El esófago tiene 2.18 ± 0.31 (1.84–2.72) de largo por 0.08 ± 0.02 (0.05–0.15) de ancho. El ventrículo tiene 0.13 ± 0.02 (0.09–0.15) de largo por 0.10 ± 0.02 (0.08–0.14) de ancho y separado del esófago por una ligera constricción. El apéndice ventricular esta direccionado posteriormente, 0.41 ± 0.07 (0.33–0.53) de largo por 0.08 ± 0.01 (0.66–0.09) de ancho. El ciego intestinal es 1.65 ± 0.28 (1.26–1.95) de largo por 0.17 ± 0.02 (0.12–0.22) ancho.

El final del ciego intestinal hasta la extremidad posterior es de 19.41 ± 3.83 (13.93–24.85). La relación de la longitud del ciego intestinal y el apéndice ventricular es de 3.97 ± 0.55 (3.25–4.87) y de la longitud del ciego y largo del esófago de 0.75 ± 0.05 (0.68–0.88). La cola es cónica con 0.12 ± 0.01 (0.10–0.16) del ano al extremo posterior.

Comentarios taxonómicos: El género *Contracaecum* fue establecido por Railliet y Henry en 1912 y la especie tipo es *Contracaecum microcephalum* Rudolphi, 1809. Los caracteres diagnósticos del género son: ventrículo con apéndice posterior, ciego intestinal presente, poro excretor en el margen distal de la región cefálica, presencia de un collar cuticular plegado en el margen distal de la región cefálica, y son parásitos de reptiles, aves y mamíferos acuáticos (Gibbons, 2010).

De acuerdo con las características que presenta nuestro material se incluyó en el género *Contracaecum*, ya que coincide con los principales rasgos taxonómicos, como lo son: la presencia del poro excretor a la altura de los labios ventrales y su tubo digestivo característico (ventrículo, apéndice ventricular y ciego intestinal proyectado anteriormente). La larva de *Contracaecum* no pudo ser identificada a nivel específico debido a que los órganos reproductivos no estaban completamente desarrollados, los cuales son utilizados para dicha caracterización.

Es importante señalar que se encontraron nemátodos libres en el intestino posterior, los cuales presentan un tamaño mucho más pequeño que los enquistados y fueron asignados a este género debido a la presencia del diente cefálico (no se tomaron en consideración para la caracterización).

Registros previos: La larva 3 de este nemátodo ya ha sido registrada con anterioridad en *L. megapoda*, en la localidad del Lago de Cuitzeo, Michoacán. Además de dicho hospedero los registros que existen en anuros son los siguientes: *Lithobates* cf. *forreri* en San Pedro de las Playas (Laguna de Tres Palos), Guerrero. *Rhinella marina* en Presa Cerro de Oro, Oaxaca y en *Lithobates vaillanti* en Laguna Escondida, Veracruz (en Paredes-Calderón *et al.*, 2008). También se tienen registros en el lago de Chapala, Jalisco, pero en dos especies de culebras acuáticas (*Thamnophis eques* y *Thamnophis melanogaster* (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2002)) y de los peces *Ictalurus dugesii*, *Chapalichthys encaustrus* y *Poecilia sphenops* (en Salgado-Maldonado, 2006).

Desarrollo y transmisión de *Contracaecum rudolphii*: Dilucidado experimentalmente por Moravec (2009): Los hospederos definitivos de los miembros del género *Contracaecum* son aves y mamíferos piscívoros asociados con agua dulce y salada. Los parásitos viven en el estómago y se alimentan de la ingesta del hospedero. Los huevos sin embrión son depositados por la hembra en el estómago, y salen al exterior a través de las heces del hospedero. En el agua, los huevos embrionados se desarrollan al primer estadio larvario (L1). Posteriormente se lleva a cabo el desarrollo del segundo estadio larvario (L2), el cual tiene un diente cuticular en la región oral, y por último a un tercer estadio larvario (L3), en el que conserva la cutícula del segundo estadio. Esta larva no nada y en condiciones de laboratorio se observó que mantienen su cola adherida a la parte inferior del recipiente que las contiene y enderesan su cuerpo intensamente, presumiblemente estimulando la depredación por copépodos. Esta larva puede infectar diversos hospederos invertebrados, particularmente copépodos, en el intestino de estos, penetran a través de la pared del tracto intestinal y migran hacia el hemocele donde pierden la muda del segundo estadio y se mueven libremente, dicha penetración se lleva a cabo con la ayuda del diente cefálico. Los peces también pueden quedar infectados al consumir directamente a la L3, por lo que se considera que los copépodos y los peces son hospederos paraténicos. Se observó que si los peces o aves consumen copépodos infectados con L3 también pueden adquirir la infección. Cuando la larva llega al intestino del hospedero vertebrado paraténico permanece ahí por un tiempo antes de penetrar a través de la pared intestinal y entrar a la cavidad del cuerpo, donde se establece en la superficie del intestino, hígado y mesenterios.

Algunas investigaciones en otras especies de *Contracaecum* indican que larvas L3 pueden pasarse de un hospedero paraténico pez a otro pez, anuro o reptil mediante depredación, y también existe la infección accidental en humanos (Figura 23) (Anderson, 2000).

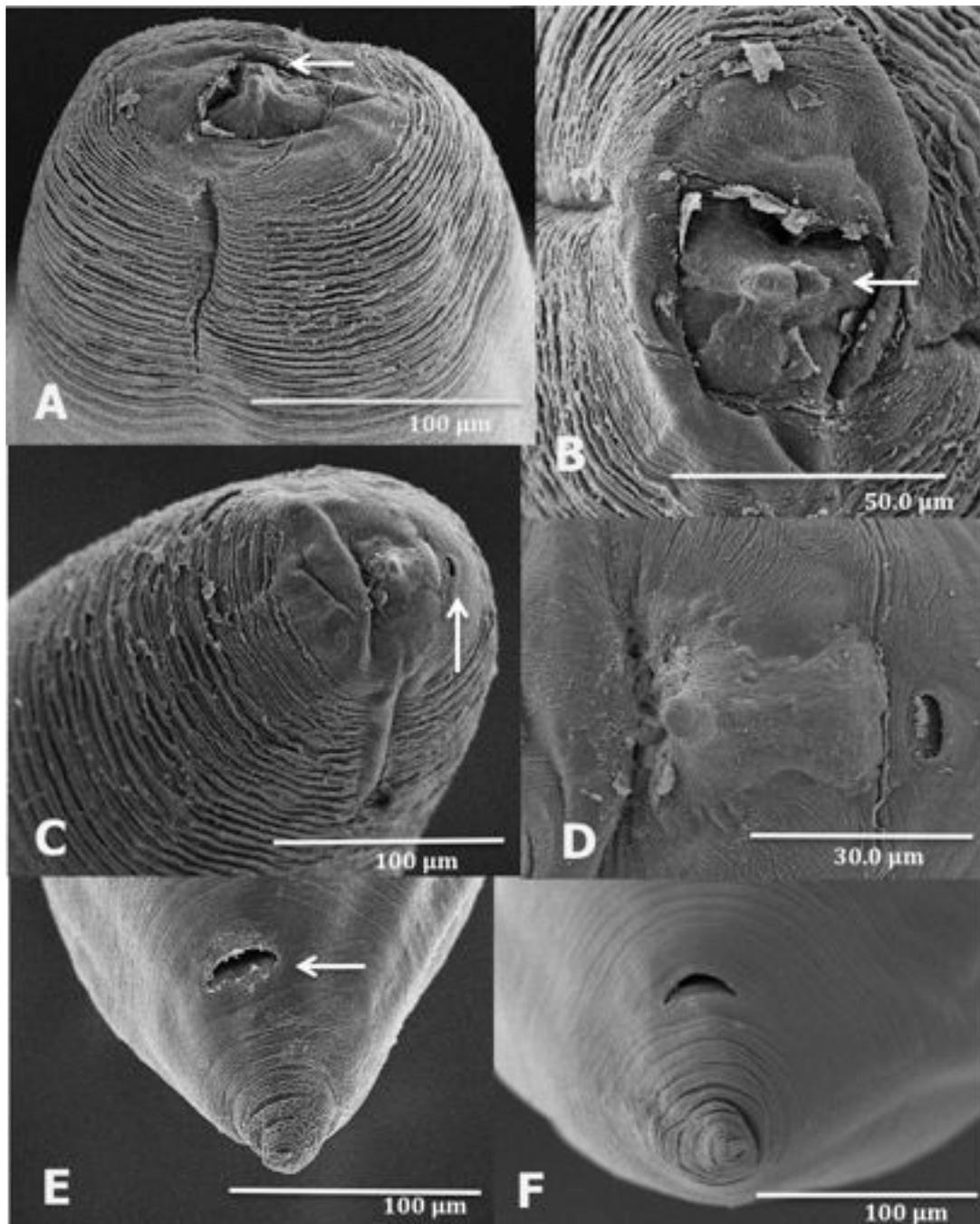


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido de *Contracaecum* sp., larva tercer estadio. A, vista lateral de la región cefálica, la flecha indica el diente cefálico y puede observarse el anillo cuticular de la región cefálica; B, vista apical de la región cefálica, la flecha indica el diente cefálico; C, vista lateral de la región cefálica, la flecha indica el poro excretor; D, Detalle del poro excretor; E-F, Vista ventral de la región posterior, la flecha indica el ano.

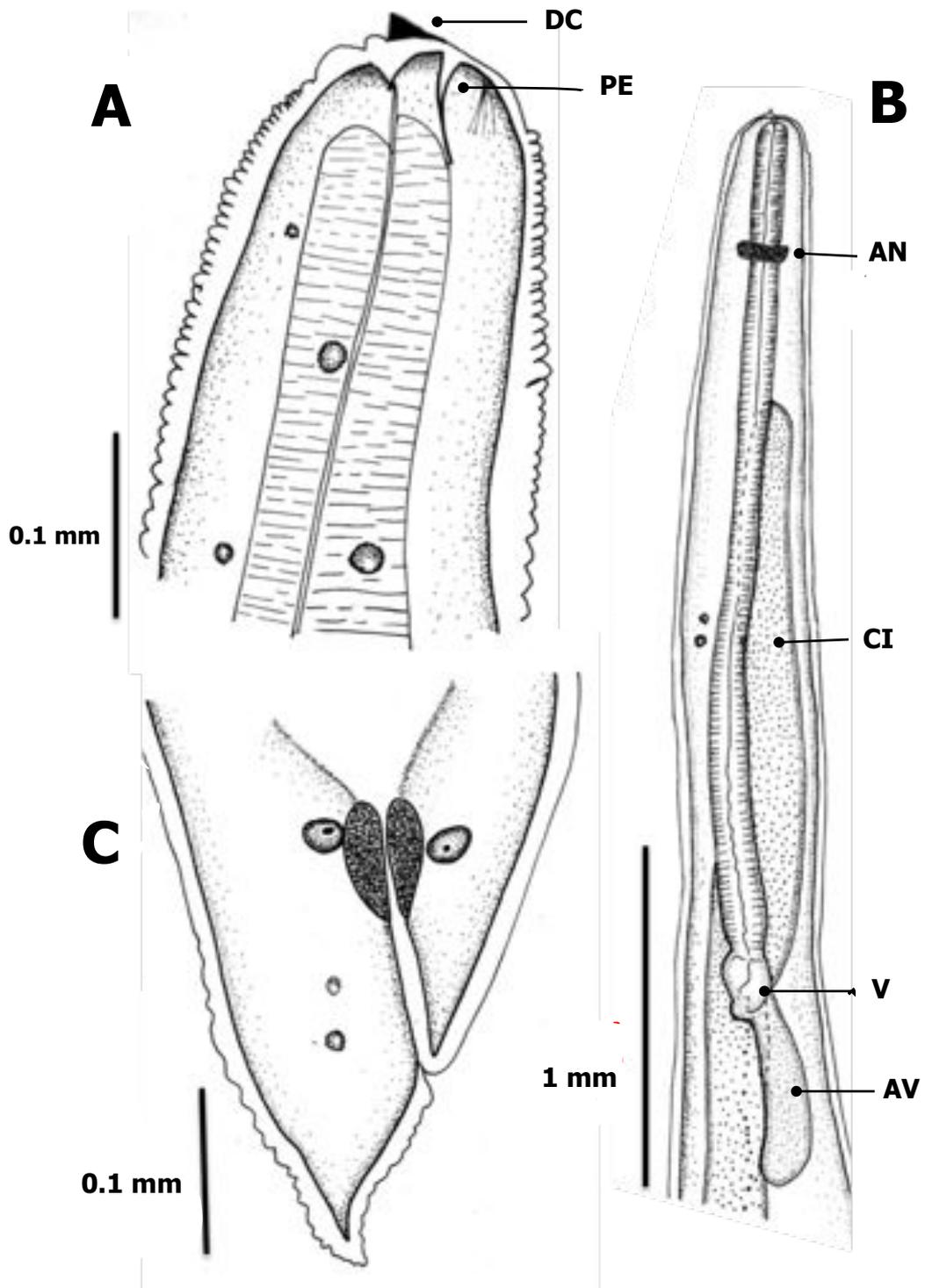


Figura 22. Microscopia óptica de *Contracaecum* sp., larva tercer estadio. A , vista lateral de la región cefálica; B, región anterior; C, región posterior. AN= anillo nervioso, AV= apéndice ventricular, CI= ciego intestinal, DC= diente cefálico, PE= poro excretor, V= ventrículo.

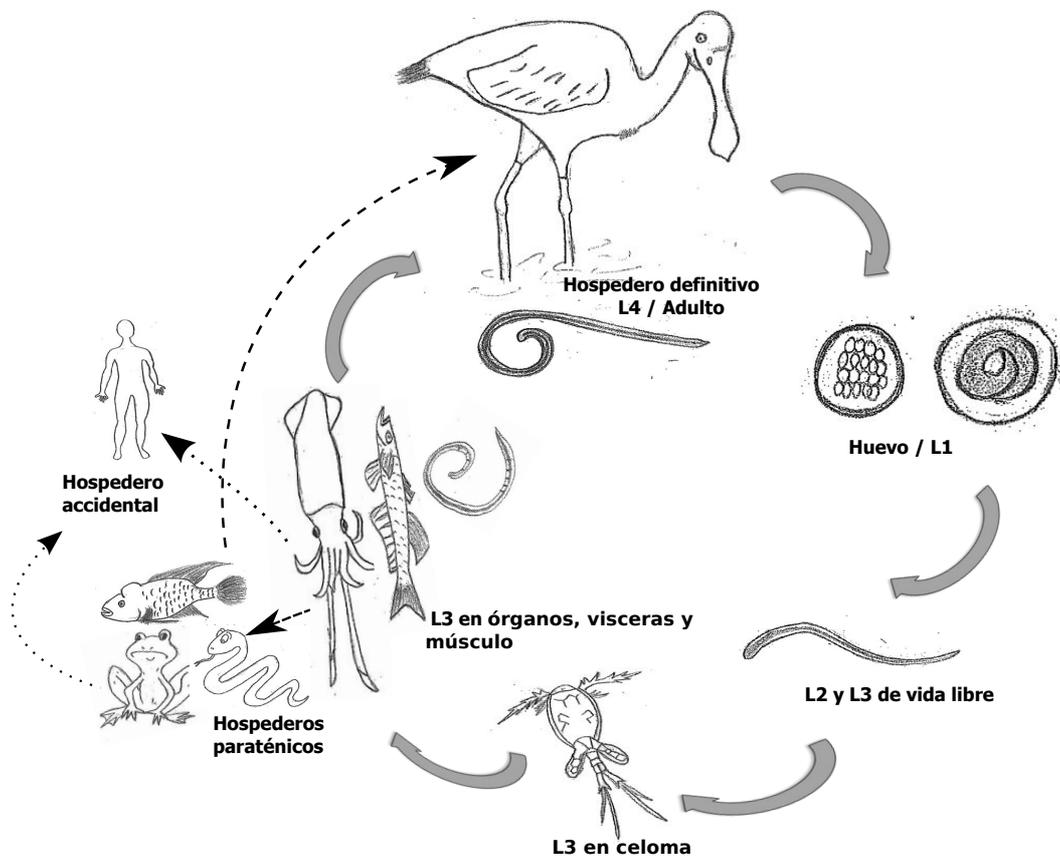


Figura 23. Desarrollo y transmisión de *Contracaecum* spp. de acuerdo con Anderson (2000). Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.2.3.4 *Foleyellides striatus*

Orden: **Spirurida** Railliet 1914

Suborden: **Spirurina** Railliet y Henry 1915

Superfamilia: **Filarioidea** Weinland 1858 (Chabaud y Anderson 1959)

Familia: **Onchocercidae** Lieper 1911 (Chabaud y Anderson 1959)

Género: **Foleyellides** Caballero 1935

Foleyellides striatus (Ochoterena y Caballero 1932) Caballero 1935

Hábitat: Cavidad y mesenterio

Estadio: Adulto

Localidad: Lago de Atotonilco, Lago de Cajititlán y Lago de Chapala (Tizapán y Ocotlán)

No. CNHE: 9081, 9082 y 9162

Descripción general: Gusanos blancos, cuerpo atenuado en ambos extremos, hembras más grandes que los machos. Cabeza redonda sin sobresalir del cuerpo. La placa cefálica con un eje largo orientado lateralmente midiendo aproximadamente el doble lateralmente que dorso-ventralmente, ligeramente saliente en los márgenes laterales. Boca pequeña, dorso-ventralmente ovalada, rodeada por un pequeño anillo cuticular con dos pequeñas estructuras paraestomatales en los márgenes laterales. Cuatro papilas conspicuas en el círculo exterior, dos en cada lóbulo lateral de la cabeza. El círculo interior con cuatro papilas redondas y dos anfidios inconspicuos. Cutícula lisa o finamente estriada transversalmente. Ala lateral presente en ambos sexos y se extiende desde debajo de las papilas cefálicas exteriores hasta cerca de la punta de la cola. Esófago dividido en una porción anterior pequeña muscular y una región posterior larga glandular. Intestino ampliamente dilatado en su unión con el esófago, ano evidente y cola con extremo romo redondeado en ambos sexos.

Macho (basado en 15 individuos de las tres localidades: salvo excepciones señaladas valores dados en mm): Longitud del cuerpo 15.59 ± 2.66 (9.95–20.05), anchura máxima 0.28 ± 0.05 (0.18–0.39). Anchura del cuerpo a nivel el anillo nervioso 0.13 ± 0.01 (0.10–0.15), en la unión de la región glandular y muscular del esófago 0.14 ± 0.01 (0.11–0.16). Longitud total del esófago 1.49 ± 0.18 (1.05–1.82); región muscular 0.27 ± 0.04 (0.2–0.35) de largo por 38.39 ± 5.51 (30–50) μm de ancho; región glandular 1.21 ± 0.16 (0.85–1.55) de largo por 95 ± 23.28 (75–170) μm de ancho. Anillo nervioso a la región anterior 0.23 ± 0.05 (0.15–0.38). Longitud de la cloaca al extremo

posterior 76.33 ± 11.45 (62.5–105) μm . Papilas caudales grandes, sésiles y mamiliformes; un par preanal, tres pares postanales. Posee una placa ventral cuticularizada ubicada inmediatamente anterior a las papilas precloacales. Espícula derecha 236.96 ± 22.89 (200–275) μm de largo por 17.85 ± 4.78 (12.5–25) μm de ancho en la base; espícula izquierda 429.77 ± 32.94 (375–472.5) μm de largo por 13.86 ± 2.58 (10–17.5) μm de ancho en la base. Ala lateral que abarca todo el cuerpo, volviéndose más ancha en la región de la cola (Figuras 24 y 26).

Hembra: (basado en 15 especímenes grávidos de las tres localidades: salvo excepciones señaladas valores dados en mm): Longitud del cuerpo 4.64 ± 0.95 (2.5–5.9) cm, anchura máxima 0.56 ± 0.11 (0.31–0.71). Anchura a nivel del anillo nervioso 0.16 ± 0.02 (0.13–0.19), en la unión de la región muscular y glandular esofágica 0.18 ± 0.02 (0.15–0.22), en la vulva 0.35 ± 0.05 (0.27–0.47). Longitud total del esófago 1.76 ± 0.15 (1.57–2.16); región muscular 0.32 ± 0.04 (0.23–0.37) largo por 45.83 ± 5.48 (37.5–57.5) μm de ancho; región glandular 1.43 ± 0.15 (1.27–1.85) de largo por 98.16 ± 14.49 (75–130) μm de ancho. Anillo nervioso al extremo anterior 231.33 ± 26.69 (175–275) μm . Vulva ligeramente saliente 1.15 ± 0.14 (0.93–1.43) del extremo anterior. Vagina usualmente orientada anteriormente y se enrolla en la porción glandular del esófago. Longitud de cola 359.33 ± 42.33 (250–400) μm . Ala lateral conspicua (Figuras 25 y 26).

Comentarios taxonomicos: *Foleyellides striatus* fue descrito originalmente como *Chandlerella striata* Ochoterena y Caballero, 1932 del mesenterio de *Lithobates montezumae* del lago de Xochimilco, D. F. Posteriormente Caballero (1935) estudió el material anteriormente mencionado y erigió el género *Foleyellides* para transferirlo y lo renombró como *F. striatus*. Subsecuentemente fue incluido dentro del género *Foleyella* Witenberg y Gerichter, 1944 y *Waltonella* Bain y Prod'hon, 1974. Luego Esslinger (1986) redescubre el material tipo de *F. striatus* y reinstituye a *Foleyellides* como un género válido.

Nuestro material fue asignado a *F. striatus* debido al patrón de las papilas caudales de los machos, puesto que es la única especie que posee un par de papilas preanales y tres pares de papilas postanales.

Este género ha sido poco estudiado en México puesto que hasta hace poco existían registros de una sola especie (*F. striatus*) a lo largo de todo el país. Sin embargo, recientemente a partir de recolectas nuevas y exámenes morfológicos detallados, se han encontrado especies nuevas, ejemplo de esto son los trabajos de Romero-Mayen (2011) en *Lithobates psilonota* de Atenquique y Zapopan, Jalisco y Ruiz-Torres (2013) en *Rhinella marina* de Laguna de Coyuca, Guerrero.

Registros previos: *Foleyellides striatus* ha sido registrado en *Lithobates montezumae* del Lago de Xochimilco, D. F., en *L. montezumae* de la Ciénaga de Lerma en el Estado de México. En *L. cf. forreri* de la Laguna de Tres Palos en San Pedro de las Playas, Guerrero. En Michoacán se ha registrado en *L. megapoda* en el Lago de Cuitzeo, *L. dunnii* en el lago de Zacapu y *Lithobates* sp. de una localidad desconocida. En Quintana Roo, se registró en *L. brownorum* de las localidades de Juan Sarabia y Nuevo Paraíso (Juárez-Terán, 2011). En Sinaloa de localidades desconocidas se ha encontrado en *L. forreri* y *L. magnaocularis*. En Sonora se tiene a *L. tarahumarae* de la localidad de Yécora. Paredes-Calderón *et al.*, 2008, a menos que se señale otra fuente).

Desarrollo y transmisión de *Foleyella flexicauda*: No se conoce el desarrollo y transmisión de los nemátodos del género *Foleyellides*, por lo que a continuación se menciona el de un género relacionado. *Foleyella flexicauda* es un parásito del mesenterio y cavidad corporal de *Lithobates catesbeianus*. El mosquito *Culex territans* ha demostrado ser un hospedero intermediario debido a que se alimenta de ranas. La microfilaria se encuentra en los vasos sanguíneos de la rana, el mosquito las succiona al alimentarse de la rana, y ésta invade el hemocele, donde se lleva a cabo el desarrollo a larva segundo y tercer estadio. La larva en tercer estadio migra hacia la cabeza del mosquito y las ranas son infectadas cuando el mosquito se alimenta de ellas (Figura 27) (Anderson, 2000; Benach y Crans, 1973).

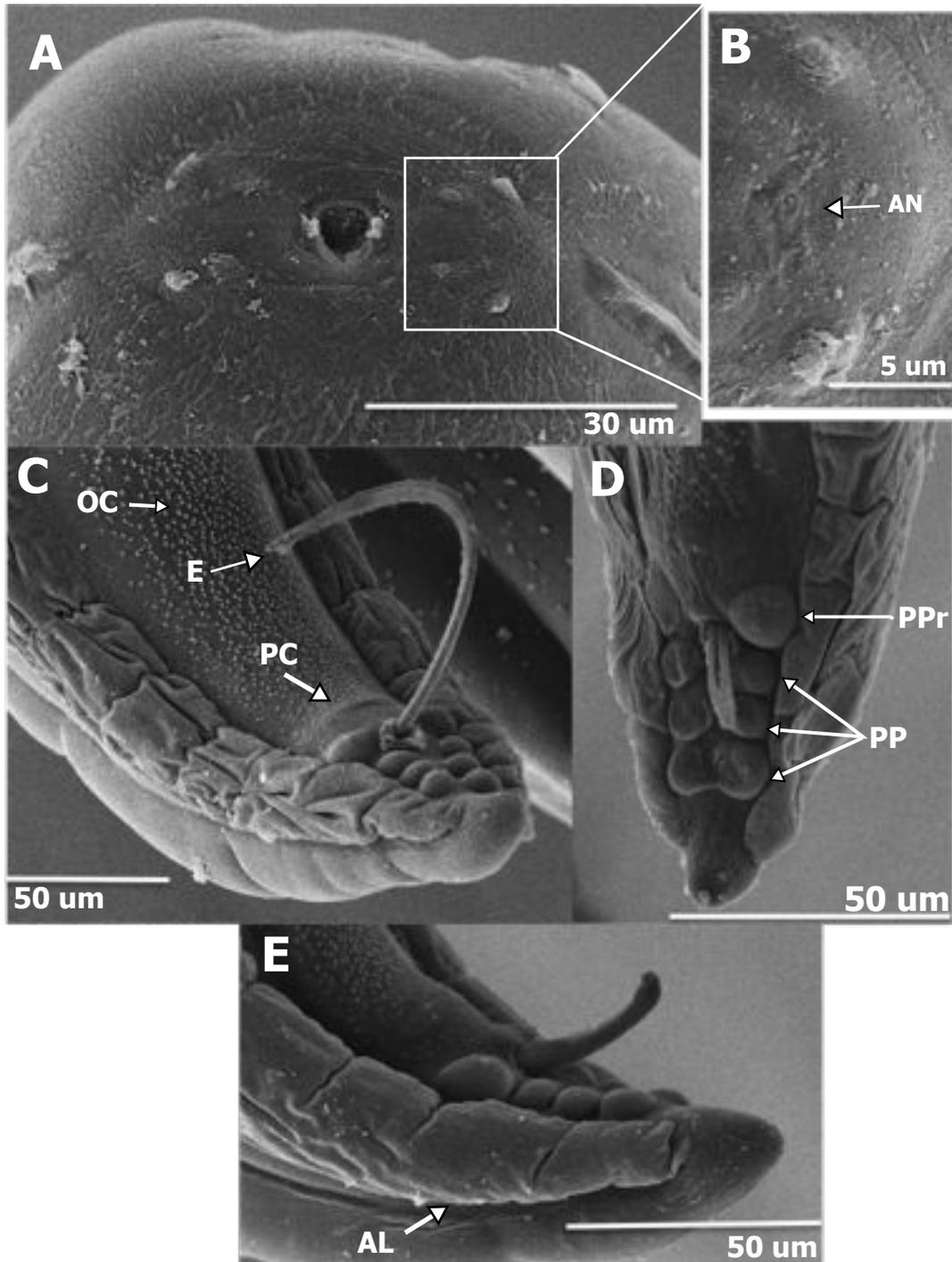


Figura 24. Microscopía electrónica de barrido de *Foleyellides striatus*, macho. A, vista apical de la región cefálica donde se aprecian dos círculos de papilas con cuatro papilas cada uno; B, detalle de la placa cefálica donde se observa el anfidio; C, vista ventral de la región posterior; D, Vista ventral de la región posterior; E, vista lateral de la región posterior. AL= ala lateral, AN= anfidio, E= espícula, OC= ornamentación cuticular, PC= placa cuticularizada, PP= papilas postanales, PPr= papilas preanales.

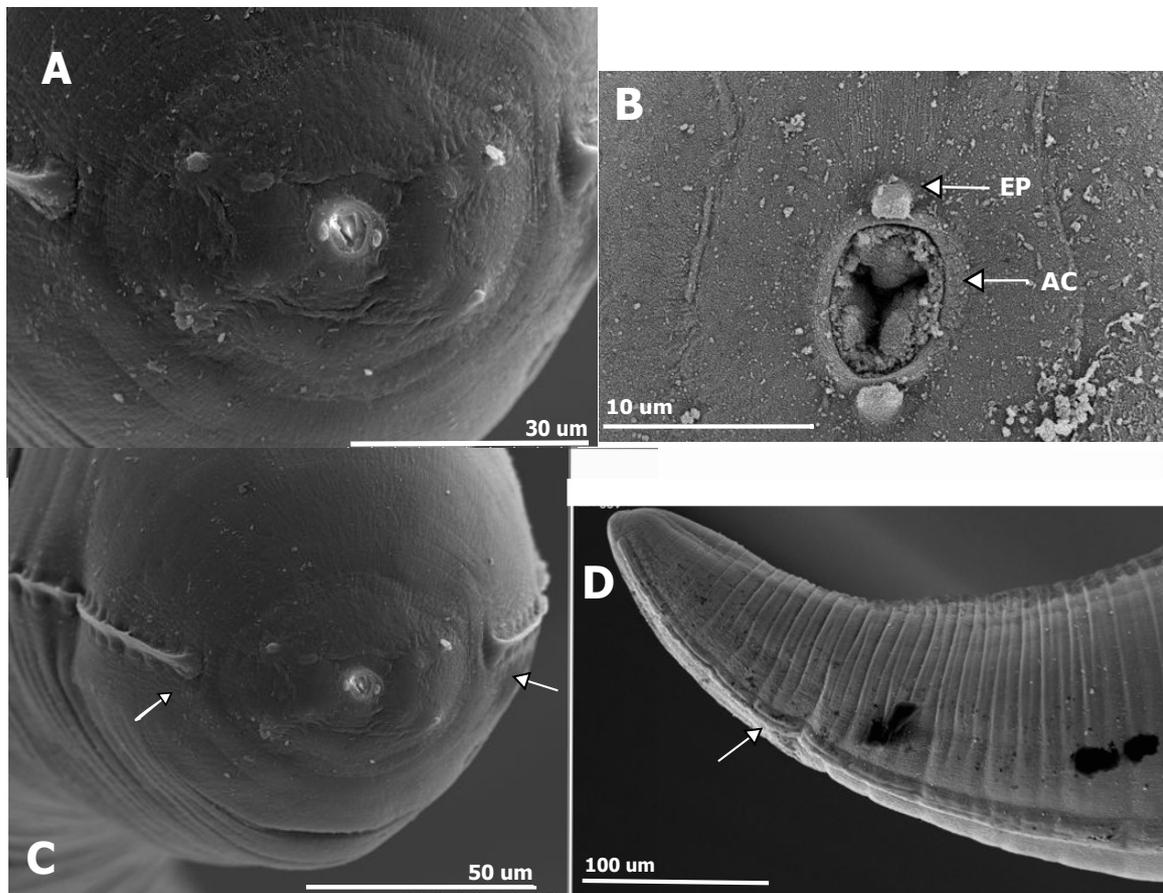


Figura 25. Microscopia electrónica de barrido de *Foleyellides striatus*, hembra. A, vista apical de la región cefálica; B, detalle de la boca donde se observa un anillo cuticular que rodea la abertura oral y dos estructuras parastomatales en cada extremo; C, vista apical de la región cefálica donde se observa el inicio de las alas señaladas por flechas; D, Vista lateral de la región posterior, donde se observa el final del ala señalada por una flecha. AC= anillo cuticular, EP= Estructuras paraestomatales.

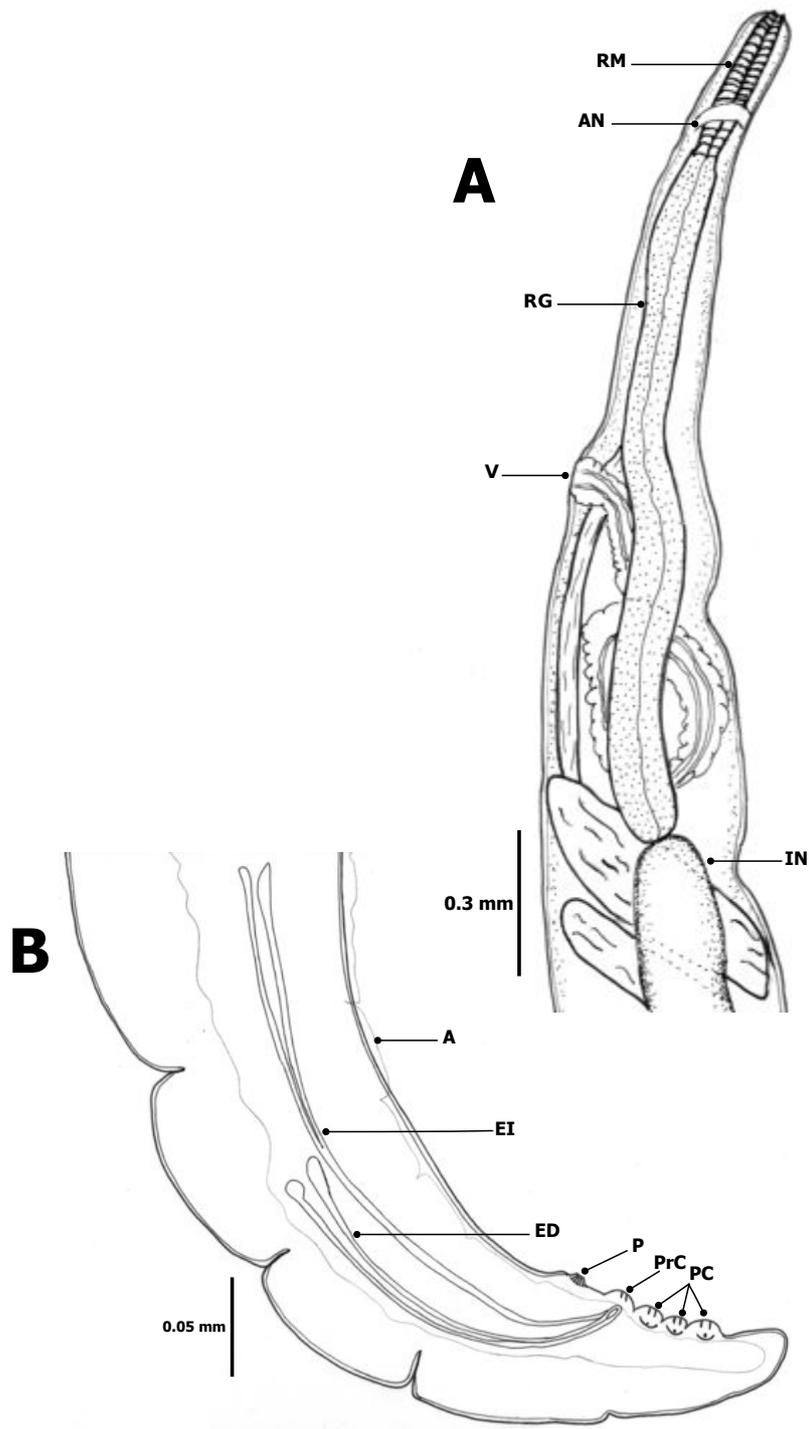


Figura 26. Microscopia óptica de *Foleyllides striatus*. A, vista lateral de la región anterior de una hembra; B, vista lateral de la región posterior de un macho. A= ala lateral, AN= anillo nervioso, ED= espícula derecha, EI= espícula izquierda, IN= intestino, RG= región glandular del esófago, RM= región muscular del esófago, P= placa cuticularizada, PC= papilas postcloacales, PrC= papilas precloacales, V= vulva.

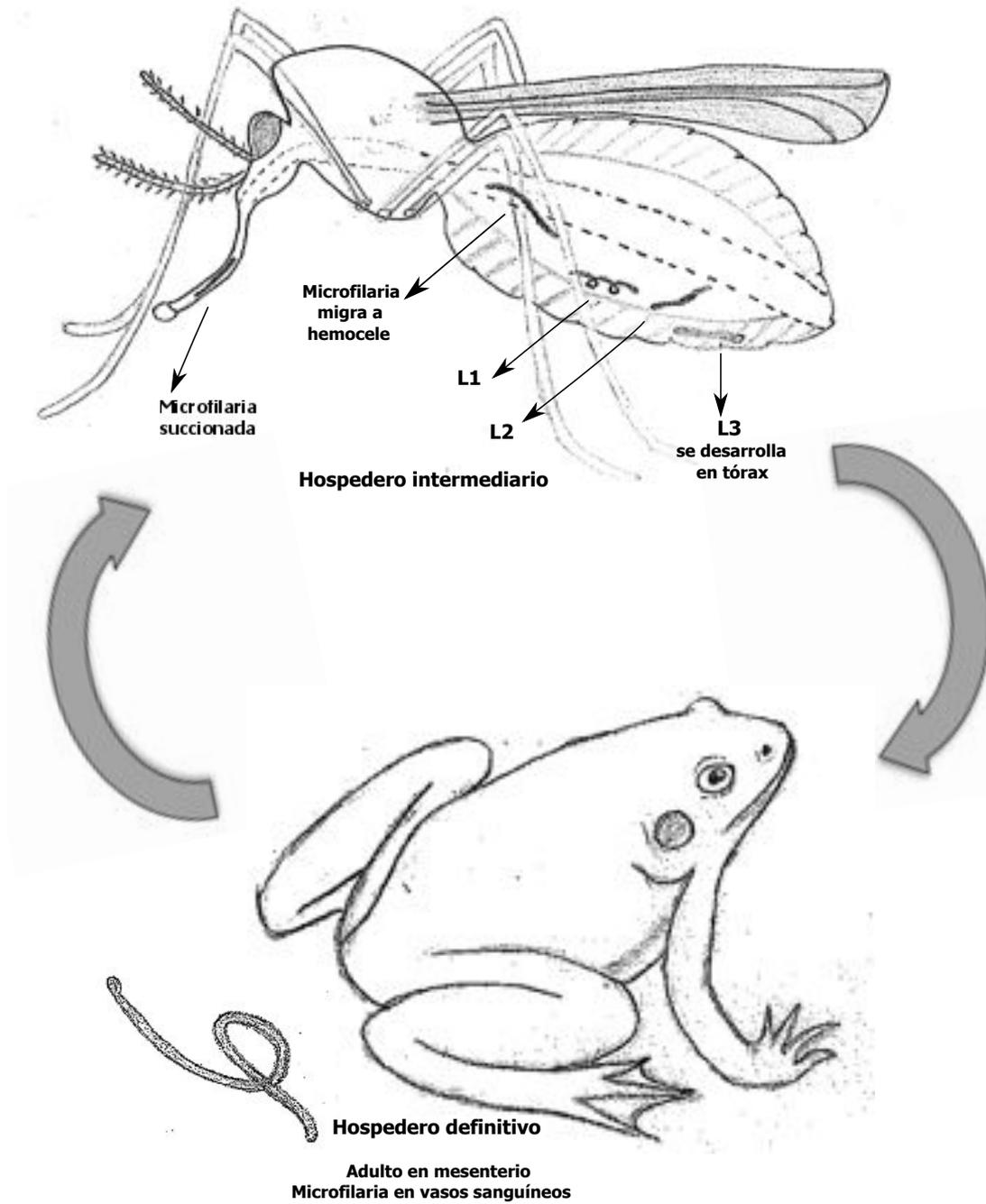


Figura 27. Desarrollo y transmisión de *Foleyella flexicauda* de acuerdo con Benach y Crans, 1973. Ver detalles en texto. Ilustraciones realizadas por MGVA.

7.3 Caracterización molecular de los helmintos de *Lithobates megapoda*

Se obtuvieron 13 secuencias parciales de COI de la región utilizada para el Código de Barras (fragmento de Folmer), y se distribuyeron como sigue: tres de *Glyphelmims quieta*, una de *Ophiotaenia* sp., ambos platelmintos; para los nemátodos se amplificaron tres secuencias para cada una de estas especies: *Contracaecum* sp., *Foleyellides striatus* y *Rhabdias* n. sp.

Esta es la primera vez que se amplifica la región del código de barras para todas estas especies, aunque, *Contracaecum* sp. es un caso muy particular porque al compararse con la secuencia de *Contracaecum* cf *spiculigerum* (GenBank CCU57031), presenta una divergencia genética entre 1 a 0.6%, lo que pudiera sugerir que se trata de la misma especie según la evidencia encontrada en otros nemátodos, la cual indica que las diferencias intraespecíficas son de un máximo de 2% y que valores mayores a ésto representa variación interespecífica (Velarde-Aguilar, 2011). Sin embargo, no es posible asegurarlo dado que no se pudieron observar los caracteres morfológicos diagnósticos, y además, no existe una evidencia robusta de las divergencias genéticas intraespecíficas e interespecíficas para helmintos. Por otro lado, *F. striatus* y *Rhabdias* n. sp., son caracterizados molecularmente por primera vez (GenBank, 2014).

Hubo una congruencia morfológica y molecular con *F. striatus* (divergencia genética 0-0.4%), apoyando que los ejemplares de las tres localidades del presente estudio pertenecen a la misma especie. Los ejemplares de *Contracaecum* sp. de Atotonilco y Chapala, también poseen una divergencia genética intraespecífica que sugiere pertenecen a la misma especie (0-0.2%). Por último, las tres secuencias de *Rhabdias* n. sp. fueron idénticas (0% de divergencia genética) (Figura 28).

Con respecto a los platelmintos, se obtuvieron secuencias de únicamente dos especies y no se pudieron realizar análisis comparativos significativos, ya que son de clases distintas. Las tres secuencias de *Glyphelmims quieta* no presentaron diferencias entre sí y *Ophiotaenia* sp. aparece como grupo hermano de estas (Figura 29).

Los ejemplares de *Eustrogyllides* sp. y Polymorphidae gen. sp. no pudieron ser caracterizados molecularmente, el primero debido a que se obtuvieron co-amplificaciones del hospedero, y del segundo no se recolectó suficiente material para realizar este estudio.

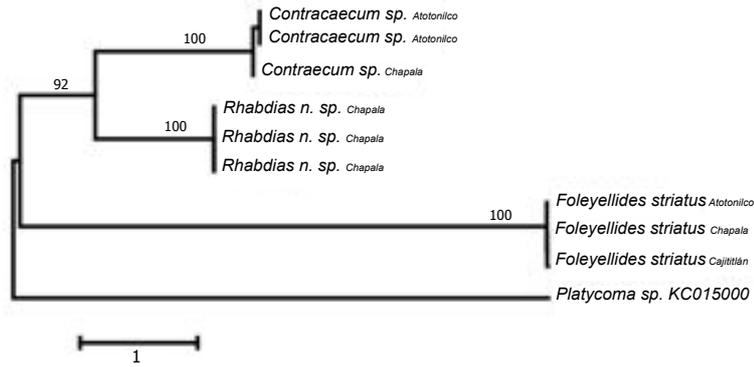


Figura 28. Filograma de Neighbor joining de la región COI del código de barras de los nemátodos caracterizados molecularmente en el presente estudio. Como grupo externo se utilizó a *Platycoma* sp. KC015000. En los nodos se muestran valores de bootstrap >70%.

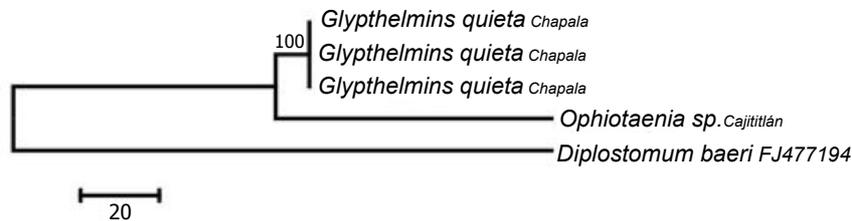


Figura 29. Filograma de Neighbor joining de la región COI del código de barras de los platelmintos caracterizados molecularmente en el presente estudio. Como grupo externo se utilizó a *Diplostomum baeri* FJ477194. En los nodos se muestran valores de bootstrap >70%.

7.4 Caracterización de las infecciones

Población del Lago de Atotonilco, Jalisco

En esta localidad se recolectaron 12 hospederos (hembras y machos, adultos y juveniles). De éstos, se obtuvieron un total de seis especies de helmintos. El grupo más abundante fue el de los nemátodos con cuatro especies, seguido de los tremátodos y acantocéfalos con una especie cada uno.

Esta localidad no había sido estudiada helmintológicamente para ningún grupo de hospedero, por lo que se presentan seis nuevos registros de localidad y dos nuevos registros de hospedero.

Los helmintos con más representatividad fueron *Contraecaecum* sp. y *F. striatus*, presentes ambos en el 100% de los hospederos estudiados con una abundancia de 6.58 gusanos por rana revisada, e intensidad promedio de 10.16 gusanos por rana infectada. Los menos representados fueron *Glypthelmins quieta*, *Rhabdias* n. sp. y Polymorphidae gen. sp. parasitando a un hospedero con un solo ejemplar (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en *L. megapoda* del Lago de Atotonilco, Jal.

Helminto	RP	NH	%	Ab	I	I-I
<i>Glythelmins quieta</i> * [*]	1	6	8.3	0.5	6	0-6
<i>Contraecum</i> sp.* [*]	12	79	100	6.58	6.58	1-25
<i>Eustrongylides</i> sp.* [*]	6	26	50	2.16	4.33	1-9
<i>Foleyellides striatus</i> * [*]	12	122	100	10.16	10.16	1-18
<i>Rhabdias</i> n. sp.* [§]	1	1	8.3	0.083	1	0-1
Polymorphidae gen. sp.* [§]	1	1	8.3	0.083	1	0-1

RP = Ranas parasitadas, NH= Número de helmintos, %= Prevalencia, Ab= Abundancia, I= Intensidad promedio, I-I= Intervalo de intensidad, *nuevos registros de localidad, §nuevos registros de hospedero.

La curva de acumulación de especies para los hospederos del Lago de Atotonilco, Jalisco, se muestra estabilizada a partir del hospedero número cuatro, por lo que se considera que el muestreo fue suficiente para tener una muestra representativa de la helmintofauna de *L. megapoda* en dicha localidad (Figura 30).

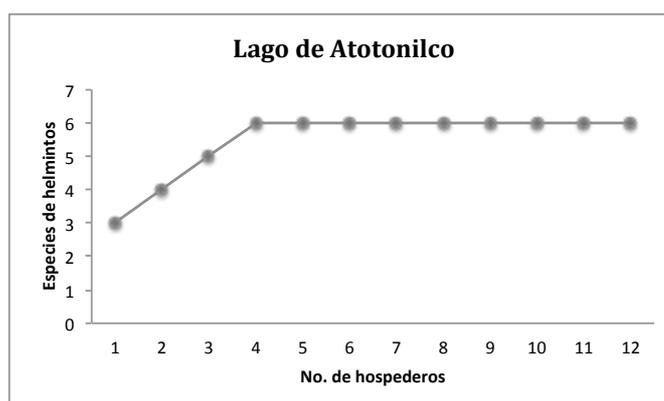


Figura 30. Curva de acumulación de las especies *L. megapoda* en la localidad del Lago de Atotonilco, Jalisco. En el eje de las X se muestra el número de hospederos revisados y en el de las Y el No. de especies de helmintos observadas en cada hospero.

Población Lago de Cajititlán, Jalisco

En esta localidad se recolectaron cinco hospederos (hembras y machos adultos). De éstos se obtuvieron tres especies de helmintos; dos del *phylum* Nematoda y uno de la clase Cestoidea (Tabla 9).

El Lago de Cajititlán no había sido estudiado helmintológicamente para ningún grupo de hospedero, por lo que se presentan tres nuevos registros de localidad y un nuevo registro de hospedero.

Los helmintos que presentaron mayor prevalencia y abundancia fueron *Eustrongylides* sp. y *Foleyellides striatus* presentes en todos los hospederos con un promedio de 34.6 y 22 gusanos por rana revisada, respectivamente. *Ophiotaenia* sp. por su parte, se registró en dos hospederos, con valores de 1.2 y 3 de abundancia e intensidad promedio, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en *L. megapoda* del Lago de Cajititlán, Jal.

Helminto	RP	NH	%	Ab	I	I-I
<i>Eustrongylides</i> sp. *	5	173	100	34.6	34.6	14-55
<i>Foleyellides striatus</i> *	5	110	100	22	22	2-49
<i>Ophiotaenia</i> sp. §*	2	6	40	1.2	3	1-5

RP = Ranas parasitadas, NH= Número de helmintos, %= Prevalencia, Ab= Abundancia, I= Intensidad promedio, I-I= Intervalo de intensidad, *nuevo registro de localidad, §nuevo registro de hospedero.

La curva de acumulación de especies de la localidad del Lago de Cajititlán, Jalisco, muestra que el número de helmintos encontrados en el segundo hospedero se mantuvo constante en el resto de ranas. Sin embargo, dado el bajo número de hospederos estudiados es poco probable que la helmintofauna de *L. megapoda* esté bien representada en el presente muestreo (Figura 31).



Figura 31. Curva de acumulación de las especies *L. megapoda* en la localidad del Lago de Cajititlán, Jalisco. En el eje de las X se muestra el número de hospederos revisados y en el de las Y el No. de especies de helmintos observadas en cada hospero.

Población del Lago de Chapala, Jalisco

En esta localidad se recolectaron 13 hospederos (hembras y machos, adultos y juveniles), 10 de ellos en la localidad de Ocotlán y tres en Tizapán el Alto, las cuales se localizan al Norte y Sur del Lago respectivamente. De estas se obtuvieron un total de seis especies de helmintos. El grupo más abundante fueron los nemátodos con cuatro especies, seguidos por los tremátodos y acantocéfalos con una especie cada uno (Tabla 9).

El Lago de Chapala ya ha sido objeto de estudio para varios grupos de hospederos, por lo que se sólo tenemos cinco nuevos registros de localidad y dos nuevos registros de hospedero.

La especie de helminto más importante en términos de prevalencia y abundancia es *Contracaecum* sp. con el 84.6% de hospederos infectados y un promedio de 10 individuos por rana recolectada y 11.81 nemátodos por rana infectada. *Glypthelmins quieta*, *Rhabdias* n. sp. y Polymorphidae gen. sp. parasitaron a un solo hospedero, y de ellos *G. quieta* presentó la abundancia e intensidad mas alta con 9.3 gusanos por rana recolectada y 121 gusanos en la rana infectada.

Tabla 9. Caracterización de las infecciones de helmintos registrados en *L. megapoda* del Lago de Chapala, Jal.

Helminto	RP	NH	%	Ab	I	I-I
<i>Glypthelmins quieta</i> [¶]	1	121	7.7	9.3	121	0-121
<i>Contracaecum</i> sp. [*]	11	130	84.6	10	11.81	2-42
<i>Eustrongylides</i> sp. [*]	8	49	61.5	3.76	6.12	1-26
<i>Foleyellides striatus</i> [*]	8	93	61.5	7.15	11.62	2-51
<i>Rhabdias</i> n. sp. ^{§*} ¶	1	30	7.7	2.30	30	0-30
Polymorphidae gen sp. ^{§*} ¶	1	25	7.7	1.92	25	0-25

RP = Ranas parasitadas, NH= Número de helmintos, %= Prevalencia, Ab= Abundancia, I= Intensidad promedio, I-I= Intervalo de intensidad, ^{*}nuevos registros de localidad, [§]nuevos registros de hospedero, [¶]Registrada únicamente en Ocotlán, Jal.

En la gráfica se llega a una estabilización hacia el hospedero nueve, pero es probable que no exista una buena representatividad de la helmintofauna del Lago de Chapala en el presente estudio, dada la enorme extensión del lago (Figura 32).

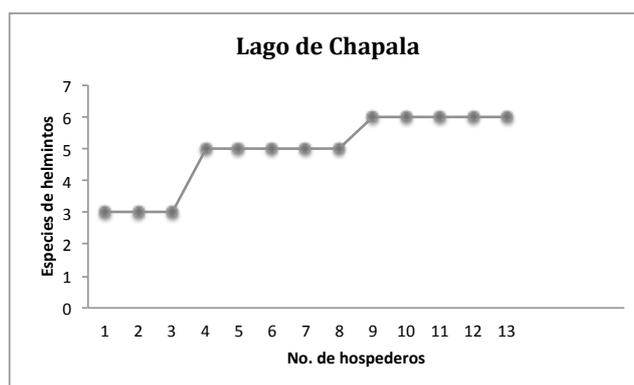


Figura 32. Curva de acumulación de las especies *L. megapoda* en la localidad del Lago de Chapala, Jalisco. En el eje de las X se muestra el número de hospederos revisados y en el de las Y el No. de especies de helmintos observadas en cada hospero.

En el caso de las tres ranas recolectadas en Tizapán el Alto se registró a *Eustrongylides* sp. presente en dos ranas, con 2.33 individuos por rana revisada. *Foleyellides striatus* parasitó a una rana con cuatro gusanos, y *Contracaecum* sp. parasitó a dos ranas con un promedio de un individuo por rana revisada. Debido a los bajos valores encontrados y que no se encontró una fauna helmintológica distinta a Ocotlán, se decidió juntar ambas recolectas para realizar todos los análisis ecológicos.

Comparación de las infecciones entre localidades

Un total de 972 helmintos fueron recolectados de las ranas de las tres localidades. La composición de helmintos estuvo numéricamente dominada por nemátodos (813 individuos), seguido de platelmintos (127 digéneos y seis céstodos) y acantocéfalos (26 individuos)

Las especies que estuvieron presentes en todas las localidades fueron los nemátodos *Foleyellides striatus* y *Eustrongylides* sp. y también los que presentaron el mayor número de individuos con 325 y 248 respectivamente. Asimismo *Ophiotaenia* sp. fue el único helminto presente en una sola localidad (Cajititlán), y a su vez la que presentó el menor número de individuos con seis.

Foleyellides striatus estuvo presente en el 83.3% de las ranas revisadas y en seguida *Contracaecum* sp. en el 76.6%; por su parte, Polymorphidae gen. sp., *Rhabdias* n. sp. y *Glypthelmins quieta* fueron las menos presentes con el 6.6%. La abundancia más alta se registró en Cajititlán con 34.6 correspondiente a *Eustrongylides* sp. y la más baja en Atotonilco con 0.083 para Polymorphidae gen. sp. y *Rhabdias* n. sp.

7.5 Comunidades de helmintos

7.5.1 Componente de comunidad

El componente de comunidad de helmintos que registró los mayores niveles para los atributos calculados fue el de los hospederos del Lago de Chapala, como resultado de la menor dominancia ejercida por el nemátodo *Contracaecum* sp. en este sistema; de la misma forma, las abundancias proporcionales de las especies de helmintos en las ranas de esta localidad, fueron las mas homogéneas, lo que incidió sobre el mayor valor de diversidad registrado en éstas (Tabla 10).

Tabla 10. Componente de comunidad de helmintos de *L. megapoda* en las tres localidades del presente estudio.

Atributos	Lago de Atotonilco	Lago de Cajititlán	Lago de Chapala
Hospederos examinados	12	5	13
Hospederos parasitados	12	5	13
Riqueza	6	3	6
Abundancia	253	289	448
Diversidad de Brillouin	1.517	1.065	2.29
Equidad de Simpson	0.42	0.66	0.75
Especie dominante	<i>Foleyellides striatus</i>	<i>Eustrongylides</i> sp.	<i>Contracaecum</i> sp.
Índice de Berger Parker	0.51	0.59	0.29

De la misma forma, la riqueza reducida en los componentes de comunidad de los hospederos del lago de Cajititlán aunada a la dominancia de las larvas de *Eustrongylides* sp. en las ranas (0.59), se refleja en la menor diversidad alcanzada en esta localidad; en cuanto a la equidad, se registran valores altos (0.66), lo que estaría indicando que las especies del componente de comunidad son igualmente abundantes, lo cual pareciera contradecir a los valores de dominancia encontrados; sin embargo, ésto puede explicarse debido a que dos de las tres especies registradas en esta localidad presentan valores de abundancia muy similares (173 individuos de *Eustrongylides* sp. vs 110 individuos de *F. striatus*).

En el lago de Atotonilco el nemátodo *F. striatus* es la especie que ejerce la mayor dominancia y al mismo tiempo se presenta una equidad baja porque la diferencia entre la especie dominante y las especies menos abundantes es muy grande (122 individuos vs un individuo, respectivamente), lo que determina el reducido valor de diversidad registrado (Tabla 10).

En los tres ambientes la totalidad de hospederos estuvieron parasitados y la dominancia fue ejercida por nemátodos (dos en estado larvario y un adulto), con vías de infección distintas.

7.5.2 Infracomunidades

Tabla 11. Estructura de las infracomunidades de helmintos de *L. megapoda* en las localidades del presente estudio.

Atributos	Lago de Atotonilco n= 12	Lago de Cajititlán n= 5	Lago de Chapala n=13
Riqueza	2.75±0.75 (2-4)	2.4±0.54 (2-3)	2.30±0.85 (1-3)
Abundancia	19.58±10.68 (4-44)	57.8±15.41 (40-77)	34.46±54.42 (1-202)
Diversidad de Brillouin	0.82±0.38 (0.23-1.35)	0.79±0.34 (0.18-1.01)	0.70±0.44 (0-1.31)
Equidad de Simpson	0.71±0.11 (0.55-0.88)	0.72±0.18 (0.53-0.93)	0.55±0.35 (0-0.98)
Índice de Berger-Parker	0.74±0.168 (0.5-0.94)	0.74±0.20 (0.56-0.96)	0.49±0.38 (0-0.86)
Especie dominante	<i>Foleyellides striatus</i>	<i>Eustrongylides</i> sp.	<i>Contraecaecum</i> sp.
% de infracomunidades que domina	66.6	60	40
Ranas con 1 especie	0	0	3
Ranas con 2 especies	5	3	3
Ranas con < 2 especies	7	2	7

Se presenta su promedio, desviación estándar y el rango entre paréntesis

La totalidad de hospederos individuales analizados en este estudio estuvieron infectados por un intervalo de una a cuatro especies y de uno a 202 individuos.

Las infracomunidades del lago de Atotonilco presentaron mayor número de especies por hospedero y al mismo tiempo, el menor número de helmintos por rana, pero dichos parásitos estuvieron distribuidos de una manera más uniforme, lo que da como consecuencia una mayor equidad y diversidad.

Para los individuos del lago de Cajititlán se registraron en promedio 57.8 helmintos por hospedero, lo que hace que la localidad tenga las mayores abundancias y equidades de todas, puesto que las especies de helmintos que las parasitan son casi igualmente abundantes.

En el lago de Chapala se presentó la menor riqueza de todas las localidades; esta cifra es el resultado de que para algunas infracomunidades se registró solamente una

especie de helminto, particularmente en las de Tizapán, cosa que no ocurrió con ninguna de las infracomunidades del resto de las localidades. En este lago también se presentó la infracomunidad con la mayor abundancia (202 individuos). De manera comparativa con los otros sitios muestreados, la dominancia fue ejercida por las cuatro especies que parasitaron a la rana en esta localidad en una proporción similar (*Contracaecum* sp. fue la especie dominante en cuatro infracomunidades, *F. striatus* en tres, *Eustrongylides* sp. en dos y *G. quieta* en una) lo que trajo como consecuencia una diversidad relativamente alta, a pesar de que las abundancias proporcionales no se encuentran distribuidas muy homogéneamente por lo que la equidad posee un valor bajo, atribuible a la gran diferencia en cuanto al número de helmintos registrados en los hospederos individuales, que osciló entre un helminto (*Contracaecum* sp.) y 202 (*G. quieta* en un solo hospedero) (Tabla 11).

7.6 Análisis de similitud cuantitativa y cualitativa

En la comparación de infracomunidades de Atotonilco vs Cajititlán se obtuvo un promedio de 0.41 para el índice de porcentaje de similitud, con sólo el 30% de los pares comparados con un valores ≤ 0.5 . Para el coeficiente de Sorensen calculado para el mismo par de lagos, el valor promedio fue de 0.57 y el 75% de las infracomunidades registró valores ≤ 0.5 .

En el caso de la similitud entre Chapala y Cajititlán se obtuvo en promedio un porcentaje de similitud de 0.32 y de Coeficiente de Sorensen de 0.49. Sin embargo, de las 65 pares de infracomunidades comparadas 15 tuvieron un valor de 0 en ambos índices. Así mismo sólo el 32% de ellas alcanzaron un valor ≤ 0.5 para el índice cuantitativo y 63% para el índice cualitativo.

El análisis de Chapala vs Atotonilco incluyó a 65 pares de infracomunidades, de las cuales, seis tuvieron valores de 0, el 41.6% registró valores ≤ 0.5 para el porcentaje de similitud y un valor promedio de 0.42. Para el coeficiente de Sorensen el 81.4% de las infracomunidades tuvieron un valor ≤ 0.5 y el promedio fue de 0.68.

Los valores con 0 significan que no existen similitudes entre las localidades y 1 indica que son completamente similares, esto tanto para el porcentaje de similitud como para el coeficiente de Sorensen. De acuerdo a lo anterior podemos observar en nuestros resultados que ambos índices fueron muy bajos para todos los pares de localidades comparados, ya que sólo el coeficiente de Sorensen para las localidades

de Atotonilco vs Chapala registró un valor de 0.6, lo que indica una alta disparidad en composición y abundancia de especies entre las localidades estudiadas (Tabla 12).

Aún con estos bajos valores, podemos observar que las localidades que son más parecidas en cuanto a composición de especies como en abundancias son el Lago de Atotonilco y Lago de Chapala (Figura 33).

Tabla 12. Patrones de similitud cualitativa y cuantitativa entre las localidades estudiadas

Localidades	No. de pares comparados	Porcentaje de similitud	Coefficiente de Sorensen
Atotonilco vs Cajititlán	60	0.41 ± 0.2 (0.35-0.75)	0.57 ± 0.14 (0.3-0.8)
Chapala vs Cajititlán	65	0.32 ± 0.27 (0-0.96)	0.49 ± 0.3 (0-0.8)
Atotonilco vs Chapala	156	0.42 ± 0.4 (0-0.91)	0.68 ± 0.24 (0-1)

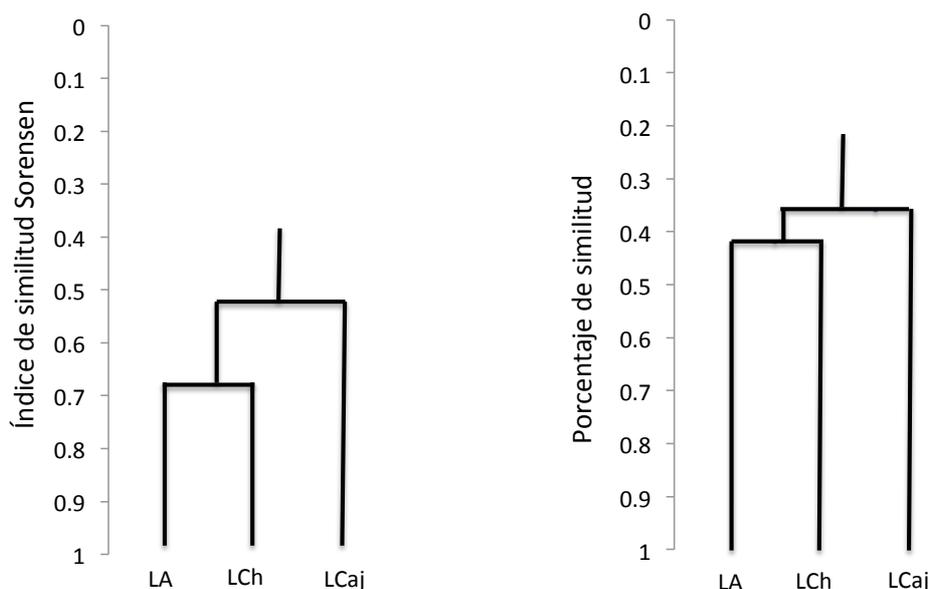


Figura 33. Dendrogramas de UPGMA utilizando el índice de similitud de Sorensen (izquierda) y el porcentaje de similitud (derecha) para las localidades del presente estudio. LA= Lago de Atotonilco, LCh= Lago de Chapala, LCaj= Lago de Cajititlán.

8 DISCUSIÓN

Registro helmintológico

La helmintofauna de *Lithobates megapoda* en las tres localidades estudiadas está conformada por siete especies de helmintos de las cuales cuatro son nemátodos (*Eustrongylides* sp., *Contracaecum* sp., *Foleyellides striatus* y *Rhabdias* n. sp.), un céstodo (*Ophiotaenia* sp.), un tremátodo (*Glyphelmins quieta*) y un acantocéfalo (Polymorphidae gen. sp.).

A pesar de que esta especie de rana fue descrita desde 1899, y de la importancia económica y cultural que ha representado para los pobladores locales desde la época prehispánica, se conoce poco de su helmintofauna. A excepción de *G. quieta* del lago de Chapala, todos los helmintos representan nuevos registros de localidad para este hospedero. Asimismo, *Ophiotaenia* sp. y Polymorphidae gen. sp. se registran por primera vez en este hospedero y *Rhabdias* n. sp. es una nueva especie (ver Paredes-León *et al.*, 2008).

Los helmintos *Eustrongylides* sp., *Contracaecum* sp. y Polymorphidae gen. sp. se registraron en estadios larvarios, por lo que no pudieron identificarse a nivel específico debido a que carecen de los caracteres diagnósticos necesarios. Estas especies completan sus ciclos de vida en aves piscívoras y las ranas actuarían como hospederos paraténicos. *L. megapoda* adquiere la infección a través de la ingesta ya sea de peces o invertebrados (oligoquetos para *Eustrongylides* y copépodos para *Contracaecum*), los cuales son hospederos intermediarios de estos helmintos. Se considera que las ranas juegan un papel de hospedero paraténico porque algunas aves incluyen en su dieta también ranas y otros pequeños vertebrados (Anderson, 2000; Nickol *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2009).

Los parásitos *F. striatus*, *G. quieta* y *Ophiotaenia* sp. son típicos de anuros, con mosquitos, moluscos y copépodos respectivamente como hospederos intermediarios (Leigh, 1946; Benach y Crans, 1973; Anderson, 2000). Por otro lado *Rhabdias* n. sp. también es típica de anuros pero posee un ciclo de vida directo, y llega a su hospedero a través de penetración de la piel, después de una fase de vida libre en el agua (Gendron *et al.*, 2003).

Caracterización molecular de helmintos

La identificación de nemátodos utilizando caracteres morfológicos es a menudo complicada, debido a la ausencia de caracteres diagnósticos claros, especialmente cuando están basados en microscopía óptica (Powers, 2004; Rodrigues da Silva *et al.*, 2010). Además gran parte de las características diagnósticas se encuentran exclusivamente en los machos, se ha observado gran plasticidad fenotípica en las poblaciones y también existen especies crípticas (Elsasser *et al.*, 2009). Así que frecuentemente los nemátodos suelen ser identificados hasta género, lo cual es una desventaja para los estudios que requieren de la identificación a nivel específico como los estudios de distribución geográfica, y de especificidad hospedatoria (Anderson, 2000). Es por ello que la incorporación de caracteres moleculares como los códigos de barras genéticos se ha convertido en una herramienta muy prometedora para este grupo (e. g. Elssaser *et al.*, 2009; Ferri *et al.*, 2009; Velarde-Aguilar, 2011; Prosser *et al.*, 2013).

Los organismos de cuerpo blando como los platelmintos presentan poca estabilidad en sus caracteres morfológicos y se pueden presentar variaciones fenotípicas inducidas por el hospedero (Moszczyńska *et al.*, 2009). En este grupo se han utilizado con éxito los códigos de barras genéticos para la detección de especies crípticas (e. g. Locke *et al.*, 2010) y la detección de múltiples especies (e. g. López-Caballero *et al.*, 2013).

La identificación de los estadios larvarios también presenta dificultad puesto que la taxonomía está basada en caracteres de adultos, por lo que no pueden ser identificados con base en sólo morfología (Moszczyńska *et al.*, 2009; Locke *et al.*, 2010). Una de las ventajas de los datos moleculares es que proveen un medio para ligar a los estadios larvarios con adultos conocidos, esto brinda la oportunidad de conocer mejor la diversidad de helmintos en determinado ecosistema, de comprender mejor los ciclos de vida y conocer los hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos que intervienen. Además se podrían obtener huevos, larvas o proglótidos de las excretas de los hospederos y realizar estudios helmintológicos sin la necesidad de sacrificar al hospedero o bien, se podrían estudiar larvas con ciclos de vida libre recolectadas directamente del ecosistema (Moszczyńska *et al.*, 2009).

Para los helmintos parásitos el uso de códigos de barras para identificar estadios larvarios está en sus etapas iniciales pero ya se han tenido casos exitosos: algunos ejemplos son el trabajo de Alcántar-Escalera *et al.*, (2013) donde utilizaron secuencias de COI para ligar a los cistacantos del acantocéfalo *Polymorphus brevis* encontrados en peces, con los adultos que parasitan aves piscívoras. Moszczyńska *et al.*, (2009) con el diseño de primers para amplificar la región del código de barras en platelmintos lograron obtener buena resolución a nivel de especie de estadios larvarios de digeneos particularmente strigeidos. Locke *et al.*, (2010) detectaron 47 especies en metacercarias de diplostómidos de peces de agua dulce.

La identificación morfológica de los ejemplares de este estudio y la caracterización molecular son congruentes, de acuerdo a los resultados encontrados en BLAST (GenBank, 2014) puesto que nuestras secuencias mostraron identidad con las de la misma clase en el caso de *Ophiotaenia* sp., de familia en el caso de *Foleyellides striatus*, de género para *Contracaecum* sp. y *Rhabdias* n. sp., y de especie para *Glypthelmins quieta*. Para el caso de *Ophiotaenia* sp. y *F. striatus* en Genbank no existen secuencias disponibles para esos géneros. Los ejemplares que no se pudieron identificar a especie, las secuencias podrían ser útiles en estudios futuros donde se tenga el adulto (e. g. *Contracaecum* sp.) y puedan ser ligados. *Ophiotaenia* sp. podría ser identificada cuando se cuente con material mejor preservado, o bien podría ser descrita como una nueva especie.

Los métodos moleculares pueden ayudar a inventariar y comprender la diversidad biológica y los roles ecológicos de los helmintos, pero la identificación de estos organismos debe de ser llevada a cabo de una manera integrativa, con una interacción cercana con la taxonomía tradicional.

Análisis ecológico

Lithobates megapoda es una rana altamente acuática. Los adultos viven en cuerpos de agua permanente y pasan la mayor parte del tiempo descansando y alimentándose en el agua, a menudo en un estado semisumergido. Una observación rápida de los contenidos de su intestino refleja una dieta predominantemente acuática (obs. pers.).

Diversos estudios han demostrado que los anfibios acuáticos o semiacuáticos poseen infracomunidades dominadas por tremátodos (Pérez-Ponce de León *et al.*,

2000; Paredes-Calderón *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros resultados difieren de estos estudios, y más bien se ajustan a los patrones descritos por Aho (1990), que señala que los nemátodos frecuentemente dominan la composición de las comunidades de helmintos. Nuestros resultados también coinciden parcialmente con Aho (1990) en el sentido de que existe una dominancia de especies generalistas, y de ciclos de vida simples o directos en las comunidades de helmintos en anfibios, lo cual de nuevo contradice la evidencia de otros estudios en anfibios acuáticos (Paredes-Calderón *et al.*, 2004).

Las inconsistencias antes mencionadas quizá se puedan explicar de otra manera, considerando que cuando existe un ecosistema severamente eutrofizado, como es el caso de los lagos del presente estudio (ver Antecedentes), la riqueza de los macroparásitos declina. El decline está ligado a una disminución en la sobrevivencia de etapas larvianas de vida libre o a la pérdida de hospederos intermediarios a causa del incremento de anoxia, niveles de sulfuro y limitación de la luz. Además, se ha observado que la atrazina (el herbicida más utilizado en el mundo y el tercero en México) es tóxica para los caracoles y artrópodos, que son los hospederos intermediarios de muchas especies de digéneos; así mismo, otros herbicidas han demostrado ser tóxicos para los miracidios de vida libre y cercarias (Johnson y Carpenter, 2008; Goater *et al.*, 2014).

Sin embargo, algunos parásitos sobreviven a estas condiciones, en particular los parásitos generalistas o con ciclos de vida directos o simples como los nemátodos, y pueden alcanzar altos niveles de infección (Johnson y Carpenter, 2008; Goater *et al.*, 2014), debido quizá a que su cutícula gruesa en cierta medida los protege de contaminantes, y por ende sus estadios larvianos de vida libre tienen más probabilidades de sobrevivir en un ambiente eutrofizado (Mwita, 2011).

Eustrongylides sp. es una de las especies generalistas que presentó altos niveles de infección en el presente estudio, particularmente en el Lago de Cajititlán donde fué la especie dominante. Este fenómeno puede explicarse debido a que los turbifícidos, que son hospederos intemediarios de estos gusanos, proliferan en condiciones de altos niveles de nutrientes y bajas condiciones de oxígeno, y es debido a esta cualidad que se han utilizado universalmente como bioindicadores de contaminación orgánica (Martins *et al.*, 2008). Estos oligoquetos son ingeridos por peces, los cuales al ser parasitados son más susceptibles a la depredación, como se ha

observado en peces mosquito al ser parasitados por *E. ignotus*, y por esto existen más posibilidades de que el parásito se transmita a ranas o a sus hospederos definitivos, las aves (Johnson y Carpenter, 2008), aunque la infección hacia ranas puede darse también con la ingestión de los oligoquetos parasitados (Anderson, 2000).

Estos altos niveles de infección son inusuales y parece ser que son de reciente aparición en estas ranas según los relatos de algunos pobladores quienes comentan que se han dejado de consumir ancas de rana, debido a la gran cantidad de gusanos rojos que las parasitan, mismos que son fácilmente perceptibles, puesto que en ocasiones emergen hasta el tejido subcutáneo (obs. pers.). Esto no es sólo un problema para los humanos que pudieran infectarse con estos nemátodos, sino un problema de salud para las ranas también, puesto que se ha observado que causan lesiones en el músculo esquelético de esta especie, y también se ha asociado con adelgazamiento en otras ranas (Ramírez-Lezama y Osorio-Sarabia, 2001; Lemke *et al.*, 2008). De la misma forma se ha visto que las infecciones pueden causar arriba del 80% de mortalidad en colonias de garzas (Johnson y Carpenter, 2008).

Para el caso de *Contracaecum* sp., la especie más dominante en el lago de Chapala, los altos niveles de prevalencia y abundancia pueden deberse a que se ha relacionado a la eutroficación con la proliferación de zooplancton, como los copépodos, los cuales actúan como hospederos intermediarios (Mwita, 2011), y también se ha observado que las ranas pueden infectarse a través de la ingesta de un pez, e incluso se ha observado experimentalmente que los peces y aves pueden infectarse con el consumo directo de la larva infectiva (Anderson, 2000; Moravec, 2009), por lo que esta gran capacidad de infectar a sus hospederos por diferentes vías puede explicar también la prevalencia y abundancia de esta especie.

Este nemátodo es zoonótico, por lo que representa un peligro potencial para las personas que consumen ranas de la zona, pero también es un problema de salud para estos organismos y otros hospederos, puesto que se ha visto que una fuerte infestación por estos gusanos causan adelgazamiento en ranas y problemas gástricos en peces y aves (Lemke *et al.*, 2008; Mwita, 2011).

El helminto más abundante en la localidad de Atotonilco fué el nemátodo *Foleyellides striatus*, el cual es transmitido por la picadura de un mosquito. Este tipo de infección es muy efectiva, puesto que las microfilarias se encuentran en la sangre periférica de la rana, lo que las hace muy disponibles para que los mosquitos se

infecten al alimentarse de la sangre, lo que podría explicar las altas prevalencias registradas en esta y las demás localidades (70-100% de los hospederos infectados) (Anderson, 2000; Benach y Crans, 1973).

Culex territans es uno de los mosquitos que se han identificado como vectores de nemátodos de especies hermanas de *Foleyellides*. Estos se alimentan exclusivamente de anfibios y reptiles, y se agregan en áreas donde exista un alta densidad de hospederos. Se sabe que estos mosquitos se guían por el croar de las ranas, por lo que la época de apareamiento sería el mejor momento para alimentarse. Dado que la recolecta de hospederos de este estudio se llevó a cabo en época reproductiva es posible que esta sea la explicación a las altas abundancias aquí registradas (Burkett-Cadena *et al.*, 2013).

Las características de las infracomunidades estudiadas, corresponden a las de las comunidades de helmintos para anfibios descritas por Aho (1990), en el sentido de que son depauperadas, y son altamente variables en comparación con las infracomunidades de aves o mamíferos. Dicho autor identificó dos factores como responsables de tales patrones. Primero, sugirió que la baja vagilidad podría restringir la exposición a muchas especies de helmintos, y segundo que los bajos requerimientos energéticos, debido a su condición poikilotérmica, podrían reducir el consumo de potenciales hospederos intermediarios. Ambos factores podrían explicar parcialmente la estructura de comunidades encontradas en *L. megapoda*.

Aunque es justamente la dieta la que parece ser la principal fuerza estructuradora de las comunidades de helmintos, puesto que el 71.4% de las especies ingresa vía ingestión de los hospederos intermediarios, aportando un importante componente a la riqueza de los sistemas estudiados. Además, la dominancia ejercida por los nemátodos *Eustrongylides* sp. y *Contracaecum* sp. en dos de las localidades confirman a *L. megapoda* como un depredador activo, al infectarse a través del consumo de peces e invertebrados. Estos resultados coinciden con los encontrados por Paredes-Calderón *et al.*, (2004) para *Lithobates vaillanti* de Los Tuxtlas, Ver. y García-Altamirano *et al.*, (1993) para *L. dunni* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Por otra parte, la abundancia es determinada por dos procesos de infección: la ingestión de formas larvarias (particularmente en los casos de *Eustrongylides* y *Contracaecum*) y de manera sobresaliente por la penetración (vía vectores) de *F. striatus*.

La riqueza encontrada en todas las localidades del presente estudio (2.3-2.75) es menor que la registrada para *L. vaillanti* de los tuxtlas, Veracruz (3.49±0.22) y también para *L. dunni* del lago de Pátzcuaro, Michoacán (3.3±1.5). En cuanto a abundancia, *L. megapoda* de todas las localidades es mayor (19.58-57.8) que la de *L. vaillanti* (16.1±16.3), pero menor que *L. dunni* (878.4±2,010), aunque estas abundancias se encuentran distribuidas más homogéneamente en *L. megapoda* y *L. dunni* ya que poseen índices de equidad más altos (0.55-0.70 y 0.70±0.31 respectivamente) que en *L. dunni* (0.38±0.33), esto da como resultado que la diversidad de helmintos en *L. megapoda* y *L. vaillanti* sea más alta (0.70-0.82 y 1±0.55 respectivamente) que en *L. dunni* (0.5±0.43) (Paredes-Calderón *et al.*, 2004; García-Altamirano *et al.*, 1993).

Nuestros datos de infracomunidades tienen un mayor parecido en cuanto a riqueza, abundancia y diversidad, a los datos registrados para ranas norteamericanas y canadienses analizadas en Paredes-Calderón *et al.*, (2004). Esto no soporta la hipótesis de que las comunidades de parásitos son más diversas en los trópicos. Esto puede deberse como lo sugiere Jimenez Ruiz *et al.*, (2002) a que las localidades de la mesa central de México se encuentran extremadamente contaminadas, lo que podría causar una disminución en la población de los hospederos intermediarios o incluso la extinción local de algunos de ellos.

En cuanto a la similitud cualitativa y cuantitativa, las localidades de Atotonilco y Chapala fueron las más parecidas entre si, con un valor promedio de 0.416 para el porcentaje de similitud y con 0.68 para el coeficiente de Sorensen.

No obstante, los valores obtenidos para todos los pares comparados están reflejando la heterogeneidad en cuanto a composición y abundancia en la helmintofauna de *L. megapoda*, lo que probablemente sea un reflejo de la variedad de las condiciones ambientales de los sitios en los que realizamos los muestreos; a su vez, dichas condiciones podrían estar creando condiciones de disponibilidad diferencial de hospederos intermediarios y/o definitivos en las distintas áreas.

Sin embargo, es muy apresurado sacar conclusiones, debido a que nuestro estudio presentó mucha heterogeneidad en cuanto al número de infracomunidades estudiadas en cada localidad, y dos de ellas no queda claro que se haya tenido una muestra representativa de la helmintofauna, de acuerdo a la forma de la curva de acumulación de especies.

SECCIÓN II. UBICACIÓN FILOGENÉTICA DE *LITHOBATES MEGAPODA*

9 ANTECEDENTES

9.1 La controversia del género *Lithobates*

Lithobates fue considerado un subgénero de *Rana* (Dubois, 1992), posteriormente, Hillis y Wilcox (2005) consideraron a *Rana* como género y reportaron el primer análisis filogenético exhaustivo del género con secuencias de ADN, en el cual se reconocieron dos grandes grupos. Uno de estos grupos, Laurasirana, que incluye a *R. aurora*, *R. boylli*, *R. cascadae*, *R. lutreiventris*, *R. muscosa* y *R. pretiosa*, todas ellas habitan en la costa oeste de Estados Unidos de Norte América, y *R. temporaria* como representante europea. El otro grupo, Novirana que incluye exclusivamente a especies del Nuevo Mundo distribuidas desde Alaska y el sur de Canadá a través de Estados Unidos, México, toda América Central hasta el noroeste de Perú (en la parte oeste de los Andes), el este de Brasil y el norte de Bolivia (hacia la región este de los Andes), con una concentración mayor de especies en el sur de Estados Unidos y México. También proporcionan nuevos nombres para otros taxa monofiléticos, entre ellos nombran como *Lithobates* al anteriormente llamado grupo de *R. palmipes*.

Frost *et al.* (2006), con base en análisis filogenéticos de secuencias de ADN colocaron a *Lithobates* Fitzinger 1843 a nivel de género, considerando a la ausencia de un tubérculo metatarsiano exterior como carácter sinapomórfico del grupo. Dicho género está formado por 49 especies, todas ellas distribuidas exclusivamente en el continente Americano y es el equivalente a lo que Hillis y Wilcox (2005) denominaron Novirana. Estos autores consideran que los nuevos nombres que Hillis y Wilcox (2005) proponen para diferentes clados dentro de *Lithobates* no están asociados con características orgánsmicas que soporten la delimitación entre ellos por lo que los consideran *nomina nuda*.

Dubois (2007) también criticó aspectos de la nomenclatura propuesta por Hillis y Wilcox (2005) y consideró que muchos de estos nombres son *nomina nuda*, por ser aplicados fuera de las normas de Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). Hillis (2007) responde a esta crítica argumentando la validez de los nombres que utiliza para los grupos y que son consistentes con lo establecido por el ICZN, aunque admite que su trabajo del 2005 es una fusión entre las reglas de éste código y

el phylocode. También menciona que Darrell Frost en una comunicación personal con él le informa que sus taxones no son inválidos como lo había señalado en Frost *et al.*, (2006). Dubois (2007b) de nuevo responde y acepta que cuatro de los siete nuevos nombres propuestos por Hillis y Wilcox (2005) pueden ser considerados como válidos pero que tres de ellos continúan siendo *nomina nuda* de acuerdo al ICZN (e. i. Laurasiarana, Novirana y Stertirana), y refiere que para evitar confusiones es necesario que las revistas científicas impongan el uso de diferentes sistemas nomeclaturales siguiendo diferentes sistemas como el ICZN y el *Phylocode*.

En el 2008 se publicó la sexta edición de Scientific and Standar English Names of Amphibians and Reptiles of North America con Brian Crother como presidente, donde se sigue la propuesta de Frost *et al.*, (2006) de considerar a *Lithobates* como género. Pauly *et al.*, (2009) responden ante tal decisión e insisten en que la nomenclatura de Hillis y Wilcox (2005) es correcta y consistente con el Código de Nomenclatura Zoológica y que el nombre de *Lithobates* debe quedar restringido al grupo de *Lithobates palmipes*, argumentando principalmente la importancia de mantener la estabilidad taxonómica de este grupo. Esto no fue aceptado Frost *et al.*, (2009) y en la séptima edición de Scientific and Estándar English Names of Amphibias of North America (2012) de nuevo se discute este tema y se menciona que la propuesta de Frost *et al.*, (2006) es la más aceptada por la comunidad herpetológica internacional que se dedica al estudio de la relaciones de ránidos a gran escala (Crother, 2012).

Actualmente no existe un consenso entre la comunidad herpetológica internacional acerca de cuál nomenclatura seguir, ya que por ejemplo Che *et al.*, (2007), en un extenso estudio de ránidos reconoce a *Lithobates* como género y *Rana* como su grupo hermano. Wiens *et al.* (2009) corroboran la monofilia de *Lithobates* pero no utiliza esta nomenclatura.

Tal es la controversia, que Amphibia web recomienda que se trate a *Lithobates* como un subgénero de *Rana* y que los nombres se escriban como *Rana (Lithobates)* sp. (e.g. *Rana (Lithobates) megapoda*) y de esta manera se preserve la máxima cantidad de información filogenética y al mismo tiempo se conserve la taxonomía antigua (Amphibia Web).

Toda la controversia generada a partir del trabajo de Hillis y Wilcox (2005) es de origen nomenclatural, ya que la hipótesis filogenética presentada en dicho trabajo es virtualmente idéntica con la presentada por Frost *et al.*, (2006) y también ha sido

aceptada por Dubois al realizar sus comentantarios taxonómicos. Es por ello que para fines comparativos en cuanto a la hipótesis filogenética presentada por Hillis y Wilcox (2005) y la obtenida en el presente estudio, se utilizarán todos los nombres propuestos por dichos autores, pero se tratará a *Lithobates* Fitzinger 1843 como un género válido puesto que es que reconoce el Committee on Standar English and Scientific Names.

9.2 *Lithobates megapoda* en el contexto de la filogenia de *Lithobates* spp.

Las relaciones filogenéticas de *L. megapoda* con el resto de las ranas verdaderas del nuevo mundo no son claras, puesto que en la filogenia publicada por Hillis *et al.* (1983), basada en aloenzimas, se utilizó un ejemplar colectado en Rodeo, San Luis Potosí. Posteriormente, Webb (1996) pone en duda la correcta identificación de dicho ejemplar y llega a la conclusión que se trata de *Rana montezumae*. Sin embargo, un estudio filogenético más reciente basado en secuencias de ADN mitocondrial realizado por Hillis y Wilcox (2005), muestra que dicho ejemplar (denominado como especie 2) pertenece a una especie aún no descrita, que está relacionada más estrechamente con *R. chiricahuensis* que con *R. montezumae*.

El estudio de Hillis y Wilcox (2005), incluye a la mayoría de los taxones conocidos (~60), a excepción de *L. megapoda* y otras cuatro especies. A pesar de ello, éstos autores infieren que dicha especie formaría parte del grupo Lacusirana junto con *Rana dunni*, *Rana subaquavocalis*, *Rana lemosespinali* y la especie 2 aún no descrita. Este grupo, a su vez, forma parte de un grupo más grande llamado Pantherana (denominado complejo de *Rana pipiens* por Hillis *et al.*, 1983).

9.3 Características de *Lithobates megapoda*

Taxonomía

Mocquard 1899 describió una especie a partir de un solo ejemplar recién metamorfoseado colectado en Guadalajara, Jalisco y la nombró *Rana trilobata* (Ver Webb, 1991). Posteriormente, Hillis (1983) sinonimiza a esta especie con *R. sinaloae* (= *Lithobates pustulosus* en la literatura reciente) pero no proporciona detalles sobre el holotipo de *R. trilobata*, ni las características que distinguirían a esta especie del resto.

Es por ello que Webb (1991) realizó un estudio taxonómico morfológico del holotipo de *R. trilobata* y al compararlo con otros ránidos llega a conclusión que dicha especie es en realidad sinónimo *Senior* de *R. megapoda*, descrita por Taylor (1942) cuya localidad tipo es una zona cercana a Chapala, Jalisco. Sin embargo, un año más tarde Webb (1992) propone que el nombre de *R. megapoda* se considere como el nombre válido y se suprima el de *R. trilobata*, dicho cambio fue aceptado por el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN por sus siglas en inglés) en 1994 (Webb, 1996).

Por otra parte, Frost *et al.* (2006) resucitaron a *Lithobates* Fitzinger 1843 como género, el cual incluye a todas las especies del continente americano consideradas anteriormente como género *Rana*, a excepción del grupo Laurasirana de Hillis y Wilcox (2005). Por ello, actualmente se conoce a esta especie como *L. megapoda*.

Características morfológicas

Webb (1996) hizo un estudio morfológico de todo el material disponible de *L. megapoda*, con el fin de observar la variabilidad morfológica, distribución, así como, identificar aquellas características que distinguen a esta especie de otros ránidos alopátricos o simpátricos. Como resultado de este estudio, *L. megapoda* puede identificarse por la combinación de los siguientes caracteres: (1) las patas anteriores carecen de tubérculos palmares y en algunas ocasiones de tenares también, (2) los dígitos de las patas anteriores tercero y cuarto carecen de tubérculos distales subarticulares, (3) tubérculo subarticular basal del cuarto dígito de las patas posteriores ausente o muy pequeño (en comparación con tubérculos de otros dígitos), (4) dígitos largos y delgados, con el extremo cónico o en punta, y (5) tímpano relativamente distante del ojo (la distancia es mas de 1.5 el diámetro del tímpano e incrementa con el tamaño de la rana).

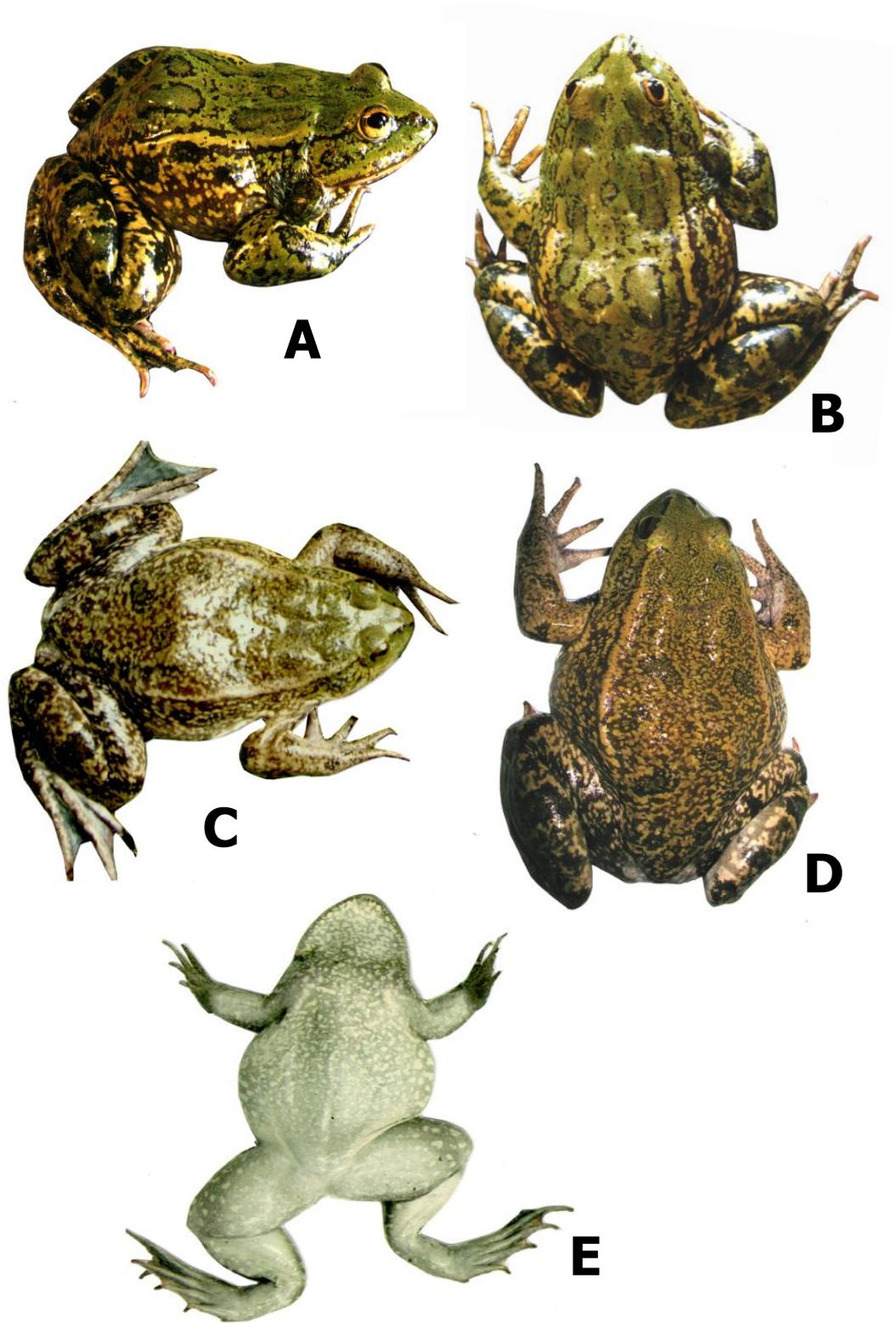


Figura 34. Especímenes de *L. megapoda* utilizadas en el presente estudio. A y B, vista lateral y dorsal respectivamente de un macho del Lago de Chapala, Ocotlán; C, D y E, vista lateral, dorsal y ventral respectivamente de una hembra del Lago de Atotonilco, Villa Corona. Fotografías por MGVA.

10 METODOLOGÍA

10.1 Análisis genético de *Lithobates megapoda* de las localidades estudiadas

Especímenes estudiados

Se utilizaron tejidos de cinco especímenes de *L. megapoda* de cada una de las localidades estudiadas, con el fin de realizar un análisis de distancias genéticas y verificar que todos los hospederos que se utilizaron en el presente estudio pertenecieran a la misma especie (Figura 34, Tabla 13).

Cabe señalar que el poblado de Ocotlán, Jalisco se encuentra relativamente cerca del municipio de Chapala (60 km aproximadamente), la localidad tipo de *L. megapoda*. Además en su extenso estudio morfológico de *L. megapoda*, Webb (1996) incluyó también especímenes de esta localidad, concluyendo que se trata de dicha especie.

De cada individuo se recolectó un fragmento de hígado, se colocó en alcohol etílico absoluto y se reservó a -20°C hasta su utilización para la extracción de ADN.

Tabla 13. Muestras de *L. megapoda* caracterizadas molecularmente.

Número	Localidad	Número de recolecta
1	Lago Cajititlán (San Juan Bautista)	3458-03
2	Lago Cajititlán (Cajititlán)	3480-00
3	Lago Cajititlán (Cajititlán)	3481-01
4	Lago Cajititlán (Cajititlán)	3482-01
5	Lago Cajititlán (Cajititlán)	3483-01
6	Lago Chapala (Tizapán)	3460-01
7	Lago Chapala (Ocotlán)	3476-00
8	Lago Chapala (Ocotlán)	3477-00
9	Lago Chapala (Ocotlán)	3479-01
10	Lago Chapala (Ocotlán)	3487-01
11	Lago Atotonilco	3464-01
12	Lago Atotonilco	3465-01
13	Lago Atotonilco	3468-01
14	Lago Atotonilco	3474-01
15	Lago Atotonilco	3475-01

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

Se extrajo el ADN total a partir de aproximadamente 20 mg de hígado utilizando el kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) y se resuspendió en 250 μ L de H₂O destilada.

Se amplificó por PCR aproximadamente 2 kb de ADN mitocondrial que incluye una región parcial del gen 12S ARNr, el gen que codifica para el ARNval de transferencia para la valina y una región parcial de 16S ARNr. Dicha región fue obtenida en tres partes, con tres pares de oligonucleótidos (i.e. 12L1 y 16SH; 12SM y 16SA; 16SC y 16SD) (Tabla 14).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes concentraciones finales: Buffer 1 X, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 0.625 U de Amplificasa (5 U/ μ L), 0.5-3 μ L de ADN, MgCl₂ 2 mM y H₂O destilada hasta completar un volumen final de 25 μ L. Los ciclos térmicos consistieron en: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 48 \pm 3°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min.

Los amplificados se observaron en geles de agarosa al 1%. Se secuenciaron bidireccionalmente de acuerdo al protocolo de BigDye 3.1 Terminator, de Applied Biosystems, con el siguiente programa: 96°C por 3 min, 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min y una extensión final de 60°C por 4 min.

La secuenciación se realizó con un secuenciador automático ABI Prism 310 de Applied Biosystems en el Instituto de Biología de la UNAM.

Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio para amplificar la región 12S ARNr, el gen ARNt-Val y una región parcial de 16S ARNr mitocondriales.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Fuente
12L1	AAAAAGCTTCAAACGGGATTAGATACCCCACTAT	Goebel <i>et al.</i> , 1999
16SH	GCTAGACCATKATGCAAAAGGTA	Goebel <i>et al.</i> , 1999
12SM	GGCAAGTCGTAACATGGTAAG	Darst y Cannatella, 2004
16SA	ATGTTTTTGGTAAACAGGCG	Goebel <i>et al.</i> , 1999
16SC	GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC	Darst y Cannatella, 2004
16H1	CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGG	Goebel <i>et al.</i> , 1999

Edición y ensamblaje de secuencias

Los electroferogramas se editaron en el programa Geneious 7.0.3 (Biomatters), se les cortaron los extremos hasta el punto donde la señal fuera clara, luego se comparó la dirección sentido con la dirección antisentido de cada fragmento. A los sitios ambiguos se le asignó el nucleótido cuya señal fuese más clara en alguno de los electroferogramas.

Posteriormente en el mismo programa se sobrelaparon los tres fragmentos para formar una secuencia continua de aproximadamente 2,000 pb correspondiente a la región del 12S ARNr al 16S ARNr incluyendo el ARNt para la valina.

Alineamiento

Las 15 secuencias de *L. megapoda* del presente estudio, al igual que *L. dumni* y *Lithobates* sp. 2 (Hillis y Wilcox, 2005) fueron alineadas en Clustal W2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larking *et al.*, 2007) con los parámetros *default*. Se utilizó a *L. dumni* como grupo externo. *Lithobates* sp. 2 se incluyó en el alineamiento debido a la confusión que hubo con *L. megapoda* en literatura previa (Hillis *et al.*, 1983) (ver Antecedentes).

Análisis de distancias genéticas por Neighbor joining

El análisis de distancias genéticas se realizó por el método de Neighbor joining (NJ) usando el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) implementado en MEGA versión 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011).

Análisis por Inferencia Bayesiana

El análisis de inferencia bayesiana se llevó a cabo en el programa Mr. Bayes v3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Se utilizaron cuatro cadenas MCMC, árbol inicial generado al azar, distribución uniforme de los parámetros, y el modelo evolutivo apropiado (GTR+I+ Γ) fue determinado por jModeltest versión 2.1 (Posada, 2008). Las cadenas se corrieron por 1,500,000 de generaciones, con una frecuencia de muestreo de árboles cada 1,000 generaciones. La estabilización se determinó cuando la varianza alcanzó un valor inferior a 0.01. Se eliminó el primer 25% de los árboles muestreados (*burnin*) esto de acuerdo a los resultados obtenidos en el programa

Tracer v1.5 (Rambaut *et al.*, 2013), y el resto de los arboles se emplearon para la estimación de las probabilidades posteriores.

Red de haplotipos

El análisis de las genealogías se realizó mediante la construcción de una red de haplotipos utilizando el programa TCS 1.21 (Phylogenetic network estimation using statistical parsimony) (Clement *et al.*, 2000) a partir de un alineamiento de secuencias en formato nexus con 15 individuos de *L. megapoda* de las tres localidades estudiadas (Tabla 13) y un individuo de *Lithobates* sp. 2 de la localidad del Rodeo San Luis Potosí (Hillis y Wilcox, 2005). Se utilizó un límite de conexión del 95% y los gaps fueron tratados como un quinto estado de carácter.

10.2 Análisis filogenético de las especies del género *Lithobates*

Secuencias utilizadas

Para estudiar las afinidades filogenéticas de *L. megapoda* con respecto al resto de las ranas verdaderas del Nuevo Mundo, se utilizaron las secuencias 12S ARNr al 16S ARNr incluyendo el ARNt para la valina publicadas por Hillis y Wilcox (2005), las cuales se obtuvieron de GenBank de acuerdo a su número de acceso (Tabla 15).

Además, también se obtuvieron de GenBank secuencias de especies del género *Lithobates* no incluidas en el trabajo de Hillis y Wilcox (2005). *L. brownorum* era considerada como una subespecie de *L. berlandieri*, pero un estudio de Zaldívar-Riverón *et al.* (2004) revela que es una especie independiente. *Lithobates* sp. Arcelia, *Lithobates* sp. Colima y *Lithobates* sp. Papagayo fueron identificadas como especies nuevas por Hillis *et al.*, (1983) mediante un análisis de proteínas, posteriormente Zaldívar-Riverón *et al.* (2004) recolectaron ejemplares y secuenciaron ADN de dichas "formas" y confirmaron que se trata de especies nuevas. *L. fisheri* está considerada extinta y en el 2011 se hizo la secuenciación de un ejemplar de museo (Hekkala *et al.*, 2011). Por último *Lithobates* n. sp. de NY es una especie recientemente descrita con base en secuencias de ADN (Newman *et al.*, 2012) (Tabla 16).

Lithobates megapoda fue representada con un espécimen del Lago de Chapala en la localidad de Ocotlán, Jalisco con número de recolecta 3476-00. Dicha localidad

se encuentra a aproximadamente 60 km de distancia de Chapala, Jalisco que es la localidad tipo.

Se agregaron también seis especies del género *Rana* que habitan en el continente americano (*R. aurora*, *R. boylii*, *R. cascadae*, *R. lutreiventris*, *R. muscosa* y *R. pretiosa*) y como grupo externo se utilizó a *Rana temporaria*, de Suiza.

Las siguientes especies del género no pudieron ser incluidas en el análisis: *L. pueblae* no ha sido observada desde su primera recolecta hace ya casi 50 años, por lo que probablemente está extinta, y tampoco se tiene información molecular de ella (Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004b). *L. lemosespinali* es una especie recientemente descrita, y sólo se ha observado en dos localidades de la Sierra Madre Oriental y no se cuenta con secuencias de ADN (Smith y Chiszar, 2003). *L. miadis* es una especie endémica de la Isla Grande del Maíz, Nicaragua y se considera una especie muy amenazada pues se estima que sólo existen unos 100 individuos (Martínez-Sánchez *et al.*, 2001). *L. johni* es una especie en peligro de extinción, endémica de la Sierra Madre Oriental en México y posee escasos registros (Campos-Rodríguez *et al.*, 2012). *L. chichicuahutla* se conoce sólo el registro de un lago en un cráter de Puebla (Hillis y Wilcox, 2005).

Tabla 15. Relación de las secuencias del 12S ARNr-ARNt val-16S ARNr publicadas en Hillis y Wilcox (2005), utilizadas en el presente trabajo

Especies	Localidad	No. Genbank
<i>Rana aurora</i>	EUA: California: Del Norte	AY779196
<i>Rana boylii</i>	EUA: California: Lake: junto a Butts Creek	AY779192
<i>Rana cascadae</i>	EUA: California: Shasta: Prados Dersch	AY779197
<i>Rana luteiventris</i>	EUA: Washington: Pend Oreille: Parque Nacional Colville	AY779193
<i>Rana muscosa</i>	EUA: California: Mono: Prados debajo de Lago Levitt	AY779195
<i>Rana temporaria</i>	Suiza: Valais Canton	AY779191
<i>Lithobates</i> especie 1	Ecuador: Provincia Esmeraldas	AY779213
<i>Lithobates</i> especie 2	México: San Luis Potosí: El Rodeo	AY779224
<i>Lithobates</i> especie 3	México: Michoacán	AY779250
<i>Lithobates</i> especie 4	Panamá: Chiriquí	AY779245
<i>Lithobates</i> especie 5	Costa Rica: Heredia: Monte de la Cruz	AY779246
<i>Lithobates</i> especie 6	Costa Rica: Puntarenas	AY779247
<i>Lithobates</i> especie 7	México: Jalisco: Contla	AY779241
<i>Lithobates</i> especie 8	México: Puebla: Río Atoyac	AY779248
<i>Lithobates areolatus</i>	EUA: Kansas: Lyon	AY779229
<i>Lithobates berlandieri</i>	EUA: Texas: Hays: San Marcos	AY779235
<i>Lithobates blairi</i>	EUA: Kansas: Douglas: Lawrence	AY779237

<i>Lithobates bwana</i>	Ecuador: Provincia Loja: Río Alamor	AY779212
<i>Lithobates capito</i>	EUA: Florida: Marion: Estación Biológica Archbold	779231AY
<i>Lithobates catesbeianus</i>	EUA: Kansas: Douglas: Lawrence	AY779206
<i>Lithobates chiricahuensis</i>	México: Durango: Río Chico	AY779225
<i>Lithobates clamitans</i>	EUA: Missouri: Montgomery	AY779204
<i>Lithobates dunni</i>	México: Michoacán: Tzintzuntzan: Lago de Pátzcuaro	AY779222
<i>Lithobates forreri</i>	México: Sinaloa: Escuinapa	AY779233
<i>Lithobates grylio</i>	EUA: Florida: León: Estación Biológica Tall Timbers	AY779201
<i>Lithobates heckscheri</i>	EUA: Florida: Gadsen-León	AY779205
<i>Lithobates juliani</i>	Belice: Distrito de Cayo: Little Vaqueros Creek	AY779215
<i>Lithobates macroglossa</i>	Guatemala: Sololá: Panaiachel Lake Atitlan	AY779243
<i>Lithobates maculatus</i>	México: Oaxaca: Colonia Rodolfo Figueroa	AY779207
<i>Lithobates magnaocularis</i>	México: Sonora: Arroyo Hondo	AY779239
<i>Lithobates montezumae</i>	México: Morelos: Lagunas Zempoala	AY779223
<i>Lithobates neovolcanicus</i>	México: Michoacán: Zumbueno	AY779236
<i>Lithobates okaloosae</i>	EUA: Florida: Santa Rosa	AY779203
<i>Lithobates omiltemanus</i>	México: Guerrero: Agua de Obispo	AY779238
<i>Lithobates onca</i>	EUA: Nevada: Clark: Blue Point Spring	AY779249
<i>Lithobates palmipes</i>	Venezuela: Provincia Amazonas: Río Mawarinuma	AY779210
<i>Lithobates palustris</i>	EUA: Indiana: Washington	AY779228
<i>Lithobates pipiens</i>	EUA: Ohio: Ottawa: Little Portage State Park	AY779221
<i>Lithobates psilonota</i>	México: Jalisco: Tapalpa	AY779217
<i>Lithobates pustulosus</i>	México: Sinaloa: Santa Lucia	AY779220
<i>Lithobates septentrionalis</i>	Canadá: Ontario: Grey	AY779200
<i>Lithobates sevosus</i>	EUA: Mississippi: Harrison	AY779230
<i>Lithobates sierramadrensis</i>	México: Guerrero: Agua de Obispo	AY779216
<i>Lithobates spectabilis</i>	México: Hidalgo: La Estanzuela	AY779232
<i>Lithobates sphenoccephalus</i>	EUA: Kansas: Cherokee	AY779251
<i>Lithobates subaquavocalis</i>	EUA: Arizona: Cochise Ramsey Canyon	AY779227
<i>Lithobates sylvaticus</i>	EUA: Missouri: St. Louis: Tyson Environmental Study Area	AY779199
<i>Lithobates tarahumarae</i>	México: Sonora: Yecora	AY779218
<i>Lithobates taylori</i>	Nicaragua: Zelaya: Rama	AY779244
<i>Lithobates tlaloci</i>	México: Distrito Federal: Xochimilco	AY779234
<i>Lithobates vaillanti</i>	México: Oaxaca: Tapanatepec	AY779214
<i>Lithobates vibicarius</i>	Costa Rica: Provincia de San José: El Empalme	AY779208
<i>Lithobates virgatipes</i>	EUA: New Jersey: Burlington Co.	AY779202
<i>Lithobates warszewitschii</i>	Panamá	AY779209
<i>Lithobates yavapaiensis</i>	EUA: Arizona: Greenlee: Apache National Forest	AY779240
<i>Lithobates zweifeli</i>	México: Oaxaca: Cuyotepej	AY779219

Nota: Las localidades presentadas en esta tabla han sido abreviadas, para mayor información consultar Hillis y Wilcox (2005).

Tabla 16. Relación de las secuencias obtenidas en GenBank no incluidas en Hillis y Wilcox (2005).

Especie	Localidad	No. Genbank
<i>Lithobates brownorum</i>	La Gringa, Santa María Chimalapa, Oaxaca, México	AY115116
<i>Lithobates fisheri</i>	Las Vegas, Nevada (Lincoln Country), USA	JF824078
<i>Lithobates</i> n. sp. de NY	Staten Island, Richmond, New York, USA	JN227375
<i>Lithobates</i> sp. Aguaje	Sierra El Aguaje, Sonora, México	EU728669
<i>Lithobates</i> sp. Arcelia	20 Km E Arcelia, Guerrero, México	AY115109
<i>Lithobates</i> sp. Colima	Coquimatlán, Colima, México	AY115136
<i>Lithobates</i> sp. Papagayo	1 Km SO Plan de Lima, Río Papagayo, Guerrero, México	AY115134

Alineamiento de secuencias

Las secuencias correspondientes a la región del 12S ARNr al 16S ARNr incluyendo el ARNt para la valina se alinearon empleando Clustal W2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larking *et al.*, 2007) con los parámetros *default* y posteriormente se realizaron ajustes manualmente. Se utilizaron los modelos de estructura secundaria de las secuencias de *L. magnaocularis*, *L. megapoda*, *L. warszewitschii* y *L. cascadae* con el programa en línea CARNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/CARNA/Input.jsp>) (Sorescu *et al.*, 2012) para tomar decisiones acerca de las regiones ambiguas. Las regiones del alineamiento en las cuales la homología no pudo inferirse se excluyeron del análisis.

Máxima Parsimonia

Se realizó un análisis de Maxima Parsimonia con el mismo regimen de pesos con el uso de PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2001), con una búsqueda heurística, considerando los estados de carácter como no ordenados, *gaps* tratados como datos faltantes. El soporte de los clados fué evaluado con 10,000 réplicas de bootstrap, y se obtuvo el árbol de consenso estricto.

Máxima verosimilitud

Este análisis se llevó a cabo en RaxML ver 7.0.3 (Stamatakis, 2006) con tres particiones, una para cada uno de los genes estudiados 12S rRNA, tRNA val y 16S rRNA, tomando como base para las particiones la secuencia de *Rana pipiens* (No.

acceso Genbank Y10945.1), bajo el modelo GTR+I+ Γ . Se realizaron 1,000 réplicas de bootstrap, con un árbol generado mediante el método de parsimonia como árbol inicial y un número de semilla aleatorio.

Inferencia Bayesiana

El análisis de inferencia bayesiana se llevó a cabo en el programa Mr. Bayes v3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Se utilizaron tres particiones, correspondientes a 12S rRNA, tRNA val y 16S rRNA (como en el análisis de ML). Para todas la particiones se utilizó el modelo GTR+I+ Γ , el cual fue determinado con el programa jModeltest versión 2.1 (Posada, 2008). Se utilizaron 4 cadenas MCMC, árbol inicial al azar, previos *default* independientes para cada partición, 8,500,000 generaciones, una frecuencia de muestreo de cada 1,000 generaciones. La estabilización se determinó cuando se alcanzó una varianza inferior a 0.01. Por último el primer 25% de los árboles muestreados (burnin) se eliminó, es decir 2,125 arboles, esto de acuerdo a los resultados obtenidos en el programa Tracer v1.5 (Rambaut *et al.*, 2013).

11 RESULTADOS

11.1 Análisis genético de *Lithobates megapoda*

El análisis genético de *Lithobates megapoda* se realizó con un total de 15 individuos, cinco de cada una de las localidades estudiadas (Lago de Atotonilco, Lago de Cajititlán y Lago de Chapala). La longitud total del fragmento amplificado (12S rRNA-tRNAval-16S rRNA) después de la edición varió de 1,909 a 1,962 pb entre todos los individuos examinados.

El análisis de haplotipos tipo TCS revela la presencia de cinco haplotipos con diferencias entre sí de sólo una sustitución. El primero y más abundante se encontró en diez individuos provenientes de los tres lagos (cuatro del lago de Atotonilco, cuatro del lago de Cajititlán y dos de Chapala), el segundo en un individuo del lago de Chapala, el tercero en el lago de Cajititlán en un individuo, el cuarto en Chapala con dos individuos y el quinto se encontró en un individuo de Atotonilco. En este análisis también se puede observar que el haplotipo de *Lithobates* sp. 2 proveniente de la localidad del Rodeo en San Luis Potosí difiere de los de *L. megapoda* con 18 sustituciones (Figura 35).

Para los análisis genéticos mediante *Neighbor joinin* e inferencia bayesiana se utilizaron los 15 individuos de *L. megapoda*, la secuencia de *Lithobates* sp. 2 y *Lithobates dumni* como grupo externo. Para ambos análisis se obtuvo la misma topología, esto es, *L. megapoda* de todas las localidades forman parte de un solo agrupamiento, mientras que *Lithobates* sp. 2 resultó ser su especie hermana y *L. dumni* es el grupo externo (datos no mostrados).

La distancia genética entre individuos de *L. megapoda* fue de 0 a 0.02% y con respecto a *Lithobates* sp. 2, 0.25%, y de 1.21% con respecto al grupo externo. Mientras que el valor de probabilidad posterior que sustenta el nodo de *L. megapoda* en el análisis bayesiano es de 0.88 (datos no mostrados).

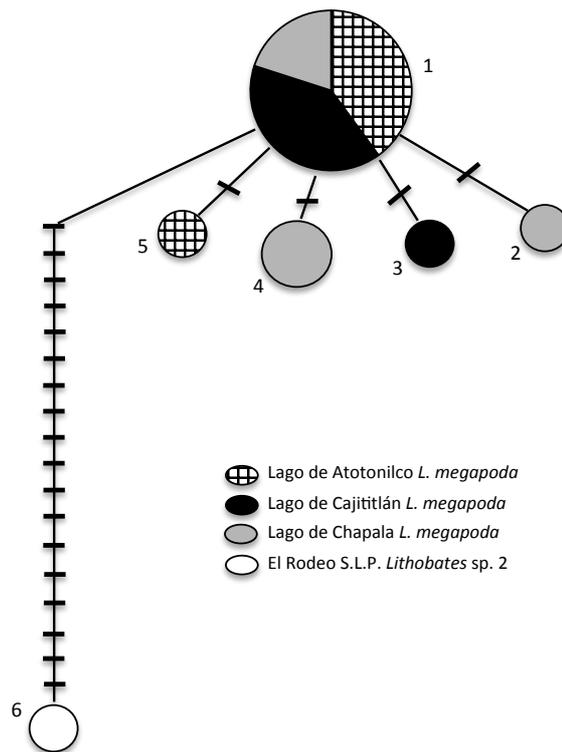


Figura 35. Red mínima de haplotipos generada mediante TCS derivados de secuencias de 12rRNA-tRNAval-16SrRNA. Cada haplotipo se representa con un círculo, cuya área es proporcional a la frecuencia. Sobre las líneas que conectan los haplotipos, los cambios están representados como rayas transversales. El número de cada compartimento es el número de haplotipo y la trama representa la localidad de la que provienen los ejemplares de *L. megapoda* y *Lithobates* sp. 2.

11.2 Análisis filogenético del género *Lithobates*

El análisis de Máxima Parsimonia con los mismos pesos se realizó con un total de 64 OTU (incluyendo el grupo externo), 1,913 pares de bases, de las cuales, 1,046 fueron constantes, 250 fueron variables y considerados no informativos y 617 informativos bajo el criterio de parsimonia.

Se encontraron seis árboles igualmente parsimoniosos con 3,765 pasos, con un índice de consistencia (CI) de 0.3426 e índice de homoplasia (HI) de 0.6574. Los valores de dichos índices excluyendo los caracteres no informativos fue de CI= 0.2906, HI= 0.7094 e índice de retención (RI) = de 0.6504.

Las topologías de los árboles obtenidos por MP (Figura 36), ML (Figura 37) e Inferencia Bayesiana (Figura 38) son idénticas. La mayoría de los agrupamientos

obtenidos por estos tres métodos están fuertemente apoyados por los valores de bootstrap y de probabilidad posterior.

Todas la topologías logran recuperar todos los grupos que Hillis y Wilcox (2005) proponen en su publicación, con la única excepción de *L. palmipes* que según estos autores debería de pertenecer al grupo *Lithobates* pero en ninguno de los análisis aparece en dicho grupo.

Con respecto a los nuevos taxones incluidos en este análisis, las secuencias de *Lithobates* sp. Arcelia, *Lithobates* sp. Colima, *Lithobates* sp. Papagayo, *Lithobates* sp. Aguaje y *Lithobates brownorum* se agruparon en *Scurrilirana*. *Lithobates* n. sp de NY quedó incluida en el grupo *Pantherana*, como especie hermana del grupo *Nenirana*. Por último *L. fisheri* se agrupó en *Lacusirana*.

Lithobates megapoda forma parte de *Lacusirana*, y es la especie hermana de *Lithobates* sp. 2 del Rodeo S.L.P., con la que previamente había sido confundida por Hillis *et al.* (1983).

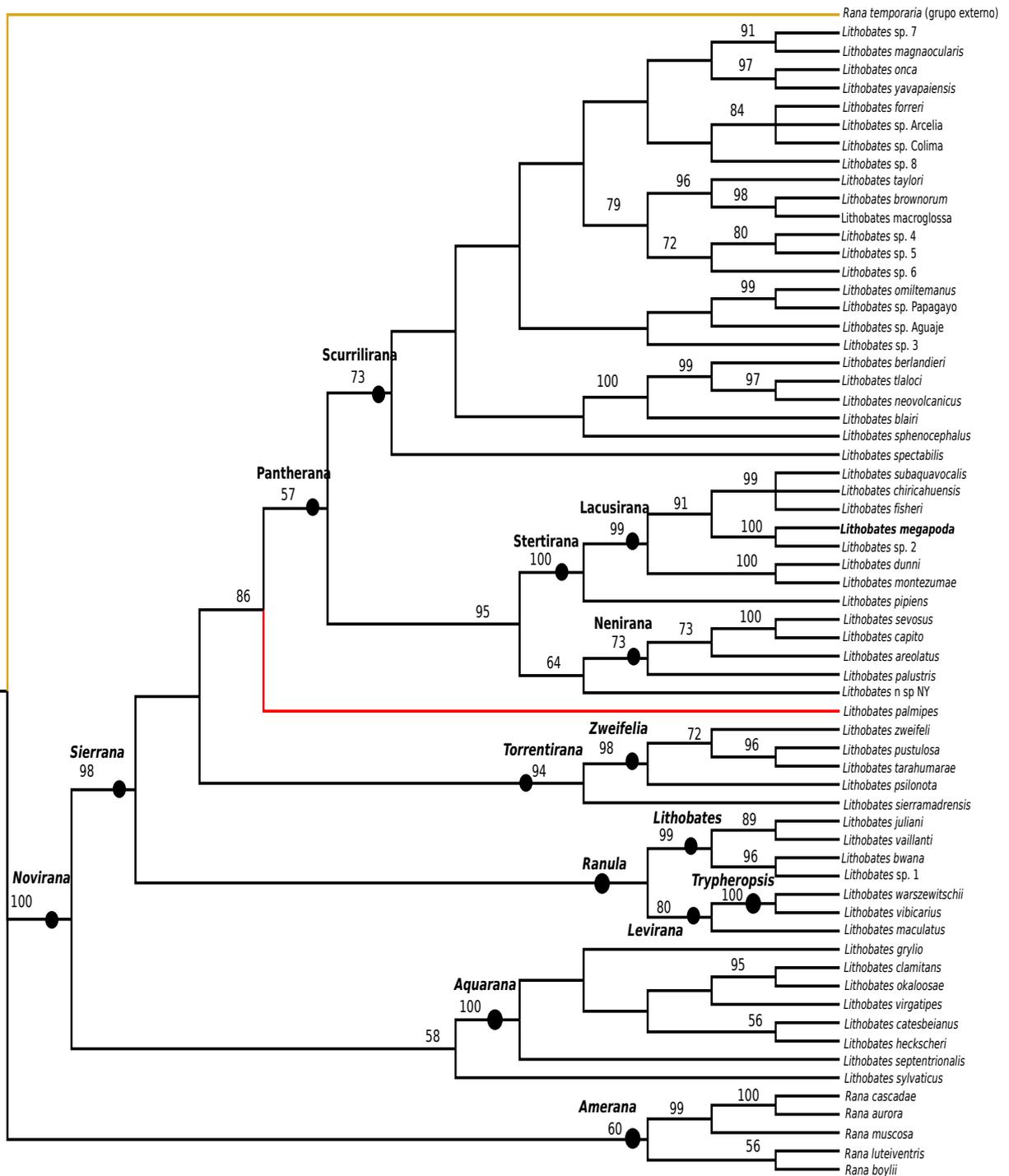


Figura 36. Árbol de consenso estricto obtenido por Máxima Parsimonia de *Lithobates* spp. En amarillo se muestra el grupo externo y en rojo un taxón que no coincide con la hipótesis de Hillis y Wilcox (2005). Los valores de bootstrap se muestran sobre los nodos.



Figura 37. Árbol filogenético basado en Máxima verosimilitud de *Lithobates* spp. En amarillo se muestra el grupo externo y en rojo un taxón que no coincide con la hipótesis de Hillis y Wilcox (2005). Los valores de bootstrap >50% se muestran a un lado de los nodos. La escala indica divergencia.

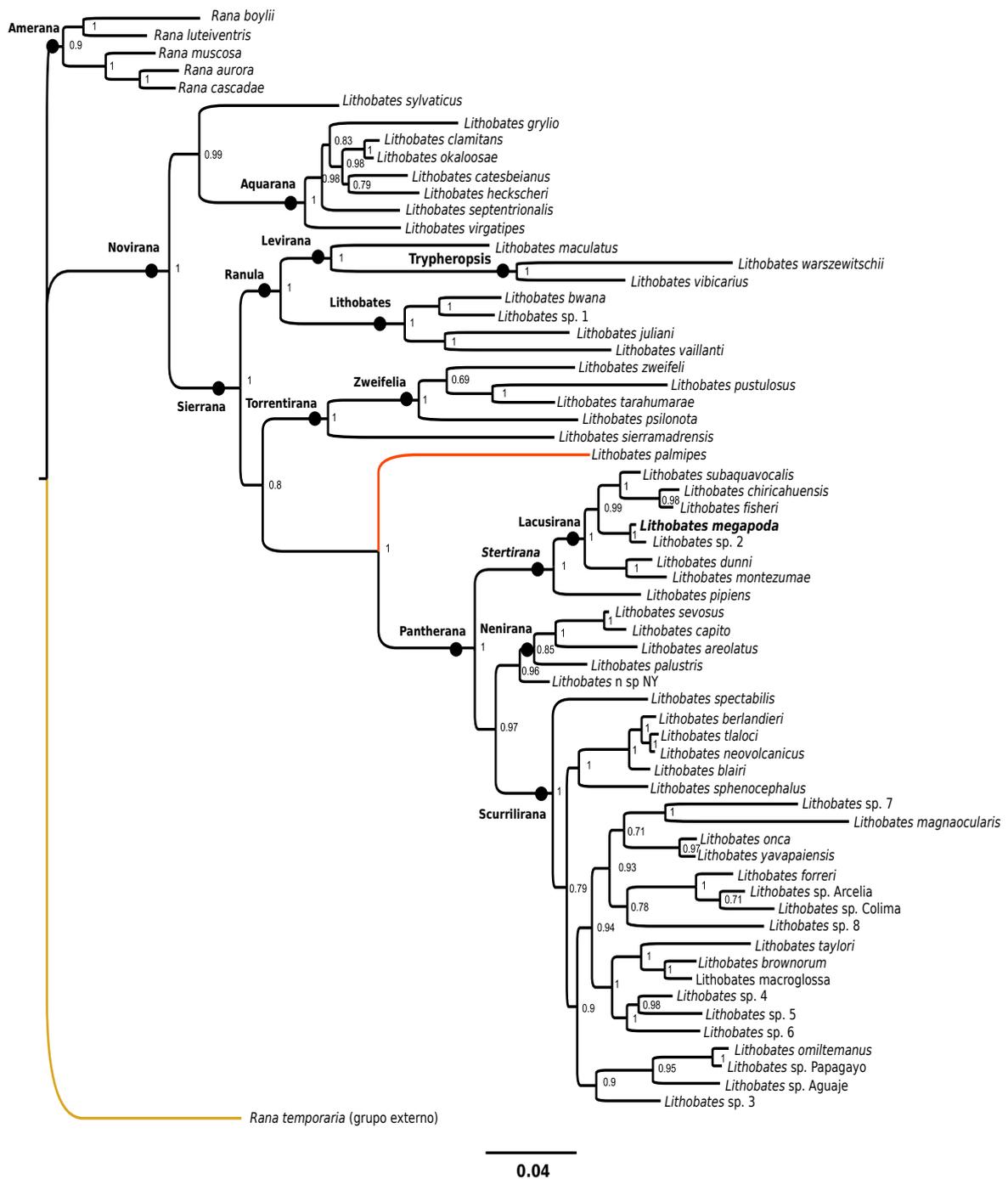


Figura 38. Árbol filogenético basado en Inferencia bayesiana de *Lithobates* spp. En amarillo se muestra el grupo externo y en rojo un taxón que no coincide con la hipótesis de Hillis y Wilcox (2005). Los valores de probabilidad posterior se muestran sobre los nodos. La escala indica divergencia.

12 DISCUSIÓN

Análisis genético de *L. megapoda*

En un estudio filogenético del complejo de *Lithobates pipiens* basado en aloenzimas Hillis *et al.* (1983) incluyen a un espécimen identificado como *L. megapoda* recolectado en el Rodeo S.L.P. La identidad de esta especie fue puesta en duda por Webb (1996) y la asigna a *L. montezumae*, luego Hillis y Wilcox (2005) al realizar un análisis filogenético de las ranas del nuevo mundo con secuencias mitocondriales aceptan que ese ejemplar no corresponde a *L. megapoda* pero la colocan como una especie nueva aún no descrita y le llamaron *Lithobates* sp. 2, aunque dichos autores no mencionan los motivos por los cuales determinaron que esa especie es distinta a *L. megapoda*, dado que en su análisis no incluyen secuencias de esta especie.

En el presente estudio se examinaron genéticamente especímenes de *L. megapoda* provenientes de tres localidades del estado de Jalisco (Lagos de Atotonilco, Cajititlán y Chapala) con el fin de corroborar su identidad y de explorar su relación con respecto a la especie *Lithobates* sp. 2 de Hillis y Wilcox (2005).

Los análisis de variación de ADNmt indican que los especímenes recolectados en todas las localidades pertenecen a una sola especie, y se asignaron a *L. megapoda*, debido a que algunos individuos incluidos en el análisis fueron recolectados en el Lago de Chapala, que es la localidad tipo de la especie; este resultado es consistente con un anterior análisis morfológico realizado por Webb (1996) en el que estudia individuos recolectados en estas mismas localidades, y determina que todos ellos corresponden a *L. megapoda*.

La divergencia genética intraespecífica encontrada en los individuos de *L. megapoda* (0-0.02%) coincide con la registrada para otras especies del género como *Lithobates* n. sp. de NY con 0.04% (Newman *et al.*, 2012), y con *Lithobates* sp. Aguaje en la que se obtuvieron secuencias idénticas de 12 individuos secuenciados (Pfeiler y Markow, 2008).

Nuestros resultados también sugieren que *L. megapoda* es una especie distinta, aunque cercana a *Lithobates* sp. 2, puesto que tanto los análisis de NJ como de inferencia bayesiana muestran a todos los individuos de *L. megapoda* en un sólo agrupamiento con una divergencia genética de 0.25% con respecto a *Lithobates* sp. 2

(datos no mostrados). Sin embargo esta divergencia interespecífica es más baja que la encontrada para otras ranas, por ejemplo *L. brownorum* y *L. berlandieri*, consideradas por algún tiempo de la misma especie, difieren entre sí con 3.3-3.9% (Zaldivar-Riverón *et al.*, 2004), *Lithobates* n. sp. de NY difiere de *L. pipiens* con 12.5%, con lo que fue considerada por Newman *et al.*, 2012 como una nueva especie.

El análisis de haplotipos revela que existe un total de cinco haplotipos en las poblaciones de *L. megapoda*. Uno de ellos (señalado como 1 en la Figura 35) es el más abundante presentándose en diez individuos, se distribuye en todas las localidades y tiene conexión con el resto de los haplotipos, lo que sugiere que podría tratarse de un haplotipo ancestral. El resto de los haplotipos son periféricos al haplotipo más abundante: dos de ellos se encuentran exclusivamente en el lago de Chapala (No. 2 y 4), uno sólo en el lago de Cajititlán (No. 3) y otro más presente solamente en el lago de Atotonilco (No. 5); estos resultados podrían indicar que se trata de haplotipos de reciente evolución (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

El haplotipo de *Lithobates* sp. 2 se diferencia de los haplotipos de *L. megapoda* por 18 sustituciones, lo cual es una diferencia muy significativa si se compara con el estudio de Hekkala *et al.*, (2011) donde los haplotipos encontrados en *L. fisheri* se distinguen de su especie hermana *L. chiricahuensis* con sólo siete sustituciones.

El objetivo del presente estudio no fue realizar delimitación de especies *per se*, pero los resultados obtenidos con los análisis aquí presentados dan la pauta para que se realice un estudio más fino de la población que habita en la localidad del Rodeo en S.L.P. y con respaldo en caracteres morfológicos y más secuencias de ADNmt pueda robustecerse la evidencia de que *L. megapoda* y *Lithobates* sp. 2 son especies independientes.

Análisis filogenético de *Lithobates* spp.

Nuestros resultados apoyan la monofilia del género *Lithobates*, aún con la incorporación de un mayor número de taxa no considerados por Hillis y Wilcox (2005). Asimismo, la topología de nuestros análisis por método de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana recuperan todos los grupos propuestos por estos autores, con la notable excepción de *L. palmipes*, la cual según su propuesta debe pertenecer al grupo *Lithobates*, y en nuestros análisis queda como grupo hermano de *Pantherana*. En el análisis de Parsimonia de Hillis y Wilcox (2005)

L. palmipes también queda fuera del grupo *Ranula* y proponen que probablemente sea un artefacto de su alta divergencia. Se ha propuesto que probablemente *L. palmipes* sea un grupo de varias especies (en Hillis y Wilcox, 2005), por lo que probablemente la secuencia utilizada en ese estudio corresponda a una especie aún no descrita. De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en el presente estudio, es necesario una revisión del ejemplar asignado a esta especie para explorar la posibilidad de una errónea identificación, que sea una especie nueva, o bien verificar que no existan errores relacionados con la secuenciación.

Con respecto a los nuevos taxones incorporados al análisis *Lithobates* sp. Arcelia, *Lithobates* sp. Colima, *Lithobates* sp. Papagayo, *Lithobates* sp. Aguaje y *L. brownorum* se agruparon en *Scurrilirana*, el cual, es un nuevo taxón propuesto por Hillis y Wilcox (2005) y tiene como especie tipo a *L. berlandieri*, y recibe su nombre del latín *Scurrilis*, que significa risa, y *Rana*, en referencia a que sus llamados suenan como risas. Estos resultados se esperaban puesto que *Lithobates* sp. Arcelia, *Lithobates* sp. Colima y *Lithobates* sp. Papagayo fueron detectadas por Hillis *et al.* (1983) por medio de aloenzimas y colocadas en el grupo *berlandieri*; posteriormente Zaldivar-Riverón *et al.*, (2004) confirmaron su identidad como especies por medio de ADN. *Lithobates* sp. de la sierra El Aguaje fue detectada como miembro de *Scurrilirana* por Pfeiler y Markow (2008).

Con la incorporación de estos nuevos taxones al grupo *Scurrilirana* será necesario verificar que el llamado de apareamiento en forma de risa, que es considerado como carácter diagnóstico del grupo, sea compartido por estas especies también, esto a fin de que sea considerado un nombre válido, de lo contrario deberá de considerarse *nomina nuda*, de acuerdo a lo establecido por el Código de Nomenclatura Zoológica (ICZN por sus siglas en inglés) (en Dubois, 2007b).

Para el caso de *L. brownorum* nuestros resultados coinciden con Zaldivar-Riverón *et al.* (2004), en el sentido de que se trata de una especie independiente y no subespecie de *L. berlandieri* como se consideró anteriormente por Hillis *et al.* (1983), puesto que consistentemente en todos los análisis filogenéticos del presente estudio, *L. brownorum* y *L. berlandieri* no parecen estar cercanamente emparentadas, aunque presentan una divergencia genética menor (2.1%) a la que reporta Zaldivar-Riverón *et al.*, (2004) (3.3-3.9%). Esta diferencia en la divergencia genética puede ser atribuible a que *L. berlandieri* de Hillis y Wilcox (2005) es de Texas, EUA, mientras

que las utilizadas en Zaldivar-Riverón *et al.*, (2004) son de Tamaulias y de Nuevo León, México. En este último trabajo *L. brownorum* aparece como especie hermana de *L. neovolanicus*, sin embargo en nuestro estudio aparece como especie hermana de *L. macroglossa* con una divergencia genética de 1%.

Lithobates n. sp de NY quedó incluida en el grupo Pantherana, lo que se conoce como “complejo de *Rana pipiens* o ranas leopardo” por algunos autores, lo cual coincide con Newman *et al.* (2012), quienes detectaron esta especie críptica dentro del grupo, aunque no ha sido formalmente descrita. En nuestros análisis aparece como especie hermana del grupo Nenirana, el cual es un nuevo taxón propuesto por Hillis y Wilcox (2005). Nenirana proveniente del latín *nenia* que significa canto funeral y *rana*, en alusión al llamado lúgubre de estas ranas, y cuya especie tipo es *L. aerolata*. Sin embargo, debido a que Newman *et al.*, (2012) no dan detalles sobre sus llamados, no es posible siquiera hipotetizar si esta especie pudiera ser parte de Nenirana.

Lithobates fisheri también fué incorporada a Lacusirana por Hillis y Wilcox (2005), debio al parecido morfológico que presenta con algunas de estas ranas, y nuestros resultados corroboran esta posición con caracteres moleculares. Esta especie había sido declarada extinta, pero Hekkala *et al.*, (2011) compara secuencias de ADN obtenidas de ejemplares de museo de *L. fisheri* con individuos de *L. chiricahuensis* de varias localidades a lo largo de su distribución, y observan que los individuos cercanos a Mongollon Rim en Arizona corresponden a *L. fisheri*. En este estudio también se observa, al igual que en nuestros resultados, que *L. fisheri* y *L. chiricahuensis* son especies hermanas.

De acuerdo con Goldberg *et al.*, (2004) *L. subaquavocalis* es sinónima de *L. chiricahuensis*, sin embargo Hillis y Wilcox (2005) las reconoce como especies distintas sin realizar ningún comentario al respecto. En nuestros análisis de ML e Inferencia Bayesiana ésta especie resulta especie hermana de *L. chiricahuensis-L.fisheri*, y con MP no hay resolución entre estas tres especies.

Lithobates megapoda forman parte del grupo Lacusirana, un taxón sugerido por Hillis y Wilcox (2005), cuya etimología proviene del latín *lacus* que significa lago y *rana*, dado por el habitat de la mayoría de las ranas de este grupo. Y curiosamente tiene a *L. megapoda* como especie tipo, aún cuando no había sido incorporada al análisis. El carácter morfológico diagnóstico para este grupo es la presencia de

pequeños puntos amarillos en las superficies posterior de las piernas. Por fortuna para la estabilización nomenclatural de este grupo, en el presente estudio se confirma su posición filogenética y aparece como especie hermana de *Lithobates* sp. 2 del Rodeo S.L.P. con la que previamente había sido confundida por Hillis *et al.* (1983).

Según la propuesta de Hillis y Wilcox (2005) *Lacusirana* junto con *L. pipiens* forman un grupo llamado *Stertirana* con *L. montezumae* como especies tipo. De acuerdo con Dubois (2007b) este nombre no puede ser válido debido principalmente a dos razones. La primera a que se carece de un carácter diagnóstico para este grupo ya que los llamados de apareamiento (parecido a ronquidos) de *Nenirana* y *Stertirana* no pueden ser distinguidos, por lo que sería un carácter compartido por dos grupos. La segunda es que *Lacusirana* y *Stertirana* son sinónimos bajo el criterio del ICNZ, puesto que la especie tipo del primero es *L. megapoda* y del segundo es *L. montezumae*, las cuales pertenecen al mismo taxón (*Lacusirana*), así que solo un nombre debe ser aceptado.

Existen muchas especies de *Lithobates* que requieren de una descripción formal, y otras que requieren de una exploración a lo largo de su distribución para verificar que se trate de una sola especie o sea un grupo de especies. Pero con los datos disponibles, hasta ahora las relaciones filogenéticas de las especies del nuevo mundo se mantienen, e independientemente de la controversia nomenclatural de la propuesta de Hillis y Wilcox (2005), sigue siendo útil para el manejo de las especies a nivel infragénico.

13 CONCLUSIONES

1. El registro helmintológico para *Lithobates megapoda* está constituido por siete taxa de los cuales cuatro son nemátodos (*Eustrongylides* sp., *Contracaecum* sp., *Foleyellides striatus* y *Rhabdias* n. sp.), un céstodo (*Ophiotaenia* sp.), un tremátodo (*Glypthelmins quieta*) y un acantocéfalo (Polymorphidae gen. sp.).
2. Dado que es el primer estudio que se realiza de manera sistemática para este hospedero, todas las especies de helmintos registradas constituyen nuevos registros de localidad para este hospedero, a excepción de *G. quieta* que había sido registrada previamente en el Lago de Chapala.
3. *Ophiotaenia* sp. y Polymorphidae gen. sp. se registran por primera vez en *L. megapoda* y *Rhabdias* n. sp. es una nueva especie.
4. El Lago de Atotonilco fue la localidad que presentó una mayor riqueza y diversidad de parásitos, mientras que Cajititlán presentó los más altos niveles de abundancia y equidad.
5. En cada una de las localidades dominó una especie distinta de nemátodo, *Foleyellides striatus* en Atotonilco, *Eustrongylides* sp. en Cajititlán y *Contracaecum* sp. en Chapala.
6. Las infracomunidades de helmintos de *L. megapoda* se consideran depauperadas, con respecto a lo que se ha observado en otros vertebrados, con valores bajos de diversidad y equidad, tal como ya se han descrito para otros anfibios en México y en el mundo.
7. La prevalencia y abundancia elevada de *Eustrongylides* sp. y *Contracaecum* sp., considerados como infecciones paraténicas, está determinada por el alto grado de eutrofización de los lagos donde habita este hospedero.
8. Los análisis de similitud cuantitativa y cualitativa indican que localidades de Atotonilco y Chapala fueron las más parecidas.
9. Se contribuyó al Proyecto Internacional del Código de Barras de la Vida con nueve secuencias de nemátodos, una de céstodos y tres de tremátodos.
10. Se obtuvo una divergencia genética intraespecífica en los helmintos de menos del 2%.
11. Todos los ranidos recolectados en el Lago de Atotonilco, Lago de Cajititlán y Lago de Chapala, en Jalisco, pertenecen a *L. megapoda*.

12. *Lithobates megapoda* y *Lithobates* sp. 2, confundidas previamente por Hillis *et al.* (1983) son especies distintas.
13. Nuestros resultados apoyan la monofilia de *Lithobates*, aún con la incorporación de un mayor número de taxones.
14. *Lithobates megapoda* forma parte del grupo infragenérico *Lacusirana* propuesto por Hillis y Wilcox (2005).

14 BIBLIOGRAFÍA

Aho, J. M. 1990. Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and processes. En: Parasite Communities: Patterns and Processes. Esch, G. W., Bush, A. O. y Aho, J. M. editores. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido p 157-190.

Alcántar-Escalera, F. J., García-Varela, M., Vázquez-Domínguez, E. y Pérez-Ponce de León, G. 2013. Using DNA barcoding to link cystacanths and adults of the acanthocephalan *Polymorphus brevis* in central Mexico. Molecular Ecology Resources 13(6): 1116-1124.

Amin, O. M. 1987. Key to the Families and Subfamilies of Acanthocephala, with erection of a new class (Polyacanthocephala) and new order (Polyacanthorhynchida). The Journal of Parasitology 73: 1216-1219.

Ammann, M. y de Chambrier, A. 2008. *Ophiotaenia gilberti* sp. n. (Eucestoda: proteocephalidea), a parasite of *Thamnodynastes pallidus* (Serpentes: Colubridae) from Paraguay. Revue Suisse de Zoologie 115(3): 541-551.

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2014. Berkeley, California. Disponible en: <http://amphibiaweb.org/>. (Consulta: Marzo 12, 2014).

Anderson, R. C. 2000. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. 2da edición. CABI Publishing, Oxon, Reino Unido 651 pp.

Benach, J. L. y Crans, W. J. 1973. Larval development and transmission of *Foleyella flexicauda* Schacher and Crans, 1973 (Nematoda: filarioidea) in *Culex territans*. The Journal of Parasitology 59(5): 797-800.

Bowles, J., Hope, M., Tiu, W. U., Lui, X. Y McManus, D. P. 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. Acta Tropica 55: 217-229.

Burkett-Cadena, N. D., McClure, C. J. W., Estep, L. K. y Eubanks, M. D. 2013. Hosts or habitats: What drives the spatial distribution of mosquitoes? Ecosphere 4(2): 1-16.

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, M. J. y Shostak, A. W. 1997. Parasitology meets ecology in its own terms: Margolis et al., revisited. Journal of Parasitology 83(4): 575-583.

Caballero, E. 1935. Nemátodos parásitos de los Batracios de México III. Cuarta Contribución al conocimiento de la parasitofauna de *Rana montezumae*. Anales del Instituto de Biología, UNAM 5(2): 103-117.

Campos-Rodríguez, J. I., Soto-Galera, E., Maya-Paulo, J. y Serna-Hernández, A. 2012. Nuevas localidades y descripción del hábitat de la rana *Lithobates johni*, especie endémica en peligro de extinción. Revista Mexicana de Biodiversidad 83: 566-568.

Castillo, A. 2007 (2 de agosto). Cajititlán, lejos del rescate ecológico. Diario Milenio. México. Disponible en: <http://www.milenio.com>. (Consulta: Septiembre, 14, 2012).

Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9: 1657-1659.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. Ciudad de México, México. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx>. (Consulta: Septiembre, 2012).

Che, J., Pang, J. F., Zhao, H., Wu, G. F., Zhao, E. M. y Zhang, Y. P. 2007. Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 1-13.

Crother, B. I. (Ed.). 2008. Scientific and Standar English names of amphibians and reptiles of North America North of Mexico, with comments regarding confidence in our understanding, 6ta edición. Society for the Study of Amphibians and Reptiles Herpetological Circular 37:1-84.

Crother, B. I. (Ed.). 2012. Scientific and Standar English names of amphibians and reptiles of North America north Mexico, with comments regarding confidence in our understanding, 7ma edición. Society for the Study of Amphibians and Reptiles Herpetological Circular 39:1-91.

Dare, O. K., Nadler, S. A. y Forbes, M. R. 2008. Nematode lungworms of two species of anuran amphibians: Evidence for co-adaptation. Journal for Parasitology 38: 1729-1736.

Darst, C. R. y Cannatella, D. C. 2004. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 31: 462-475.

de Chambrier, A., Coquille, S. C. y Brooks, D. R. 2006. *Ophiotaenia bonneti* sp. n. (Eucestoda: Proteocephalidea), a parasite of *Rana vaillanti* (Anura: Ranidae) in Costa Rica. *Folia Parasitologica* 53: 125-133.

de Chambrier, A., Binh, T. T. y Scholz, T. 2012. *Ophiotaenia bungari* n. sp. (Cestoda), a parasite of *Bungarus fasciatus* (Schneider) (Ophidia: Elapidae) from Vietnam, with comments on relative ovarian size as a new and potentially useful diagnostic character for proteocephalidean tapeworms. *Systematic Parasitology* 81: 39-50.

De Meeûs, T. y Renaud, F. 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* 18: 247-251.

Dubois, A. 1992. Notes sur la classification des Ranidae (Amphibiens anoures). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* 61: 305-352.

Dubois, A. 2007. Naming taxa from cladograms: a cautionary tale. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 317-330.

Dubois, A. 2007b. Naming taxa from cladograms: some confusions, misleading statements, and necessary clarifications. *Cladistics* 23: 390-402.

Elsasser, S. C., Floyd, R., Hebert, P. D. N. y Albrecht, I. 2009. Species identification of North American guinea worms (Nematoda: *Dracunculus*) with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 9: 707-712.

Esch, G. W. y Fernández, J. C. 1993. A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications. Cambridge, Chapman y Hall, Malasia 337 pp.

Esslinger, J. H. 1986. Redescription of *Foleyellides striatus* (Ochoterena and Caballero, 1932) (Nematoda: Filarioidea) from a Mexican Frog, *Rana montezumae*, with reinstatement of the Genus *Foleyellides* Caballero, 1935. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53(2): 218-223.

Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C. y Casiraghi, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filaroid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6: 1.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A. Haddad, C. F. B. De Sá, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., *et al.*, 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1-370.

Frost, D. R., McDiarmid, R. W. y Mendelson, J. R. III. 2009. Response to the Point of View of Gregory B. Pauly, David M. Hillis, and David C. Cannatella, by the anuran subcommittee of the SSAR/HL/ASIH Scientific and Standard English Names List. *Herpetologica* 65: 136–153.

García-Altamirano, I., Pérez-Ponce de León, G. y García-Prieto, L. 1993. Contribution al conocimiento de la comunidad de helmintos de dos especies del Lago de Pátzcuaro, Michoacán: *Rana dunni* y *Ambystoma dumerilii*. *Cuadernos Mexicanos de Zoología* 1:73-80.

García-Prieto, L., García-Varela, M., Mendoza-Garfias, B. y Pérez-Ponce de León, G. 2010. Checklist of the Acanthocephalan in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa* 2419: 1-50.

García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., Aznar, F. J. y Nadler, S. A. 2011. Erection of *Ibirhynchus* gen. nov. (Acanthocephala: Polymorphidae) based on molecular and morphological data. *Journal of Parasitology* 97: 97-105.

García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., Aznar, F. J. y Nadler, S. A. 2013. Phylogenetic relationship among genera of Polymorphidae (Acanthocephala), inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 176-184.

Gendron, A. D., Marcogliese, D. J., Barbeau, S., Christin, M. S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D. y Fournier, M. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135: 469-476.

Geneious versión 7.0.3 creada por Biomatters. Nueva Zelanda. Disponible en <http://www.geneious.com>.

Gibbons, L. M. 2010. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Supplementary Volume. CAB International, Wallingford, Reino Unido 416 pp.

Goater, T. M., Goater, C. P y Esch, G. W. 2014. Parasitism the diversity and ecology of animal parasites, 2da Edición. Cambridge University Press, Nueva York, EUA 497 pp.

Goebel, A. M., Donnelly, J. M. y Atz, M. E. 1999. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in Bufonids and other Frogs, and a Overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(1): 163-199.

Goldberg, C. S., Field, K. J. y Sredl, M. J. 2004. Mitochondrial DNA sequences do not support species status of the Ramsey Canyon Leopard Frog (*Rana subaquavocalis*). *Journal of Herpetology* 38(3): 313-319.

Gómez-Reyna, J. A., Pérez-Verdía Trapero, J. y Velasco-Antillon, A. 2005. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). Laguna de Atotonilco 14 pp.

Gutiérrez-Nájera, R., Barba-Calvillo, G. y del Toro-Gaytán, M. R. 2008. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar-Versión 2006-2008. Lago de Chapala 44 pp.

Hebert P. D. N., Ratnasingham, S. y deWaard, J. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, (Supplement) 270: S96-S99.

Hillis, D. M. 1983. Allocation and distribution of *Rana trilobata* Mocquard. *Journal of Herpetology* 17(1): 73-75.

Hillis, D. M., Frost, J., Wright, D. A., 1983. Phylogeny and biogeography of the *Rana pipiens* complex: a biochemical evaluation. *Systematic Zoology* 32: 132-143.

Hillis, D. M. y Wilcox, T. P. 2005. Phylogeny of the New World true frogs (*Rana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 299-314.

Hillis, D. M. 2007. Constraints in naming parts of the Tree of Life. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 331-338.

Hekkala, E. R., Saumure, R. A., Jaeger, J. R., Herrmann, H. W., Sredl, M. J., Bradford, D. F., Brabeck, D. y Blum, M. J. 2011. Resurrecting an extinct species: archival DNA, taxonomy, and conservation of the Vegas Valley leopard frog. *Conservation Genetics* 12: 1379-1385.

INAFED, 2005. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Gobierno del Estado de Jalisco. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México- ficha para el municipio de Tlajomulco de Zúñiga. México. Disponible en: <http://www.e-local.gob.mx>. (Consulta: Septiembre, 2012).

Jimenez-Ruiz, F. A., García-Prieto, L. y Pérez-Ponce de León, G. 2002. Helminth infracommunity structure of the sympatric garter snakes *Thamnophis eques* and *Thamnophis melanogaster* from the Mesa Central of Mexico, *Journal of Parasitology* 88(3): 454-460.

Johnson, P. T. J. y Carpenter, S. R. 2008. Influence of Eutrophication on disease in aquatic ecosystems: Patterns, processes and predictions. En: *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems*. Ostfeld, R. S.,

Keesing, F. y Eviner, V. T. editores, Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, EUA 504 pp.

Krebs, C. J. 2011. Ecological Methodology Versión 7.2 (programa computacional).

Kuzmin, Y., Tkach, V. V. y Snyder S. D. 2003. The Nematode Genus *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from Amphibians and Reptiles of the Neartic. *Comparative Parasitology* 70(2): 101-114.

Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. 1ra edición. A.G.T. Editor, S.A. Ciudad de México. México 43pp.

Langford, G. J. y Janovy, J. 2009. Comparative life cycles and life histories of North American *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae): lungworms from snakes and anurans. *Journal of Parasitology* 95(5): 1145-1155.

Larking, M. A., Blacshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A. *et al.*, 2007. Clustal W y Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

La Rue, G. R. 1914. A revision of the cestode family, Proteocephalidae. *Illinois Biological Monographs*. Urbana University of Illinois 1(1-2): 1-350.

Leigh, W. H. 1946. Experimental Studies on the Life Cycle of *Glypthelmins quieta* (Stafford, 1900), a Trematode of Frogs. *The American Midland Naturalist* 35(2): 460-483.

Lemke, L. B., Dronen, N., Fox, J. G. y Nambiar, P. R. 2008. Infestation of wild-caught American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) by Multiple Species of Metazoan Parasites. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 47(3): 42-46.

Locke, S. A., Mclaughlin, D. J. y Marcogliese, D. J. 2010. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. *Molecular Ecology* 19: 2813-2827.

López-Caballero, J. D., Ocegüera-Figueroa, A. y León-Règagnon, V. 2013. Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Molecular Ecology Resources* 13(6): 1125-1136.

Marcogliese, D. 2004. Parasites: Small Players with Crucial Roles in the Ecological Theater. *EcoHealth Journal Consortium* 1: 151-164.

Martínez-Salazar, E. A. 2008. Sistemática y Biogeografía del género *Rhabdias* Stiles y Hassall, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) en México. Tesis doctoral, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 495pp.

Martínez-Salazar, E. A., Falcón-Ordaz, J., González-Bernal, E., Parra-Olea, G. y Pérez-Ponce de León. 2013. Helminth Parasites of *Pseudacris hypochondriaca* (Anura:Hylidae) from Baca California, Mexico with the Description of two New Species of Nematodes. *Journal of Parasitology* 99(6): 1077-1085.

Martínez-Sánchez, J., Maes, J. M., van den Berghe, E., Morales, S. y Castañeda, E. A. 2001. Biodiversidad Zoológica en Nicaragua. 1ra edición. MARENA-PNUD, Managua, Nicaragua 174 pp.

Martins, R. T., Stephan, N. N. C. y Alves, R. G. 2008. Turbificidae (Annelida:Oligochaeta) as an indicator of water quality in an urban stream in southeast Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia* 20(3): 221-226.

Mead, R. W. y Olsen, O. W. 1971. The Life Cycle and Development of *Ophiotaenia filaroides* (La Rue, 1909) (Proteocephala: Proteocephalidae). *The Journal of Parasitology* 57(4): 869-874.

Messing, J. 1993. M13 cloning vehicles: their contribution to DNA sequencing. *Methods in Molecular Biology* 23: 9-22.

Moravec, F. 2009. Experimental studies on the development of *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic host. *Folia Parasitologica* 56(3): 185-193.

Moszczyńska, A., Locke, S. A., McLaughlin, D., Marcogliese, D. J. y Crease, T. J. 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources* 9(Suppl. 1): 75-82.

Mwita, C. J. 2011. Variability in parasites community structure and composition in cat fish with respect to level of pollution in Mwanza gulf, Lake Victoria, Tanzania. *Tanzania Journal of Science* 37: 49-57.

Newman, C. E., Feinberg, J. A., Rissler, L. J., Burger, J. y Shaffer, H. B. 2012. A new species of leopard frog (Anura: Ranidae) from the urban northeastern US. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 445-455.

Nickol, B. B., Heard, R. W. Smith, N. F. 2002. Acanthocephalans from crabs in the southeastern US, with the first intermediate host known for *Arhythmnorhynchus frassoni* and *Hexaglandula corynosoma*. *Journal of Parasitology* 88: 79-83.

Ochoa-Ochoa, L. Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M. y Canseco-Márquez, L. (2006a). Areas potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: *Rana megapoda*. Extraído del Proyecto D S009: Areas potenciales de distribución y GAP análisis de la herpetofauna de México. CONABIO, México.

Ochoa-Ochoa, L. Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M. y Canseco-Márquez, L. (2006b). Areas potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: *Rana vaillanti*. Extraído del Proyecto D S009: Areas potenciales de distribución y GAP análisis de la herpetofauna de México. CONABIO, México.

Page, R. D. M. 1993. Parasites, phylogeny and cospeciation. *International Journal of Parasitology* 23(4): 499-506.

Panesar, T. S., y Beaver, P. C. 1979. Morphology of the advanced-stage larva of *Eustrongylides wenrichi* Canavan 1929, occurring encapsulated in the tissues of *Amphiuma* in Louisiana. *Journal of Parasitology* 65(1): 96-104.

Paredes-Calderón, L., León-Régagnon, V. y García-Prieto, L. 2004. Helminth infracommunities of *Rana vaillanti* brocchi (Anura: Ranidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology* 90(4): 692-696.

Paredes-León, R., García-Prieto, L., Guzmán-Cornejo, C. León-Régagnon, V. y Pérez, T. M. 2008. Metazoan parasites of Mexican amphibians and reptiles. *Zootaxa* 1904: 1-166.

Pauly, G. B., D. M. Hillis, y Cannatella, D. C. 2009. Taxonomic freedom and the role of official lists of species names. *Herpetologica* 65: 115-128.

Pérez-Ponce de León, G., León-Régagnon, V., García-Prieto, L., Razo-Mendivil, U. y Sánchez-Álvarez, A. 2000. Digenean Fauna of Amphibians from Central Mexico: Nearctic and Neotropical Influences. *Comparative Parasitology* 67(1): 92-106.

Pérez-Ponce de León, G., García-Prieto, L. y Razo-Mendivil, U. 2002. Species richness of helminth parasites in Mexican amphibians and reptiles. *Diversity and Distributios* 8: 211-218.

Pfeiler, E. y Markow, T. A. 2008. Phylogenetic relationship of leopard frogs (*Rana pipiens* complex) from an isolated coastal mountain range in southern Sonora, Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 343-348.

- Porcasi, J. F. 2010. Archeological evidence for dietary use of bigfoot leopard frog (*Lithobates megapoda*) in postclassic and colonial Central Mexico. *Culture and Agriculture* 32(1): 42-48.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Poulin, R. 2006. *Evolutionary Ecology of Parasites*. 2da edición. Princeton University Press 332 pp.
- Poulin, R. y Morand, S. 2000. The diversity of parasites. *The quarterly Review of Biology* 75(3): 277-293.
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnosis: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology* 42: 367-383.
- Preston, D. y Johnson, P. 2010. Ecological Consequences of Parasitism. *Nature Education Knowledge* 3(10): 47.
- Prosser, S. W. J., Velarde-Aguilar, M. G., León Régagnon, V. y Hebert, P. D. N. 2013. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome *c* oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources* 13(6): 1108-1115.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. y Drummond, A. J. 2013 Tracer v1.5, Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramírez-Lezama, J. y Osorio-Sarabia, D. 2002. Lesiones histológicas en músculo esquelético, causadas por larvas de *Eustrongylides* sp. (Nematoda: Dictyophymatidae) en ranas comestibles del Lago de Cuitzeo, Michoacán, México. *Veterinaria México* 33: 336-341.
- Razo-Mendivil, U., Laclette, J. P. y Pérez-Ponce de León, G. 1999. New host and locality records for three species of *Glypthelmins* (Digenea: Macroderoididae) in anurans of Mexico. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 66: 197-201.
- Razo-Mendivil, U., León-Régagnon, V. y Pérez-Ponce de León, G. 2006. Monophyly and systematic position of *Glypthelmins* (Digenea), based on partial 1srDNA sequences and morphological evidence. *Organisms, Diversity and Evolution*. 6, 308-320.

Razo-Mendivil, U. y Pérez-Ponce de León, G. 2008. Taxonomic revision of the genus *Glyphelmims* Stafford, 1905 (Platyhelminthes: Digenea: Plagiorchiida), parasites of anurans in the Americas. *Zootaxa* 1882 1-45.

Razo-Mendivil, U. y Pérez-Ponce de

Romero-Mayén, A. R., 2011. Fauna helmintológica de la rana *Lithobates psilonota* (Webb, 2001) en dos localidades del Occidente de México. Tesis de Maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 87 pp.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L. Darling, A. et al., 2012. MrBAYes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61: 1-4.

Ruiz-Torres, N. G. 2013. Fauna helmintológica asociada a *Rhinella marina* en la laguna de Coyuca, Guerrero, México. Tesis Licenciatura, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 69pp.

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

Santos-Barrera, G. y Flores-Villela, O. 2004a. *Lithobates megapoda*. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Cambridge, Reino Unido. Disponible en: www.iucnredlist.org. (Consulta: Noviembre, 23, 2013).

Santos-Barrera, G. y Flores-Villela, O. 2004b. *Lithobates pueblae*. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Cambridge, Reino Unido. Disponible en: www.iucnredlist.org. (Consulta: Noviembre, 23, 2013).

Smith H. M. y Chiszar, D. 2003. Distributional and variational data on the frogs of the genus *Rana* in Chihuahua, Mexico, including a new species. *Bulletin of the Maryland Herpetological Society* 39(3): 59-65.

Smith, B. y Wilson, J. B. 1996. A consumer's guide to evenness indices. *Oikos* 76: 70-82.

Sorescu, D. A., Moehl, M., Mann, M., Backofen, R. y Will, S. 2012. CARNA-alignment of RNA structure ensembles. *Nucleic Acids Research* 40(1): 49-53.

Stamatakis, A. 2006. RaxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688-2690.

Swofford, D. L. 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, MA.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 273-279.

Terán-Juárez, S. A. 2011. Helmintos Parásitos de cinco especies de anuros en el sur de Quintana Roo, México. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Chetumal, Chetumal, Quintana Roo 125 pp.

Taylor, E. H. 1942. New Caudata and Salientia from Mexico. *University of Kansas Science Bulletin* 28: 295-323.

Tkach, V. V., Kuzmin, Y. y Pulis E. E. A New species of *Rhabdias* from the lungs of the wood frog, *Rana sylvatica*, in North America: The last sibling of *Rhabdias ranae*? *Journal of Parasitology* 92(3): 631-636.

Tkach, V. V. 2008. Family Glypthelminthidae Cheng, 1959. En: Keys to the Trematoda, vol. 3. Bray, R. A., Gibson, D. I., Jones, A. editores. CAB International and Natural History Museum, Londres, Reino Unido 357-359pp.

Velarde-Aguilar, M. G. 2011. Códigos de Barras Genéticos de los Helmintos de Cinco Especies de Anuros de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Colima, Ciudad de Colima, Colima 166 pp.

Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. y Gutiérrez-García, T. A. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 277-297.

Webb, R. G. 1991. The identity of *Rana trilobata* Mocquard (Anura: Ranidae). *Herpetologica* 47(1): 13-21.

Webb, R. G. 1992. *Rana megapoda* Taylor, 1942 (Amphibia, Anura): proposed conservation of the specific name. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 49(3): 211-212.

Webb, R. G. 1996. A Systematic review of the mexican frog *Rana megapoda* Taylor (Anura: Ranidae). *The Southwestern Naturalist* 41(1): 35-42.

Wiens, J. J., Sukumaran, J., Pyron, R. A. y Brown, R. M. 2009. Evolutionary and biogeographic origins of high tropical diversity in Old World frogs (Ranidae). *Evolution* 63: 1217-1231.

Xiong, F., Tang-Wang, G., Gong-Wu, S. y Nie, P. 2009. Development of *Eustrongylides ignotus* (Nematoda: Dioctophmida) in Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domestica* (L.)). *Journal of Parasitology* 95 (5): 1035-1039.

Yañez-Arenas, C. A. y Guillén-Hernández, S. 2010. Helminth fauna of *Lithobates brownorum* (Anura: Ranidae) at three localities in the state of Yucatán, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 191-195.

Zaldívar-Riverón, A. León-Règagnon, V. y Nieto-Montes de Oca, A. 2004. Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 38-49.

15 APÉNDICES

15.1 Apéndice I. Tinción con Paracarmín de Meyer

1. Como primer paso los helmintos se colocan en alcohol etílico al 96% durante 15 minutos.
2. A continuación se transfieren a Paracarmín de Meyer durante 2 a 3 minutos dependiendo del tamaño del ejemplar.
3. Se colocan en alcohol etílico al 96% para quitar el exceso de colorante durante 5 minutos o más.
4. En seguida se colocan en alcohol acidulado al 2% con HCl, hasta que los bordes del parásito queden blancos y los órganos teñidos.
5. Se colocan en etanol al 96% por uno o dos minutos para impedir la acción progresiva del alcohol acidulado.
6. Después se lavan en etanol absoluto durante 20 o 30 minutos.
7. A continuación se aclaran con salicilato o aceite de clavos por no más de 15 minutos.
8. Por último se montan con bálsamo de Canadá, cuidando que el parásito quede en posición ventral y en el centro de la preparación.

Paracarmín de Meyer

1 g de Ácido carmínico
0.5 g de Cloruro de Aluminio hidratado
4 g de Cloruro de calcio anhidro
100 mL de etanol al 70%

15.2 Apéndice II. Aclarado con Glicerina-etanol

1. Los nemátodos se transfieren a glicerina-etanol 1:1 por varias horas, según el tamaño y grosor de los ejemplares.
2. Una vez aclarados, se coloca bastante de la preparación glicerina-etanol en un portaobjetos.
3. Se coloca el nemátodo en la solución de glicerina.
4. A los extremos del nemátodo se colocan calcitas que pueden ser cubreobjetos, trozos de papel albanene, trozos de portaobjetos (si los nemátodos están muy gruesos) etc. Estas calcitas ayudarán a que los ejemplares se puedan rodar y evitan que se aplasten.
5. Por último se coloca encima un cubreobjetos y se observan en el microscopio.

15.3 Apéndice III. Análisis genético de *Rhabdias* spp.

Comparación con los registros de *Rhabdias* cf. *ranae* en México

El trabajo más extenso sobre el género *Rhabdias* sp. en México es el realizado por Martínez-Salazar (2008), donde se registran a varias especies de *Rhabdias* cf. *ranae* provenientes de distintas regiones y hospederos de México. Dichos ejemplares se encuentran caracterizados molecularmente con un pequeño fragmento de COI (aproximadamente 350pb). Debido a que este fragmento difiere de la región utilizada para el Código de Barras de ADN, fue necesario procesar nuestro material y amplificar dicho fragmento con el fin de realizar un análisis comparativo con *Rhabdias* cf. *ranae*.

Los fragmentos COI de nuestro material se obtuvieron mediante PCR bajo las siguientes concentraciones finales: Buffer 1 X, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 0.625 U de Amplificasa ® BioTecMol (5 U/ μ L), 2-3 μ L de ADN, MgCl₂ 2mM y H₂O destilada hasta completar un volumen final de 25 μ L.

El programa de amplificación consistió en: 96°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 40 s y 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Los oligonucleótidos utilizados fueron: JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') y JB4.5 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') (Bowles *et al.*, 1993).

Los fragmentos fueron secuenciados bidireccionalmente utilizando los mismos oligonucleótidos de amplificación de acuerdo al protocolo de BigDye 3.1 Terminator, con el siguiente programa de secuenciación: 96°C por 3 min, 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min y una extensión final de 60°C por 4 min (Applied Biosystems).

Las secuencias con las que se realizó el análisis comparativo son las obtenidas y empleadas por Martínez-Salazar (2008) (Tabla 17). Estos fragmentos de COI forman parte del agrupamiento denominado por dicha autora como Rran, el cual, se distribuye en las tierras bajas del Pacífico y son parásitas de varias especies de *Lithobates*. También se utilizaron secuencias de *Rhabdias peninsularis* y *Rhabdias* sp. de *Leptodactylus melanonotus*, puesto que presentan parecido morfológico con *R. ranae* y han sido confundidas con dicha especie (Martínez-Salazar, 2008), y se utilizó a *Entomelas floresvillelai* como grupo externo.

El análisis de distancias genéticas se realizó por el método de Neighbor joining (NJ) usando el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) implementado en MEGA versión 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011) y los valores de bootstrap con 1,000 réplicas se obtuvieron en PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2001).

Tabla 17. Secuencias de *Rhabdias* spp. utilizadas en el presente estudio obtenidas de Martínez-Salazar (2008).

Especie	Hospedero	Localidad
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> cf. <i>magnaocularis</i>	Carretera San José Mojarras-Paso de Lozada, Nayarit
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> cf. <i>forreri</i>	Carretera Santa María del oro-Cofradia, Nayarit
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> <i>zweifeli</i>	Carretera Tumbiscatio de Ruiz-Playitas, Michoacán
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> <i>zweifeli</i>	Río Amacuzac, Morelos
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> sp.	Carretera (W) Vallecitos-Zihuaquio, Guerrero
<i>Rhabdias</i> cf. <i>ranae</i>	<i>Lithobates</i> <i>zweifeli</i>	Carretera Puerto de Bálamo-Vallecitos, Guerrero
<i>Rhabdias peninsularis</i>	<i>Pseudacris regilla</i>	Cataviña, Baja California
<i>Rhabdias</i> sp.	<i>Leptodactylus melanonotus</i>	La Cruz de Loreto, Jalisco
<i>Entomelas floresvillelai</i>	<i>Barisia herrerae</i>	San José El Toto, Edomex.

Comparación con los registros de *Rhabdias ranae* de Estados Unidos

El material de *Rhabdias* sp. de *L. megapoda* presentó parecido morfológico con *Rhabdias ranae*, por lo que se realizó un análisis comparativo con los ejemplares de Estados Unidos, que es donde se localiza la localidad tipo.

Para esto fue necesario amplificar el fragmento de rDNA de los espaciadores internos (ITS-1 y ITS-2) y 5.8S con los primers #93 (5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3') y #94 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Dare *et al.*, 2008) con las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 3 min, 36 ciclos de 94°C por 3 minutos, 54°C por 30 s y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Las concentraciones finales en la reacción de PCR fueron las siguientes: Buffer 1 X, 200µM de cada dNTP, 0.4µM de cada oligonucleótido, 0.625 U de Amplificasa ® BioTecMol (5 U/µL), 2-3µL de ADN, MgCl₂ 2mM y H₂O destilada hasta completar un volumen final de 25µL.

Las secuencias de ADN de nuestro material se compararon con las secuencias de *Rhabdias ranae* (DQ264769), *Rhabdias bakeri* (JX826433) y *Rhabdias joaquinensis* (JX826443), siendo estas dos últimas descritas recientemente a partir de material confundido con *R. ranae*, y se utilizaron como grupos externos a *R. sphaerocephala* (DQ845739) y *R. pseudosphaerocephala* (DQ845734), todas ellas obtenidas de GenBank (Tkach *et al.*, 2006; Langford y Janovy Jr., 2013). No se utilizó grupo externo debido a que no se contó con una secuencia apropiada (o alineable).

Los fragmentos fueron secuenciados bidireccionalmente utilizando los mismos oligonucleótidos de amplificación de acuerdo al protocolo de BigDye 3.1 Terminator, con el siguiente programa de secuenciación: 96°C por 3 min, 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min y una extensión final de 60°C por 4 min (Applied Biosystems)

El análisis de distancias genéticas se realizó por el método de Neighbor joining (NJ) usando el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) implementado en MEGA versión 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011) y los valores de bootstrap con 1,000 réplicas se realizó en PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2001).