



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE LAS FORMAS MEXICANAS DE
AUSTRODIPLOSTOMUM SZIDAT Y NANI, 1954
(DIGENEA: DIPLOSTOMATIDAE) PARÁSITOS DE
PECES Y AVES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G A)

P R E S E N T A:

(CECILIA ALEJANDRA LÓPEZ JIMÉNEZ)



DIRECTOR DE TESIS:
(DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA)
(2015)

MÉXICO, D. F.



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.

1.Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1.Datos del alumno López Jiménez Cecilia Alejandra 55 91 62 97 91 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 308181829
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr José Martín García Varela
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dr Rogelio Aguilar Aguilar
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Dr Alejandro Francisco Oceguera Figueroa
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Dra Ana Lucía Serenó Uribe
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 M. en C. María Berenit Mendoza Garfías
7. Datos del trabajo escrito. Título Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito Identificación morfológica y molecular de las formas mexicanas de <i>Austrodiplostomum</i> Szidat y Nani, 1954 (Digenea: Diplostomatidae) parásitos de peces y aves 45 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todos los valores que me han inculcado y porque son mi inspiración para seguir cumpliendo mis metas. ¡¡Muchas Gracias!!

A mis hermanos que son mis amigos y compañeros en esta vida.

Al Dr. Martín García por haberme aceptado en su laboratorio, por todo el apoyo que me ha brindado y por la confianza. ¡¡Muchas Gracias!!

A la Dr. Ana Sereno por el apoyo con las tinciones de los ejemplares y por sus consejos en la elaboración del proyecto. ¡¡Gracias!!

Al M. C Luis García por el préstamo de ejemplares, por sus asesorías y por la información bibliográfica otorgada. ¡¡Gracias!!

Al M. C David Osorio por sus comentarios y correcciones del presente proyecto. ¡¡Gracias!!

Al M.C Carlos Pinacho-Pinacho por el apoyo en la elaboración del proyecto y por su amistad. ¡¡Gracias!!

Al Dr. Hernández-Orts por sus comentarios respecto a la morfología y por la amistad brindada. ¡¡Gracias!!

Al Dr. Rogelio Aguilar Aguilar por las correcciones y por ser parte del jurado.

Al Dr. Ocegüera-Figueroa por sus consejos en la elaboración del proyecto y por ser parte del jurado. Gracias

A la M.C Berenit Mendoza por el apoyo en la obtención de las fotografías en microscopía electrónica y por ser parte del jurado. Gracias.

A mis valedores del laboratorio (Polito, Lalito y Carlita) por las risas, por su amistad y por todo el apoyo que me han brindado desde que entre.

A Miguel por todo lo que me ha enseñado y por ser parte de mi vida.

A todas las personas que forman parte de la CNHE por los comentarios brindados en la elaboración del proyecto.

Al proyecto de investigación financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 179048 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN207213.

A la Máxima Casa de estudios UNAM por mi formación académica en estos ocho años y por ser el impulso de superarme cada día más.

DEDICATORIA

A todas las personas que llevo en mi corazón

“Nada tiene sentido en Biología si no es a la luz de la evolución”
Theodosius Dobzhansky

Índice

I.INTRODUCCIÓN	1
I.I Familia Diplostomidae Poirier 1886.....	1
I.II Historia del género <i>Austrodiplostomum</i>	8
I.III Ciclo de vida.....	10
I.IV Marcadores moleculares.....	12
II. OBJETIVOS	14
II.I. Objetivo General.....	14
II.II. Objetivos particulares.....	14
III. MATERIAL Y MÉTODOS	15
III.I. Recolecta de hospederos.....	15
III.II. Examen helmintológico.....	15
III.III. Caracterización morfométrica.....	19
III.IV. Caracterización molecular.....	19
III.V. Alineamiento y análisis filogenético.....	21
III.V.I Construcción de red de haplotipos.....	22
IV. RESULTADOS	23
IV.I. Caracterización morfológica.....	23
IV.I.I Adulto.....	23
IV.I.II Metacercaria.....	24
IV.II. Caracterización molecular.....	30
IV.II.I Distancias genéticas y análisis filogenéticos.....	30
IV.II.II Red de haplotipos.....	34
V. DISCUSIÓN	36
V.I. Caracterización morfológica.....	36
V.II. Caracterización molecular.....	37
VI. CONCLUSIONES	39
VII. LITERATURA CITADA	40
VIII. ANEXOS	45

I. INTRODUCCIÓN

El phylum Platyhelminthes comprende animales acelomados, aplanados dorsoventralmente con simetría bilateral que se denominan gusanos planos (Cheng, 1981). Tienen diferentes formas de vida desde especies de vida libre como los turbelarios, hasta especies estrictamente parasitas de animales silvestres, domésticos y del hombre, los cuales pertenecen a tres grupos: Trematoda, Monogenoidea y Cestoda (García-Prieto *et al.*, 2014). Particularmente la clase Trematoda está compuesta por aproximadamente 18,000 especies y representan uno de los grupos de metazoos endoparásitos más diverso (Cribb *et al.*, 2001). Los tremátodos presentan por lo general, un cuerpo foliáceo provisto de una ventosa anterior que rodea a la boca y de una ventosa ventral denominada acetábulo (Roberts y Janovy 2005). Las formas adultas pueden ser encontradas en todas las clases de vertebrados, mientras que en los invertebrados como anélidos, gasterópodos y otros grupos de moluscos son usados como los primeros hospederos intermediarios y otros grupos de vertebrados son utilizados como los segundos hospederos intermediarios (Olson *et al.*, 2003).

I.I Familia Diplostomidae Poirier 1886

Los miembros de la Familia Diplostomidae, se caracterizan por presentar un cuerpo dividido en dos segmentos: el segmento anterior es de forma espatulada, contiene un par de pseudoventosas, ventosa oral, acetábulo, faringe, esófago corto, ciegos y el órgano tribocítico que puede ser redondo o elíptico, con glándulas compactas en la base. El segmento posterior es de forma cilíndrica o

coniforme y contiene los órganos reproductores. Presenta dos testículos que pueden ser asimétricos, simétricos u ovals y están arreglados en tándem. No presenta saco del cirro, la vesícula seminal es post-testicular y la bursa copulatoria esta usualmente presente. El ovario es pretesticular, el canal de Laurer está presente y las glándulas vitelógenas están distribuidas en ambas partes del cuerpo o pueden estar confinadas en el segmento posterior del cuerpo (Fig.1) (Niewiadowska, 2002). Dubois (1968) dividió a la Familia Diplostomidae en dos subfamilias Alariinae y Diplostomatinae, sin embargo, en la revisión más reciente de la familia Niewiadowska (2002) reconoció que la clasificación presentaba problemas taxonómicos y mantuvo a Diplostomidae como una familia con cuatro subfamilias, con base en las diferencias morfológicas señaladas anteriormente. 1: Alariinae con 11 géneros asociadas a mamíferos; 2: Codonocephalinae con un género parásito de anuros; 3: Diplostominae con 14 géneros asociados aves acuáticas y 4: Crassiphialinae con 15 géneros asociados aves (ver Tablas 1-4). Además, agregó que es urgente recabar más datos morfológicos y ecológicos con el propósito de entender, mejorar y esclarecer las relaciones filogenéticas entre estos organismos. Olson *et al.*, (2003), combinaron una serie de caracteres morfológicos y moleculares de 77 familias de digéneos, poniendo en duda la monofilia de Diplostomatidae (Ver Figura 2).

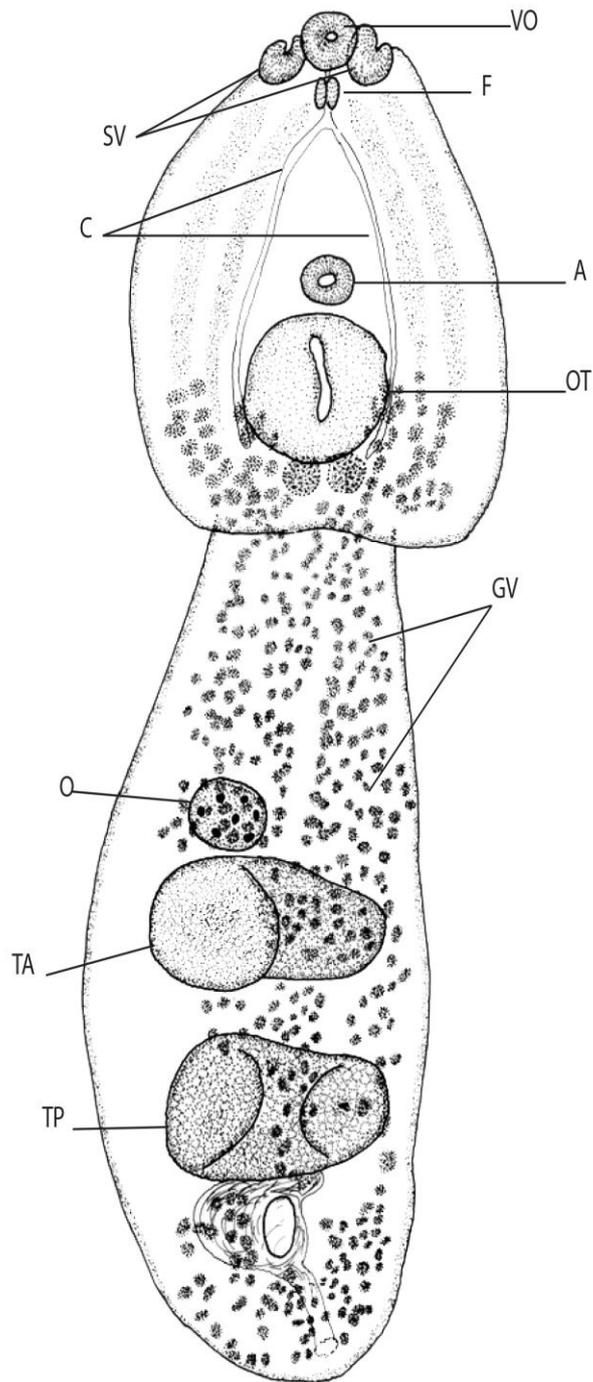


Figura 1. Esquema general de un diplostomido. Vista ventral. Abreviaturas: acetábulo (A), ciegos (C), faringe (F), glándulas vitelógenas (GV), órgano tribocítico (OT), ovario (O), seudoventosas (SV), testículo anterior (TA), testículo posterior (TP), ventosa oral (VO) (Modificado de Pérez-del-Olmo *et al.*, 2014).

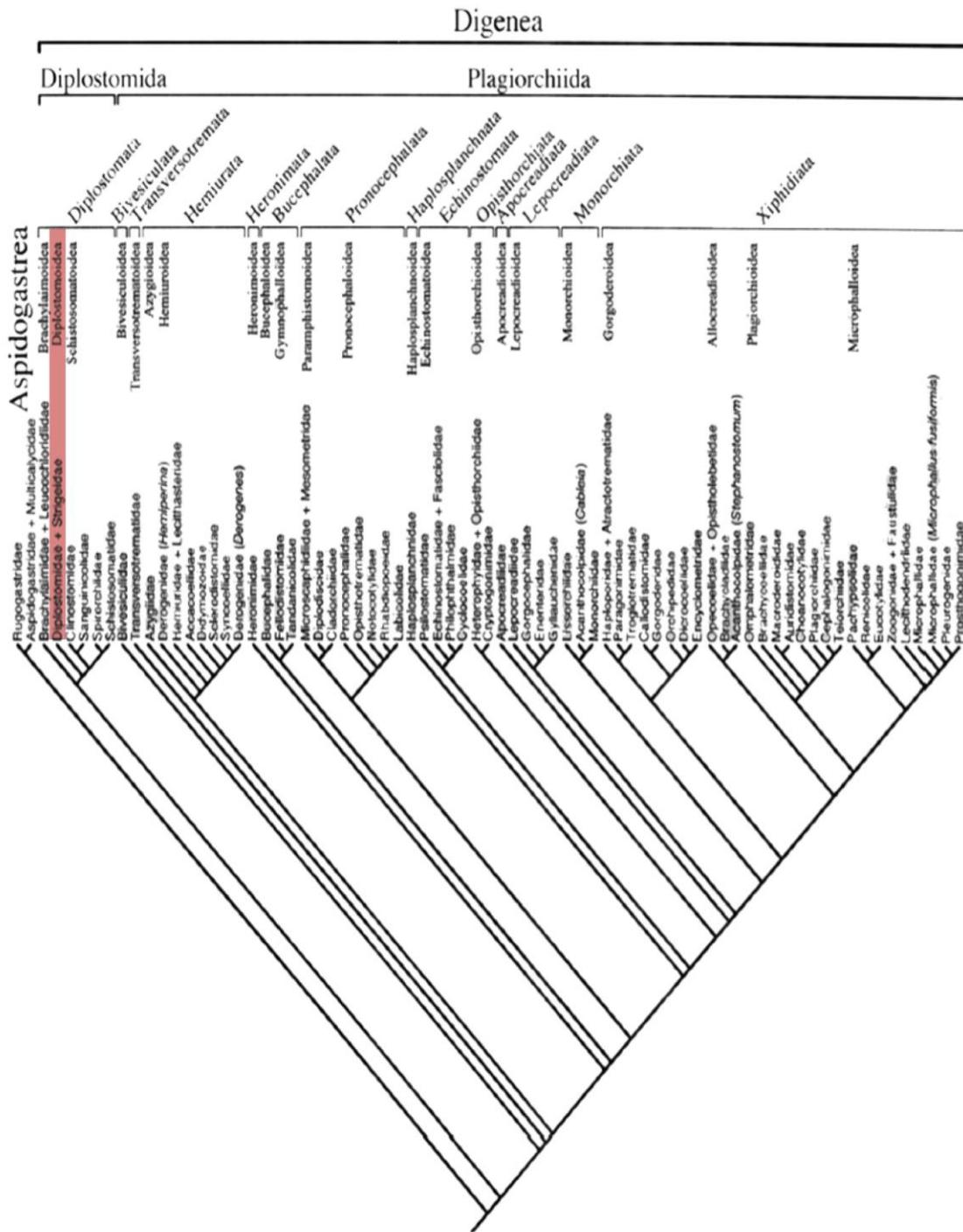


Figura 2. Árbol filogenético de 77 familias de Digeneos. El clado Diplostomoidea incluye algunos de los miembros de la Familia Strigeidae y de Diplostomidae (Tomado de Olson *et al.*, 2003)

Tabla 1. Distribución geográfica y tipo de hospedero intermediario (H.I) y definitivo (H.D) de los géneros que componen la subfamilia Alariinae (Niewiadomska, 2002). NI = No identificado.

GÉNERO	DISTRIBUCIÓN	H.I	H.D
<i>Podospathalium</i> Dubois, 1932	Brasil	N.I	Didelphiidae
<i>Bursotrema</i> Szidat, 1960	Argentina	Anfibios	Marsupiales
<i>Pharyngostomum</i> Ciurea, 1922	Europa, Asia y África	Anfibios	Mamíferos carnívoros
<i>Pharyngostomoides</i> Harkema, 1942	U.S.A (Florida)	Anélidos	Procyonidae
<i>Procyotrema</i> Harkema & Miller, 1959	U.S. A	Anuros	Procyonidae
<i>Fibricola</i> Dubois, 1932	Australia, América del Norte y Asia	Anfibios	Mamíferos
<i>Prudhoella</i> Beverley-Burton, 1960	África	N.I	Mustelidae
<i>Cynodiplostomum</i> Dubois, 1936	África	N.I	Mamíferos carnívoros
<i>Didelphodiplostomum</i> Dubois, 1944	América del Norte	Anfibios	Didelphiidae
<i>Paralaria</i> Krause, 1914	América	Anuros	Procyonidae
<i>Alaria</i> Schrank, 1788	Eurasia y América del Norte	Anuros	Mamíferos carnívoros

Tabla 2. Distribución geográfica y tipo de hospedero intermediario (H.I) y definitivo (HD) de los géneros que componen la subfamilia Codonocephalie Sudarikov, 1959 (Niewiadomska, 2002).

GÉNERO	DISTRIBUCIÓN	H.I	H.D
<i>Codonocephalus</i> Diesing, 1850	Paleártico	Anuros	Ardeidae

Tabla 3. Distribución geográfica y tipo de hospedero intermediario (H.I) y definitivo (H.D) de los géneros que componen la subfamilia Diplostominae Porrier, 1886 (Niewiadomska ,2002). NI = No identificado

GÉNERO	DISTRIBUCIÓN	H.I	H.D
<i>Harvardia</i> Baer, 1932	África, India	Peces	Cormoranes
<i>Sphinctrodiplostomum</i> Dubois, 1936	Neotropical	Peces	Aves
<i>Hysteromorpha</i> Lutz, 1931	Cosmopolita	Peces	Cormoranes, Alcarávanes
<i>Neoharvardia</i> Gupta, 1963	India	Peces	Cormoranes
<i>Adenodiplostomum</i> Dubois, 1937	Australia	Peces	Alcedines
<i>Austrodiplostomum</i> Lutz, 1928	América	Peces	Cormoranes
<i>Bursatintinnabulus</i> Tehranny, Dronnen y Wardle, 1999	América del Norte	Peces	<i>Pelecanus</i> y <i>Morus</i>
<i>Diplostomum</i> von Nordmann, 1832	Cosmopolita	Peces	Aves
<i>Dolichorchis</i> Dubois, 1961	África, Australia, Asia (India, Vietnam)	Peces	Aves ictiófagas
<i>Glossodiplostomoides</i> Bhalerao, 1942	India	Peces	Accipitridae
<i>Tylodelphys</i> Diesing, 1850	Cosmopolita	Peces y anfibios	Accipitridae, Ardeidae y Podicipedidae
<i>Lophosicyadiplostomum</i> Dubois, 1936	Brasil, Venezuela	Peces	Passeriformes
<i>Neodiplostomum</i> Railliet, 1919	Cosmopolita	Anfibios, reptiles y peces	Falconiformes y Strigiformes

Tabla 4. Distribución geográfica y tipo de hospedero intermediario (H.I) y definitivo (H.D) de los géneros que componen la subfamilia Crassiphialinae Sudarikov, 1960 (Niewiadomska ,2002). NI = No identificado

GÉNERO		DISTRIBUCIÓN	H.I	H.D
<i>Pulvinifer</i> 1933	Yamaguti,	Holarctica	Oligoquetos	Charadriiformes
<i>Posthodiplostomoides</i> Williams, 1969		África	Peces: Cyprinidae	Ardeidae
<i>Bolbophorus</i> 1935	Dubois,	Holarctica, Etiopia y Australia	Peces	Pecaniformes y Ardeae
<i>Pseudoscolopacitrema</i> Palmieri, Krishnasamy & Sullivan, 1979		India, Europa	Peces	Aves
<i>Allodiplostomum</i> Yamaguti, 1935		Japón	Peces	Charadriiformes
<i>Subuvulifer</i>	Dubois, 1952	Asia	Peces	Alcedines
<i>Cercocotyia</i> 1939	Yamaguti,	India y Japón	Peces	Alcedines
<i>Crassiphiala</i> Haitsma, 1925	Van	U.S.A	Peces	Alcedines
<i>Pseudodiplostomum</i> Yamaguti, 1934		India y Japón	Peces	Alcedines
<i>Uvulifer</i>	Yamaguti, 1934	Holarctica, Neotropical y Oriental	Peces	Alcedines
<i>Mesophorodiplostomum</i> Dubois, 1936		U.S.A	Peces	Laridos
<i>Scolopacitrema</i> Sudarikov y Rykovsky, 1958		Europa	Peces	Scolopacidae
<i>Conodiplostomum</i> Dubois, 1937		Cosmopolita	Peces	Falconiformes, Strigiformes y Passeriformes
<i>Ornithodiplostomum</i> Dubois, 1936		Holoartica y África	Peces	Podicipedidae y Anatidae
<i>Phosthodiplostomum</i> Dubois, 1936		Cosmopolita	Peces	Ciconiiformes

I.II Historia del género *Austrodiplostomum*

Lutz (1928) describió *Alaria compactum* como parásito del intestino del cormorán *Nannopterum brasilianus* en Venezuela. Szidat y Nani (1951) encontraron metacercarias del tipo diplostomulum en el cerebro de un pez (pejerreyes) a las que describieron como *Austrodiplostomum mordax*. Además, los mismos autores describieron la forma adulta en el intestino del cormorán en Venezuela y revisaron la diagnosis del género transfiriendo *Alaria compactum* al género *Austrodiplostomum*. Posteriormente Ostrowski de Nuñez (1977) describió el ciclo de vida de *A. compactum* y sugirió que esta es sinónimo de *A. mordax*, sin embargo este mismo autor años más tarde en 1982 y siguiendo la clave de Dubois (1970) reconoció *A. compactum* y *A. mordax* como dos especies válidas del género, debido a las diferencias encontradas en el ciclo de vida y en algunas características morfológicas de la metacercaria y del adulto. Además Dubois (1968) y Ostrowski de Núñez (1977; 1982) consideraron *Austrodiplostomum* como subgénero de *Diplostomum*. Sin embargo en la revisión morfológica más reciente de la familia Diplostomidae, Niewiadomska (2002) considero *Austrodiplostomum* como un género válido. Más recientemente Dronen (2009), revisó las características morfológicas y evidencia ecológica (tipo de hospedero definitivo) de las especies de este género y considero *A. compactum* como sinónimo de *A. mordax* erigiendo una nueva especie, *A. ostrowskiae* con base en organismos adultos colectados en el cormorán de doble cresta (*Nannopterum auritus*) de Texas. U.S.A.

En México la metacercaria de *A. mordax* (sinónimo de *A. compactum*) fue registrada por primera vez en el ojo de *Thorichthys aureum* en Tlacotalpan, Veracruz (Caballero y Winter 1954). Desde entonces la metacercaria de *A.*

mordax ha sido registrada en 57 especies de peces pertenecientes a 14 familias (Cichlidae, Heptapteridae, Eleotridae, Ictaluridae, Poeciliidae, Clupeidae, Gerreidae, Catostomidae, Sciaenidae, Ariidae, Mugilidae, Centropomidae, Lutjanidae y Characidae) en 51 localidades de 10 estados de México, mientras que el adulto de *A. mordax* fue registrado por primera vez en el cormorán *Nannopterum brasilianus* de la presa la Angostura, Chiapas (Pineda-López *et al.*, 1985) y recientemente el adulto se ha registrado en ambas costas de México; desde Veracruz hasta Yucatán por el Golfo de México y desde Michoacán hasta Chiapas por el Océano Pacífico (Pérez Ponce de León *et al.*, 2007; Violante González *et al.*, 2009).

I. III Ciclo de vida de *Austrodiplostomum mordax*

Ostrowski de Núñez (1977) completó el único ciclo de vida conocido hasta ahora para una especie del género: *A. mordax* (sinónimo de *A. compactum*) identificando a tres hospederos. Este ciclo de vida comienza cuando el hospedero definitivo del género *Nannopterum*, libera los huevos operculados a través de las heces al medio ambiente acuático, posteriormente del huevo eclosiona un miracidio ciliado que penetra a gasterópodos del género *Biomphalaria*, los cuales fungen como primer hospedero intermediario; en estos se desarrolla un esporocisto madre que da a lugar a varias generaciones de esporocistos hijos, los cuales maduran formando cercarías. Las cercarías emergen del gasterópodo en busca del segundo hospedero intermediario (peces) principalmente de la familia Cichlidae en donde se desarrolla la metacercaria en los ojos particularmente en el humor acuoso y ocasionalmente en el cerebro. Las metacercarias alcanzan el estado adulto cuando los peces son ingeridos por aves ictiófagas donde maduran en el intestino (Fig. 3).

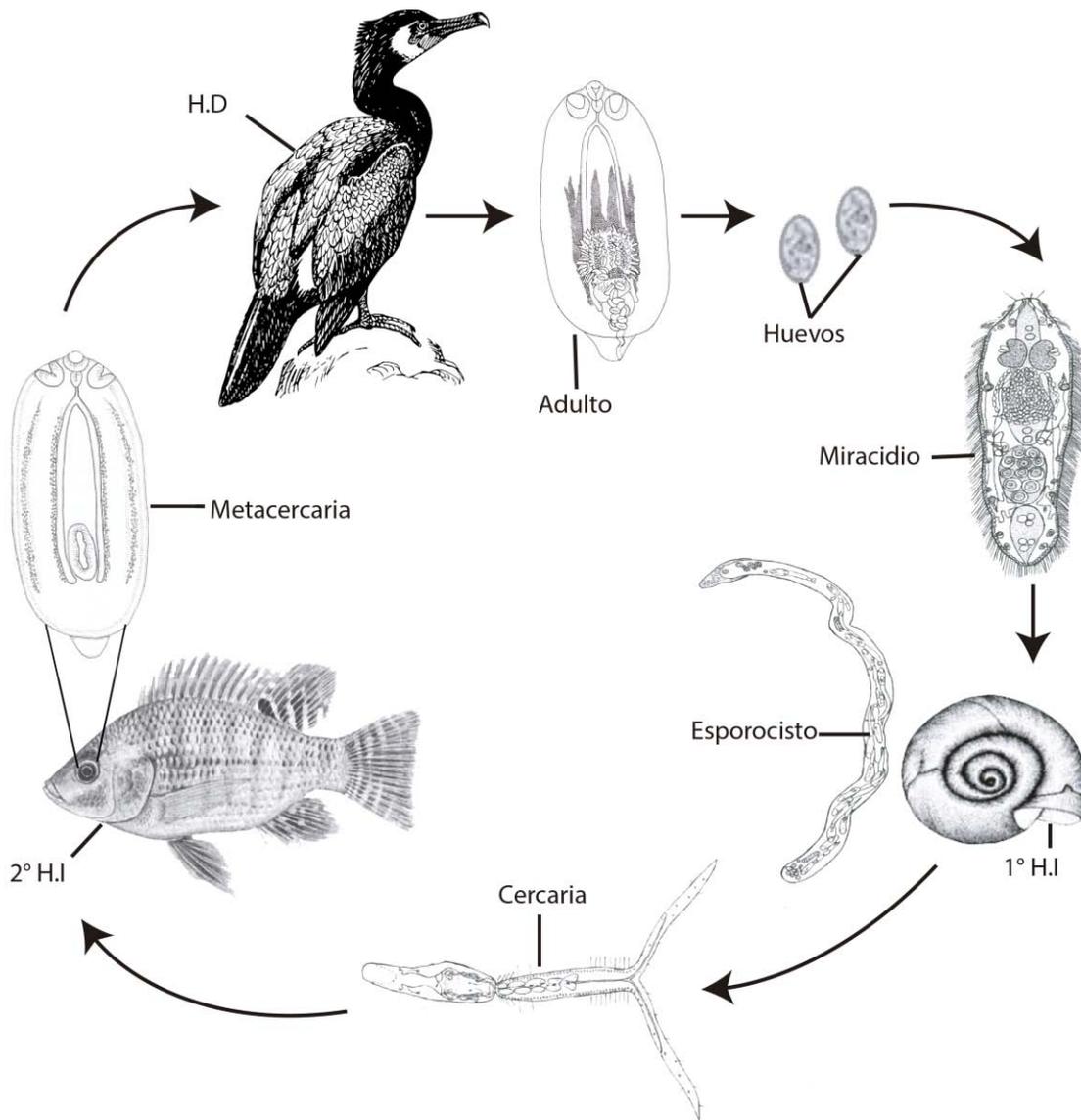


Figura 3. Ciclo de vida de *Austrodiplostomum mordax* (Modificado de Ostrowski de Núñez 1977)

I. IV Marcadores moleculares

Las herramientas moleculares ofrecen nuevas perspectivas en el establecimiento de criterios para la delimitación de especies y en el reconocimiento de especies denominadas crípticas (morfológicamente idénticas y genéticamente diferentes) (Nadler y Pérez-Ponce de León, 2011). Además, permiten establecer una identidad entre las formas larvarias (metacercarias) que se encuentran en peces y los adultos que parasitan otros vertebrados como: mamíferos, aves y reptiles que se alimentan de peces, un aspecto problemático y difícil de responder solo con evidencia morfológica (Alcántar- Escalera *et al.*, 2013). Los marcadores moleculares más utilizados para diferenciar especies o poblaciones de helmintos son las regiones de los espaciadores transcrito internos (ITS) del RNA ribosomal y los genes del DNA mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI). Particularmente en animales el DNA mitocondrial es un genoma circular con aproximadamente 16,569 pares de bases y se ha utilizado como marcador molecular para delimitar, definir especies, reconocer complejos de especies crípticas y en estudios filogeográficos, debido a su alta tasa de sustitución y a su herencia materna la cual es independiente al DNA nuclear (Fig.4) (Cruickshank, 2002). Recientemente, Moszczyńska *et al.*, (2009), diseñaron primers universales con el objetivo de amplificar una región del gen COI que tiene un tamaño aproximadamente de 600 pares de bases (pb), que corresponde a la región del DNA mitocondrial del proyecto universal conocido como código de barras de la vida (BOLD).

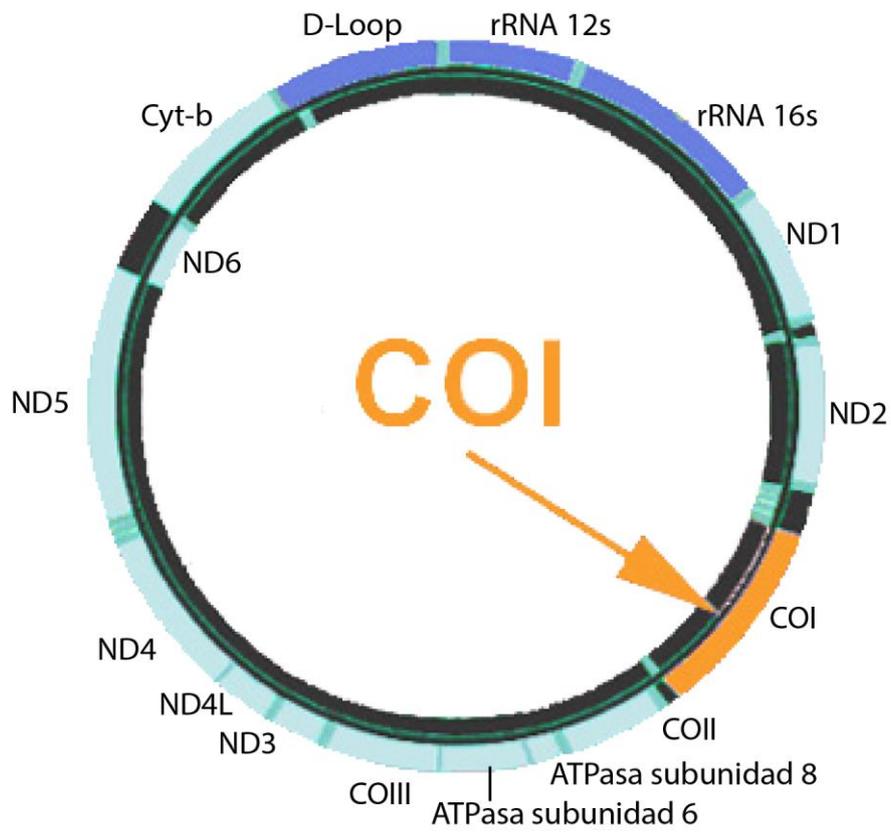


Figura 4. Genoma mitocondrial. En naranja se muestra el gen COI que codifica para el citocromo oxidasa subunidad I.

II. OBJETIVOS

II.I Objetivo general:

Caracterizar morfológica y molecularmente las metacercarias y adultos de *Austrodiplostomum* spp.

II.II Objetivos particulares:

- Realizar la descripción morfológica de las metacercarias y adultos de este género colectados de diferentes hospederos intermediarios y definitivos en México.
- Analizar la región citocromo oxidasa subunidad I del genoma mitocondrial.
- Estimar las divergencias genéticas entre metacercarias y adultos de *Austrodiplostomum* spp., generar una red de haplotipos para determinar la composición genética de las poblaciones y proponer una hipótesis filogenética del género.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.I Recolecta de los hospederos

Los peces y las aves que fungen como hospederos intermediarios y definitivos, se colectaron entre el año 2012 y 2014 en 14 localidades de ocho estados de la República Mexicana: Quintana Roo, Tabasco, Campeche, Guerrero, Veracruz, San Luis Potosí, Oaxaca y Chiapas, así como en una localidad de la República Bolivariana de Venezuela y una localidad de la República de El Salvador. Además una secuencia disponible identificada como *A. ostrowskiae* fue obtenida de la base de datos del genbank y comparada con los muestras obtenidas en el presente estudio de tesis (Tabla 5, Fig. 5).

III.II Examen helmintológico

Los ojos de los peces y el intestino de cada ave fueron extraídos y colocados en una caja Petri con solución salina al 0.75%. Posteriormente se revisaron bajo el microscopio estereoscópico, desgarrando el tejido con agujas de disección, algunos ejemplares se fijaron en formol al 4% a punto de ebullición, para poder llevar a cabo el estudio morfológico, mientras que otros ejemplares fueron preservados en etanol al absoluto para el análisis molecular.

Tabla 5. Localidades de colecta, coordenadas geográficas, especies de hospederos, número de muestra, estadio del ciclo de vida metacercaria (M), Adulto (A); número de haplotipo, número de acceso al Gen bank.

Localidad	Coordenadas	Hospedero	Número de muestra	Estadio del ciclo de vida	Haplotipo	Numero de acceso de Gen Bank		
1. Coba, Quintana Roo.	20°29'27" N 87°44'02"W	<i>Thorichthys meeki</i>	DNA 1881	M	H1	KM115895		
			DNA 1882	M	H1	KM115896		
			DNA 1883	M	H1	KM115897		
			DNA 1884	M	H1	KM115898		
			DNA 1884.1	M	H1	KM115899		
			DNA 1885	M	H1	KM115900		
			DNA 1886	M	H1	KM115901		
2. Rio Hondo, Quintana Roo.	18°28'35"N 89°09'52"W	<i>Cichlasoma urophthalmus</i> <i>Nannopterum brasiliensis</i>	DNA 1880	A	H1	KM115894		
3. Santa Cruz, Campeche.	19°24'24"N 90°23'59"W	<i>Thorichthys meeki</i>	DNA 1887	M	H1	KM115902		
			DNA 1888	M	H1	KM115903		
			DNA 1889	M	H1	KM115904		
			DNA 1889.1	M	H1	KM115905		
			DNA 1890	M	H1	KM115906		
			DNA 1891	M	H1	KM115907		
			DNA 1892	M	H1	KM115908		
4. Ulumal, Campeche.	19°16'43"N 90°37'26"W	<i>Cichlasoma urophthalmus</i> <i>Thorichthys sp.</i>	DNA 1893	M	H1	KM115909		
5. Teapa, Tabasco.	17°32'39"N 92°57'04"W	<i>Nannopterum brasiliensis</i>	DNA 510	A	H1	KM115890		
			DNA 510.1	A	H1	KM115891		
			DNA 511	A	H1	KM115892		
			DNA 511.1	A	H1	KM115893		
6. Catemaco, Veracruz.	18°25'00"N 95°07'00"W	<i>Vieja fenestrata</i>	DNA 1955	M	H1	KM115921		
			DNA 1956	M	H1	KM115922		
			DNA 1957	M	H1	KM115923		
			DNA 1958	M	H1	KM115924		
			DNA 1959	M	H1	KM115925		
			DNA 1959.1	M	H1	KM115926		
7. Tlacotalpan, Veracruz.	18°36'40"N 95°39'43"W	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	DNA 2139	M	H1	KM115941		
			DNA 2140	M	H1	KM115942		
			DNA 2141	M	H1	KM115943		
			DNA 2142	M	H5	KM115944		
			DNA 2143	M	H10	KM115945		
		<i>Thorichthys ellioti</i>	DNA 2144	M	H11	KM115946		
			DNA 2145	M	H1	KM115947		
			DNA 2146	A	H7	KM115948		
		8. Media Luna, San Luis Potosi.	21°51'34"N 100°00'47"W	<i>Herichthys steindachneri</i>	DNA 2001	M	H1	KM115926
					DNA 2002	M	H1	KM115927
					DNA 2003	M	H1	KM115928
DNA 2004	M				H1	KM115929		
DNA 2005	M				H1	KM115930		
DNA 1949	M				H2	KM115915		
DNA 1950	M				H1	KM115916		
9. Tres Palos, Guerrero.	16°48'00"N 99°47'00"W	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	DNA 1951	M	H1	KM115917		
			DNA 1952	M	H2	KM115918		
			DNA 1953	M	H2	KM115919		
			DNA 1954	M	H2	KM115920		
			DNA 347	M	H1	KM115882		
			DNA 347.1	M	H9	KM115883		
			DNA 348	M	H2	KM115884		
			DNA 348.1	M	H2	KM115885		
			DNA 349	A	H2	KM115886		
			DNA 349.1	A	H1	KM115887		
			DNA 350	A	H2	KM115888		
			DNA 350.1	A	H2	KM115889		
			10. Laguna de Coyuca, Guerrero.	16°56'35" N 100°00'32"W	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	DNA 2107	M	H2
DNA 2108	M	H2				KM115937		
DNA 2109	M	H1				KM115938		

			DNA 2110	M	H3	KM115939
			DNA 2111	M	H12	KM115940
11. Rio Verde, Oaxaca.	16°06'35"N 97°43'58"W	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	DNA 2019	M	H1	KM115931
			DNA 2020	M	H1	KM115932
			DNA 2021	M	H1	KM115933
			DNA 2022	M	H2	KM115934
			DNA 2023	M	H1	KM115935
12. Chimalapas, Oaxaca.	16°53'54"N 94°41'37"W	<i>Vieja</i> sp.	DNA 2147	M	H1	KM115949
			DNA 2148	M	H1	KM115950
			DNA 2149	M	H6	KM115951
			DNA 2150	M	H4	KM115952
		<i>Thorichthys callolepis</i>	DNA 2151	M	H4	KM115953
			DNA 2152	M	H1	KM115954
			DNA 2153	M	H1	KM115955
13. Nueva Francia, Chiapas.	16°53'54"N 94°41'37"W	<i>Rhamdia guatemalensis</i>	DNA 2159	M	H1	KM115961
			DNA 2160	M	H1	KM115962
			DNA 2161	M	H1	KM115963
			DNA 2162	M	H11	KM115964
			DNA 2163	M	H8	KM115965
14. La Angostura, Chiapas.	16°11'31"N 92°59'52"W	<i>Nannopterum brasiliense</i>	DNA 2154	A	H1	KM115956
			DNA 2155	A	H1	KM115957
			DNA 2156	A	H1	KM115958
			DNA 2157	A	H1	KM115959
			DNA 2158	A	H1	KM115960
15. Barra de Santiago, Salvador.	13°43'28"N 90°01'46"W	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	DNA 2137	M	H1	KM115966
			DNA 2138	M	H4	KM115967
16. Cumana, Venezuela.	10°27'51"N 64°10'35"W	<i>Cichlasoma</i> sp.	DNA 1894	M	H1	KM115910
			DNA 1895	M	H1	KM115911
			DNA 1896	M	H1	KM115912
			DNA 1897	M	H1	KM115913
			DNA 1898	M	H1	KM115914
17. Mississippi river, USA.	47°14'23"N 95°12'27"W	<i>Nannopterum auritus</i>		A	H5	AGN72734

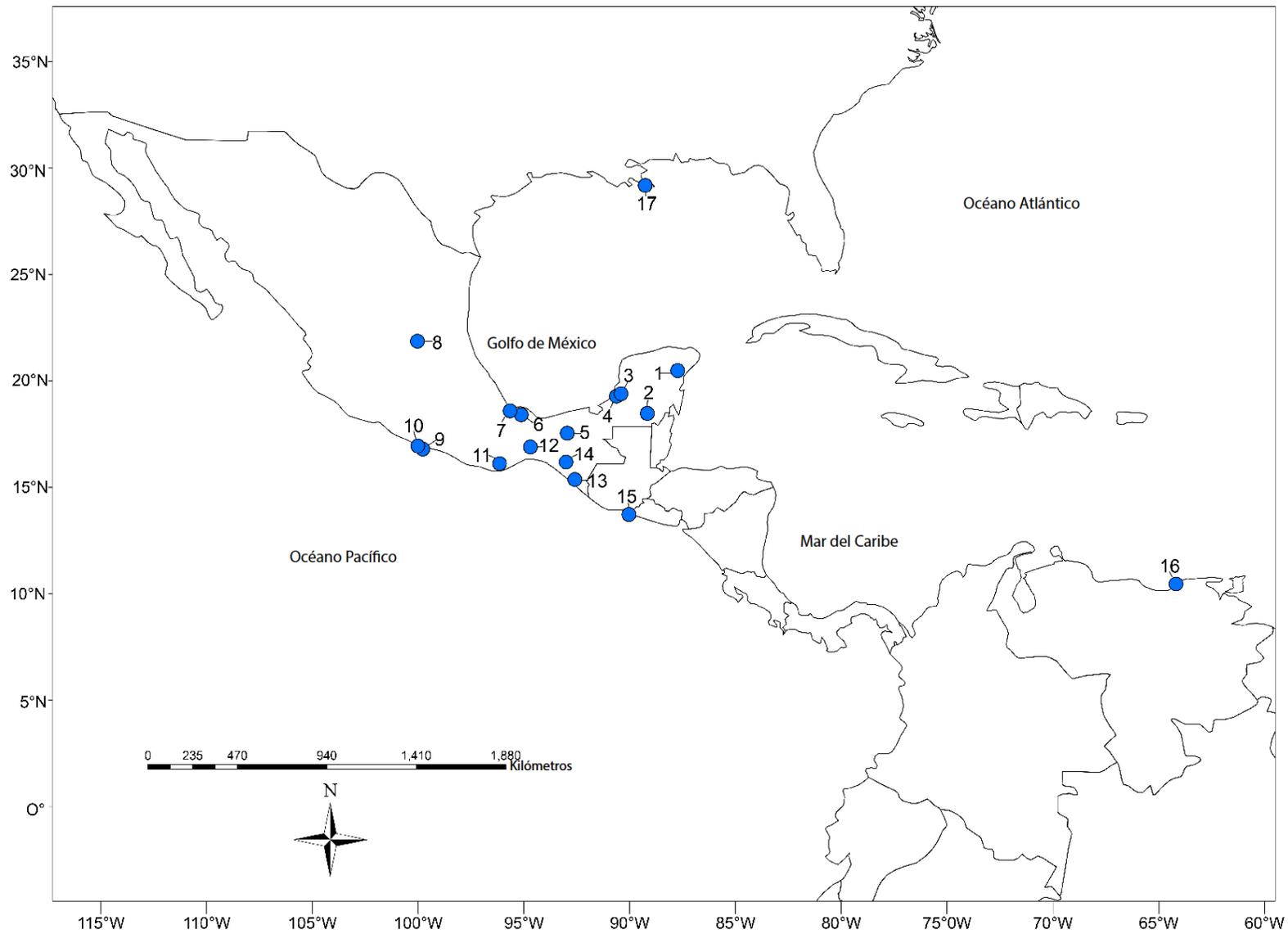


Figura 5. Mapa de las localidades de colecta en este estudio, los números de las localidades corresponden con la Tabla 5.

III.III Caracterización morfométrica

Trece ejemplares fijados para el estudio morfológico, se tiñeron con la técnica de tinción de paracarmín de Mayer (Anexo 1) y se montaron en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá. Posteriormente se observaron al microscopio y se elaboró un dibujo general del adulto y la metacercaria en una cámara clara adaptada a un microscopio óptico, resaltando las características diagnósticas, además se midieron todas las estructuras para la caracterización morfométrica (expresada en micrómetros). Los ejemplares se depositarán en la colección nacional de helmintos (CNHE).

III.IV Caracterización molecular

Los parásitos adultos y las metacercarias colectados preservados en etanol absoluto, se transfirieron individualmente a tubos de 0.5 ml que contenían 100 µl de la solución de digestión (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 200mM NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 10% Sarkosil, 0.1 mg/ml de proteinasa K y agua ultrapura) y se incubaron 12 horas a 56°C. Posteriormente los tubos se incubaron a 95°C durante 15 minutos, para desactivar la proteinasa K. El DNA genómico se extrajo del sobrenadante usando el reactivo DNAzol (Invitrogene, CA, U.S.A). La amplificación de los COI se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers Plat-diploCOX1F (5'-CGTTTRAATTATACGGATCC-3') y Plat-diploCOX1R (5'-AGCATAGTAATMGCAGCAGC-3') (Moszczyńska *et al.*, 2009). El contenido final de la mezcla de reacción fue de 25 µl: 2.5 µl de Buffer Platinum 10X, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 0.5 µl de cada primer, 0.125 µl de Taq polimerasa Platinum (Invitrogene, CA, U.S.A), 16.375 µl de agua estilada y 2 µl de DNA

genómico. Posteriormente las muestras se incubaron en un termociclador modelo eppendorf Mastercycle Personal, el programa de amplificación consistió en los siguientes pasos:

- 1.- 94°C 5min; Desnaturalización
- 2.- 94°C 1 min
- 3.- 50°C 1min; Alineación de los primers
- 4.- 72° C 1min; Extensión de la polimerasa
- 5.- Repetir 35 veces a partir del paso número dos.
- 6.- 72°C 5min
- 7.- 8°C 12 horas.

Los productos amplificados se separaron y se observaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio en un buffer de Tris-Boratos-EDTA (TBE 1X). Los productos amplificados se marcaron a través de una reacción de PCR con el método de Sanger, el cual se basa en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3'. El método comienza cuando la doble hélice de DNA es desnaturalizada para producir una sola cadena, posteriormente se le agrega un primer el cual tiene un grupo libre 3'OH en su desoxiribosa donde se añaden los nucleótidos. La muestra se divide en cuatro submuestras, a cada una se le añade uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) junto con la DNA polimerasa. La secuencia de DNA es extendida por la DNA polimerasa usando la cadena simple como templado, cuando uno de estos dideoxinucleótidos se incorpora a una cadena

en crecimiento, esta cadena no puede continuar con el procesos de elongación debido a que los dideoxinucleotidos carecen del grupo hidroxilo del carbono 3'. Los electroferogramas derivados de la reacción de secuenciación se exportaron al programa de computo Codoncode (versión 5.0.2) en donde se revisó cada pico correspondiente a un nucleótido. Finalmente se ensamblaron las dos cadenas del DNA en una secuencia consenso.

III.V Alineamiento y análisis filogenético

Las secuencias generadas del cox 1 de *Austrodiplostomum* spp., se alinearon con otras secuencias obtenidas del genbank como: *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen 2009; *Diplostomum baeri* Dubois 1937, *D. indistinctum* Guberlet 1923, *D. pseudopathaceum* Niewiadomska 1984, *D. mergi* Dubois 1932, *D. huronense* La Rue 1927, *Tylodelphys mashonense* Beverley-Burton 1963, *T. scheuringi* Dubois 1932, *T. clavata* von Nordman 1932, *T. excavata* Rudolphi 1803, *Posthodiplostomum* sp., Dubois 1936, *Hysteromorpha triloba* Rudolphi 1819 y *Ornithodiplostomum* sp., Dubois 1936 todos estos taxa se clasifican en la familia Diplostomidae y se utilizaron como grupos externos en los análisis filogenético. En total se formó una base de datos de 104 taxa con 478 pares de bases. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Clustal (Larkin *et al.* 2007) implementado dentro del programa de cómputo Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (Tamura *et al.*, 2013). La reconstrucción filogenética se realizó a través del análisis de Máxima Verosimilitud (ML) con el programa RaxML GUI 1.31 (Silvestro y Michalak 2011) e Inferencia Bayesiana (IB) con el programa MrBayes v3.2.2 x 64 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). El soporte de los nodos fue evaluado con 1000 réplicas de bootstrap y probabilidades posteriores. La divergencia genética

entre los taxa fueron obtenidas con el método de distancias “p” en el programa MEGA.

III.V. I Construcción de la red de haplotipos

La genealogía del COI fue inferida usando dos aproximaciones para la construcción de la red de haplotipos. Las redes de median-joining se estimaron con el programa NETWORK versión 4.2.0., este método comienza con árboles de expansión mínimos combinados dentro de una sola red y posteriormente para reducir la longitud del árbol, se agregan vectores (secuencias consenso). Además, fue empleado el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para inferir las redes de haplotipos utilizando parsimonia (Templeton *et al.*, 1992) con una confianza de 95%.

V. RESULTADOS

Los resultados de la tesis se dividen en dos secciones. En la primera se describen morfológicamente la metacercaria y al adulto de una especie del género *Austrodiplostomum*. Además se presenta una comparación morfométrica de los ejemplares colectados en este trabajo con las descripciones originales. En la segunda sección se presenta la caracterización molecular de la metacercaria y el adulto de estos digéneos. Finalmente se generó un árbol filogenético del género *Austrodiplostomum*, y se evaluó su posición filogenética dentro de la familia Diplostomidae.

IV. I Caracterización morfológica del Adulto y Metacercaria

Morfología del Adulto

La siguiente descripción está basada en 13 adultos colectados del intestino de *Nannopterum brasilianus* de dos localidades de la República Mexicana (Tlacotalpan, Veracruz y La Angostura, Chiapas). El cuerpo es ovalado y cóncavo. El tegumento del cuerpo está cubierto de papilas (Fig. 6). La longitud total del parásito es de 1,100-1,250 μm (1,200) de largo por 500-840 (610) de ancho, mientras que el segmento anterior se encuentra la ventosa oral que es pequeña y subterminal, mide de 95-100 (90) de largo por 50-110 (70) de ancho, presenta dos pseudoventosas grandes. La boca, situada al centro de la ventosa oral, se comunica con una faringe oval que mide 56–100 (80) largo por 40–65 (50) de ancho, ésta se continúa con un pequeño esófago que se divide en dos ciegos intestinales, los cuales se extienden desde la tercera parte del segmento posterior y terminan al nivel medio del testículo posterior, en el mismo

segmento. En la parte posterior se encuentra el órgano tribocítico, sobrelapado con ambos ciegos; es de forma elíptica de 270–560 (430) de largo por 270–500 (400) de ancho. Los testículos están arreglados en tándem y son ovoides, localizados en el tercio posterior del segmento anterior. El testículo anterior mide 138–240 (140) de largo por 135–260 (160) de ancho y el posterior mide 88–212 (190) por (170) respectivamente. El ovario es esférico mide 40–150 (70) de largo por 48–132 (80) de ancho y es contiguo al testículo anterior. Las glándulas vitelógenas se extienden de la región anterior del cuerpo hacia el término del testículo anterior. Los huevos localizados dentro del útero miden 72–156 (100) de largo por 56–70 (45) de ancho (Fig. 6; Tabla 6).

Morfología de la metacercaria

Las metacercarias se encontraron libres en el humor acuoso del segundo hospedero intermediario (*Rhambdia guatemalensis*) de la localidad de Nueva Francia, Chiapas. Las metacercaria (cinco individuos se midieron) presenta un cuerpo ovalado y cóncavo en la parte ventral. El tegumento está cubierto de papilas. (Fig. 7). La longitud total del cuerpo mide de 1,300–1,450 μm (1,380) de largo por 480–610 (530) ancho. La parte anterior contiene la ventosa oral que es subterminal y mide de 62–82 (72) largo por 62–75 (66) de ancho, dos seudoventosas laterales, la faringe es oval y mide 60-75 (66) de largo por 42-55 (49) de ancho; los ciegos intestinales se extienden hasta la parte final de la región posterior. En la región posterior se encuentra el órgano tribocítico mide 250-300 (290) de largo por 120-130 (124) de ancho. El aparato reproductor esta poco desarrollado, observándose únicamente los primordios que originan a los testículos.

Adicionalmente, otras cinco metacercarias que se encontraban libres en el humor acuoso de *Cichlasoma* sp., colectadas en Cumana, Venezuela fueron caracterizadas. Estas metacercarias presentan un cuerpo ventralmente cóncavo. El tegumento no presenta papilas (Figs. 8). La longitud total del cuerpo es de 1,300–1,500 (1,420) de largo por 600–500 (552) de ancho, una ventosa oral pequeña subterminal de 60–67 (63) de largo por 50–60 (56) de ancho, dos seudoventosas laterales en la región posterior del cuerpo; una faringe oval de 52-55 (53) de largo; los ciegos intestinales se extienden hacia la región posterior del cuerpo y sobrepasan el órgano tribocítico el cual mide 200-250 (225) de largo por 100-120 (110) de ancho.

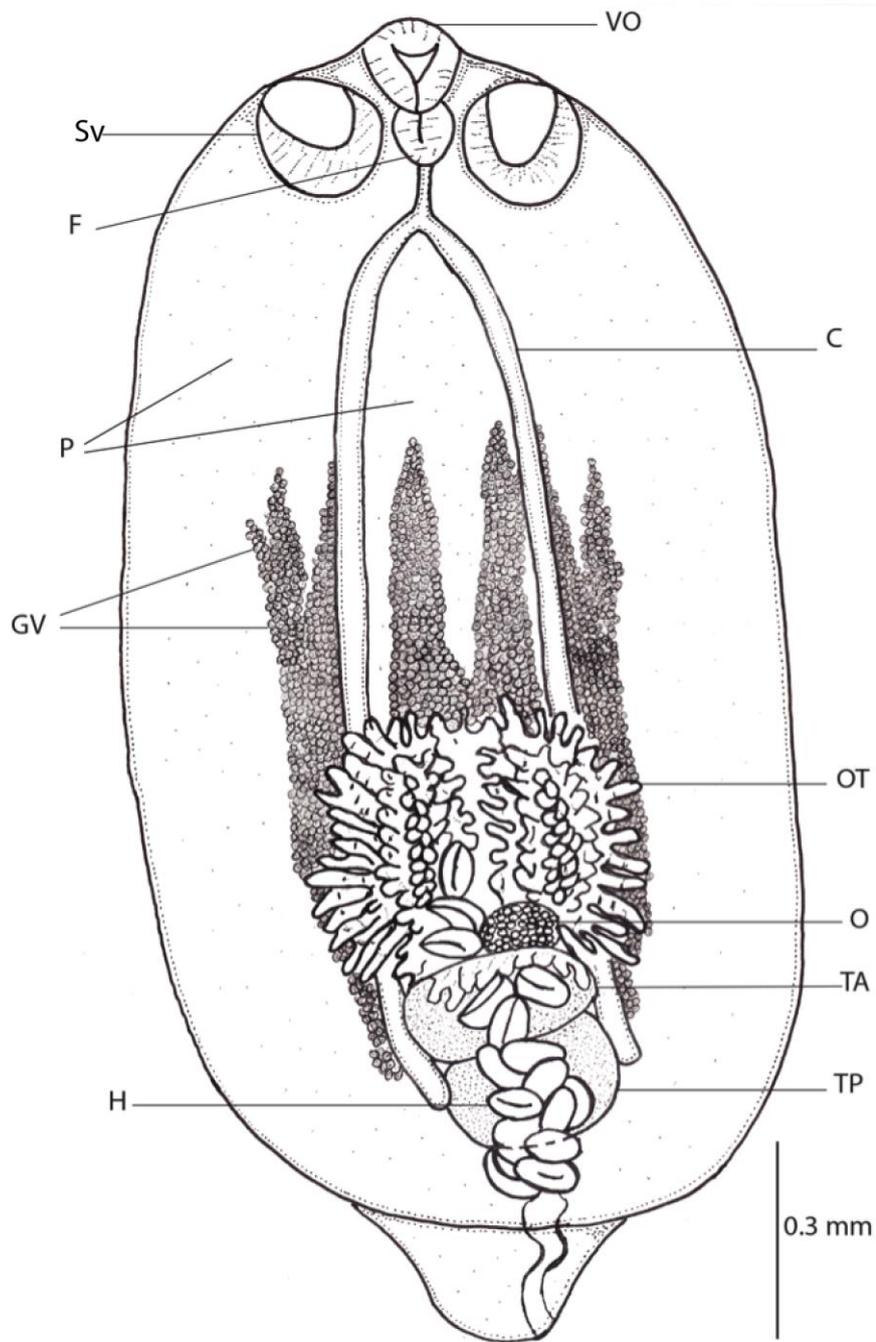


Figura 6. Esquema general del adulto de *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen 2009. Vista ventral. Abreviaturas: ciegos (C), faringe (F), glándulas vitelógenas (GV), huevos (H), órgano tribocítico (OT), ovario (O), papilas (P), pseudoventosas (Sv), testículo anterior (TA), testículo posterior (TP) y ventosa oral (VO).

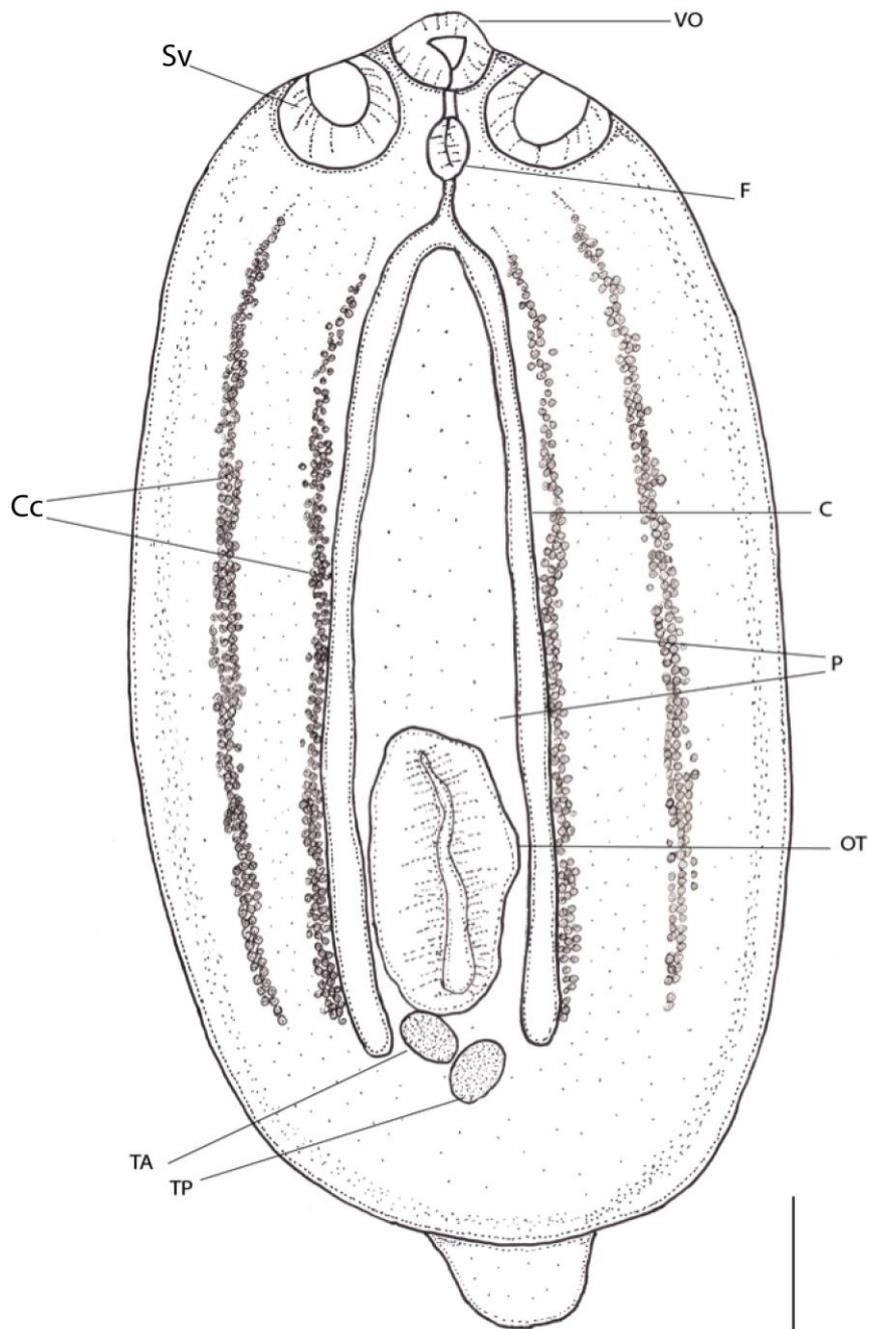


Figura 7. Esquema general de la metacercaria de *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 Vista ventral. Abreviaturas: ciegos (C), cuerpos calcáreos (Cc), faringe (F), órgano tribocítico (OT), papilas (P), pseudoventosas (Sv), testículo anterior (TA), testículo posterior (TP) y ventosa oral (VO). La escala de la línea representa 0.2 mm

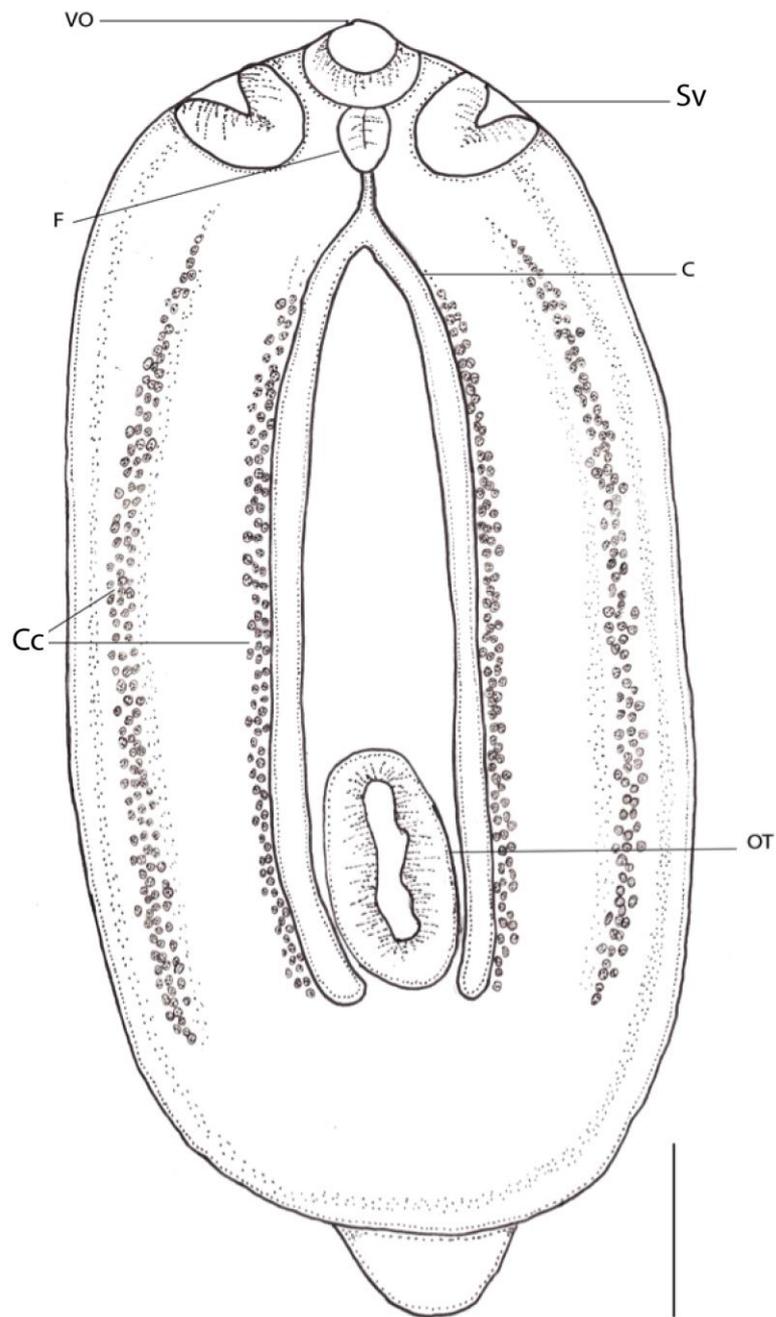


Figura 8. Esquema general de la metacercaria de *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 colectada en Venezuela. Vista ventral. Abreviaturas: ciegos (C), cuerpos calcáreos (Cc), faringe (F), órgano tribocítico (OT), pseudoventosas (Sv) y ventosa oral (VO). La escala de la línea representa 0.2 mm.

Tabla 6. Medidas comparativas de las especies del género de *Austrodiplostomum* Szidat y Nani (1951). Las mediciones están expresadas en micrómetros.

Referencias	<i>A. mordax</i> (syn. <i>A. compactum</i>)					<i>A. ostrowskiae</i>				
	Lutz, 1928	Nasir y Diaz, 1972	Szidat y Nani, 1951	Drago, 2011	Dronen, 2009	Ostrowski de Nuñez, 1970	Dubois y Macko, 1972	Rietschel y Werding, 1978	Drago, 2011	Presente estudio
Localidad	Venezuela	Venezuela	Argentina	Argentina	U.S.A	Argentina	Cuba	Colombia	Argentina	México
Hospedero					<i>N. auritus</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. auritus</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
Cuerpo	1800	1150-1790 x 576-864	1400-800	812-1071 x 348-411	1110-1425 x 520-700	2240-2500 x 840-1120	2100-2600 x 1000-1300	1180-1600 x 720-936	1685-2486 x 1000-1257	1100-1250 x 500-840
Ventosa oral	-----	60-96 largo	130	64-79 x 59-78	65-75 x 49-65	58-98 x 69-98	75-105 x 65-85	65-102 x 36-102	76-95 x 93-150	75-100 x 50-110
Faringe	-----	50-90 largo	150x40	25-69 x 40-64	60-85 x 55-68	87-127 x 75-87	73-94 x 57-80	75-90 x 66-78	98-119 x 69-81	56-100 x 40-65
Órgano tribocítico	-----	235-423 x 206-282	350-200	145-188 x 111-159	250-370 x 125-145	406-638 x 307-464	520-740 x 470-600	423-494 x 447-672	459-725 x 444-774	270-560 x 270-500
Seudoventosa	-----	-----	-----	71-95 x 59-83	-----	-----	-----	-----	126-169 x 76-176	120-240 x 70-278
Ovario	-----	-----	-----	48-55 x 76-79	57-78 x 88-125	92-127 x 127-179	165-180 x 215-230	66-103 x 141-146	114-152 x 130-193	40-150 x 48-132
Testículo anterior	-----	154-238 x 196-420	-----	83-93 x 126-147	112-185 x 198-265	127-232 x 261-377	190-250 x 265-360	155-188 x 237-306	136-314 x 237-416	130-240 x 135-260
Testículo posterior	-----	140-154 x 364-560	-----	62-83 x 157-193	100-185 x 215-275	116-232 x 324-452	160-210 x 310-440	118-150 x 291-329	145-251 x 396-503	88-212 x 135-300
N° de huevos	-----	4	25-30	2-6	7-25	Pocos	70	15-20	7-126	7-45
Huevos	100	112-152 x 56-112	100 x 50	71-107 x 47-69	81-98 x 48-56	87-98 x 40-52	85-100 x 55-65	87-95 x 51-57	76-96 x 45-69	72-156 x 56-70
Ta/Tp	-----	1,3-1,9	-----	1,2-1,5	1,03	1,2-1,24	1,2	1,1-1,2	1,2-1,4	1,2-1,3
C/Ot	-----	4,2-4,9	4	4,8-6,3	3,9-4,4	3,9-5,5	3,5-4	2,8-3,2	3,2-4,2	4,9-7,9
C/H	18	7,6-16	14	9-15	11-18	23-31	21-31	12-18	18-31	5,8-14

IV.II Caracterización molecular, distancias genéticas y análisis filogenéticos

En el presente trabajo de tesis se generaron 86 secuencias de la región COI correspondientes a *A. ostrowskiae* (71 de metacercarias y 15 adultos) del sureste de México, El Salvador y Venezuela además de una secuencia de *A. ostrowskiae* de la cuenca del Mississippi E.U.A (Tabla 5). Estas secuencias fueron alineadas con otras secuencias del COI 1 de *D. baeri*, *D. indistinctum*, *D. pseudospathaceum*, *D. mergi*, *D. huronense*, *T. mashonense*, *T. scheuringi*, *T. clavata*, *T. excavata*, *H. triloba* y *Ornithodiplostomum* sp., y tres secuencias de *Posthodiplostomum* sp., que se usaron como grupos externos. En total el alineamiento contiene 104 secuencias con 478 nucleótidos. Los rangos de divergencia genética estimados entre los géneros (*Austrodiplostomum*, *Diplostomum*, *Tylodelphys*, *Hysteromorpha*, *Posthodiplostomum* y *Ornithodiplostomum*) oscilaron entre 11 y 25 %, entre especies del género *Diplostomum* (*D. pseudospathaceum*, *D. mergi*, *D. huronense*) oscilaron del 9 al 15 %, entre especies del género *Tylodelphys* (*T. mashonense*, *T. scheuringi*, *T. clavata*, *T. excavata*) del 11 al 14 % mientras que la divergencia genética entre la 86 secuencias de *A. ostrowskiae* tanto de metacercarias como de adultos colectados del sureste de México, El Salvador y Venezuela, así como la secuencia de un individuo determinado como *A. ostrowskiae* de E.U.A., oscilaron entre el 0 y 0.8%. El análisis filogenético inferido con el método de máxima verosimilitud (ML) genero un árbol que es similar en su topología al árbol obtenido con el método de inferencia bayesiana (IB) (Fig.9). Ambos arboles mostraron que todas las secuencias de *A. ostrowskiae* (71

metacercarias y 15 adultos) y los ejemplares de *A. ostrowskiae* de E.U.A formaron un clado con un soporte de bootstrap y probabilidad posterior Bayesiana respectivamente (100/1.0). En ambos arboles especies y o ejemplares identificados como miembros de los géneros *Tylodelphys*, *Posthodiplostomum* y *Ornithodiplostomum* son parafiléticos (Fig. 9).



Figura 9. Árbol obtenido de los análisis del COI mitocondrial con el método de Inferencia Bayesiana. Los números cercanos a los nodos internos muestran los valores de bootstrap y probabilidades posteriores.

Tabla (7). Distancias genéticas estimadas entre los géneros de la familia Diplostomidae Poirier 1886 analizados en este trabajo.

	<i>Diplostomum</i>	<i>Tylodelphys</i>	<i>Posthodiplostomum</i>	<i>Ornithodiplostomum</i>	<i>Austrodiplostomum</i>	Intraespecífica
<i>Diplostomum</i>	-----					9-15
<i>Tylodelphys</i>	11-17	-----				11-14
<i>Posthodiplostomum</i>	19-23	19-23	-----			16-19
<i>Ornithodiplostomum</i>	20-25	19-25	15-20	-----		12-15
<i>Austrodiplostomum</i>	14-18	14-19	14-23	14-24	-----	0-0.8

IV.II. II Red de haplotipos

La red de haplotipos fue construida con 86 especímenes colectados e identificados en este trabajo como *A. ostrowskiae* además de un solo espécimen identificado como *A. ostrowskiae* de E.U.A. Esta base de datos incluyó un total de 87 taxa con 388 caracteres, el análisis detectó 12 haplotipos. El haplotipo más frecuente (H1, $n = 60$) lo comparten las poblaciones del sureste de México, El Salvador y Venezuela (Figura 10, Tabla 5). El haplotipo (H2, $n = 13$) es compartido entre individuos de dos poblaciones (Tres Palos, Guerrero y Laguna de Coyuca, Guerrero). Los haplotipos H3, H6, H7, H8, H9, H10 y H12, fueron exclusivos de algunas regiones de México. El haplotipo (H4, $n = 3$) es compartido entre individuos de la localidad de Los Chimalapas Oaxaca, México y la Barra de Santiago, El Salvador. El haplotipo (H5, $n = 2$) es compartido entre dos localidades; Tlacotalpan, Veracruz, México y el río Mississippi U.S.A., ambas del Golfo de México. Por último el haplotipo (H11, $n = 2$) lo comparten individuos de Tlacotalpan, Veracruz y Nueva Francia, Chiapas (Fig. 10).

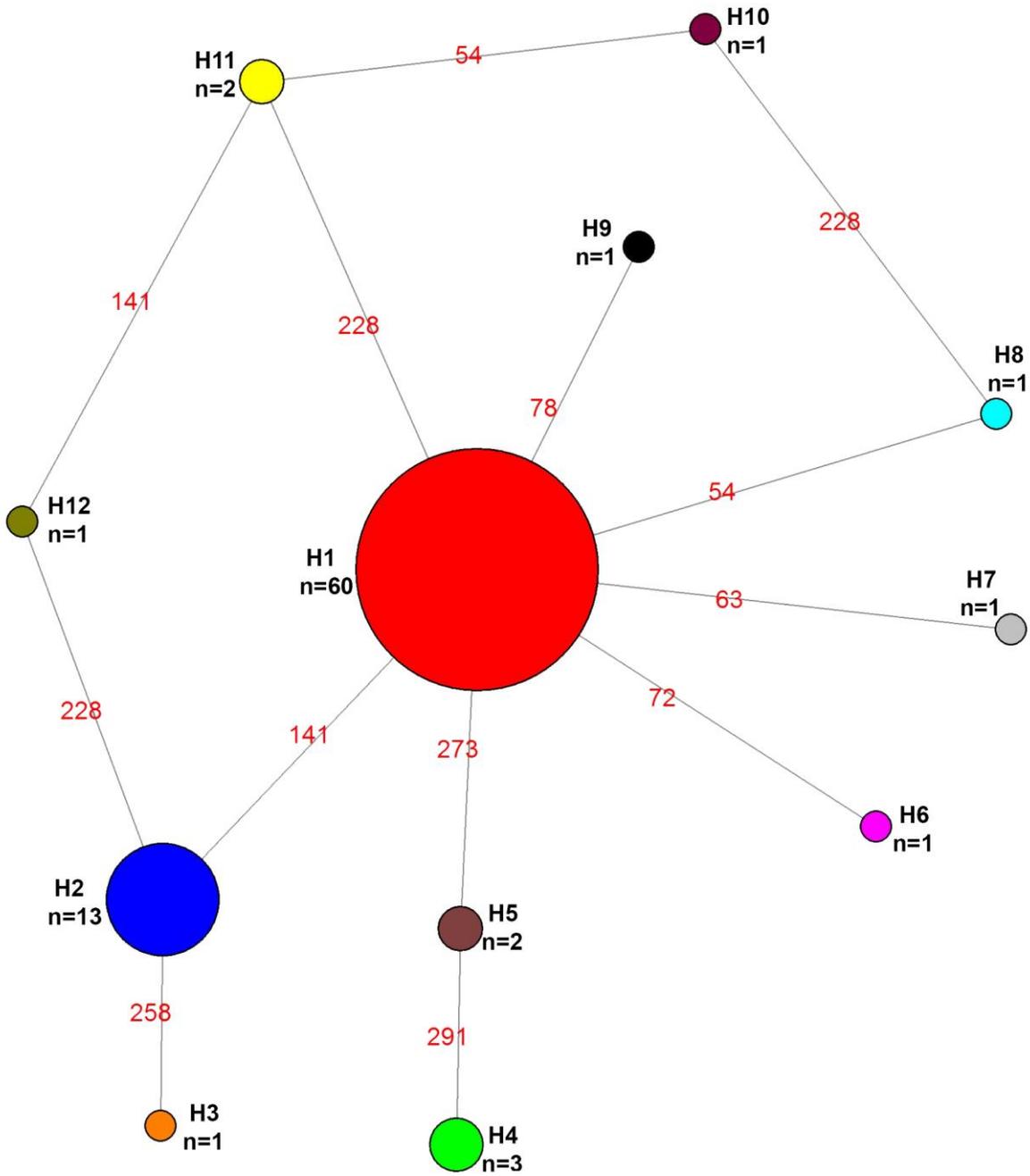


Figura 10. Red de haplotipos con los ejemplares de todas las localidades. El haplotipo más frecuente es el H1 representado de color rojo.

V.DISCUSIÓN

V. I Caracterización morfológica

Frecuentemente existen problemas en la determinación taxonómica del género *Austrodiplostomum* utilizando caracteres morfológicos. Originalmente los adultos y metacercarias de *A. mordax* fueron descritos por Lutz (1928) como *Alaria compactum* del cormorán neotropical en Venezuela. Años más tarde, en 1951, Szidat y Nani encontraron metacercarias y adultos en Argentina y describieron estos como *A. mordax*. Recientemente Dronen en el (2009), reviso la diagnosis del género *Austrodiplostomum* desde un punto de vista morfológico y ecológico considerando *A. compactum* sinónimo de *A. mordax* y con base en especímenes adultos determinados como *Austrodiplostomum* parásitos del intestino del cormorán neártico de doble cresta (*N. auritus*) de E. U. A., describió una nueva especie llamada *A. ostrowskiae*. Morfológicamente los adultos colectados en el presente trabajo fueron identificados como *A. ostrowskiae* por presentar ciegos intestinales que se extienden hasta la mitad del testículo posterior (mientras que en *A. mordax* los ciegos intestinales alcanzan al testículo anterior), testículos en tándem, el ovario es esférico y se encuentra adjunto al testículo anterior, el tamaño del ancho en los testículos son iguales en *A. ostrowskiae* mientras que *A. mordax* el ancho del testículo posterior es el doble de ancho del testículo anterior, el tamaño de los huevos son más pequeños *A. ostrowskiae* midiendo aproximadamente de 90-100 μm . Además de que el tegumento está cubierto de papilas, los cuales Dronen (2009) probablemente los identificó como espinas. (Ver Fig. 6). Las glándulas vitelógenas en *A. ostrowskiae* sobrepasan el órgano

tribocítico mientras que en *A. mordax* estas glándulas no alcanzan el órgano tribocítico. Cabe señalar que estas características morfológicas descritas son similares a las que otros autores han descrito previamente en *A. ostrowskiae* (Ver Tabla 6).

Las metacercarias colectadas en este trabajo también se identificaron como *A. ostrowskiae* y estas se encontraron en el humor acuoso en los ojos de los hospederos infectados (ver Tabla 5) en el sureste de México. Estas metacercarias fueron morfológicamente similares a los adultos incluyendo la presencia de papilas en la parte ventral. Además las metacercarias colectadas en Cumaná, Venezuela de *Cichlasoma* sp., fueron morfológicamente similares a las encontradas en el sureste de México, con la excepción de la presencia de papilas en el tegumento (Ver Fig. 8).

V.II Caracterización molecular, distancias genéticas y análisis filogenéticos

Para establecer el vínculo entre las metacercarias y los adultos se obtuvieron secuencias del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) del DNA mitocondrial y se compararon con otras secuencias publicadas en la base de datos del genbank. Los arboles filogenéticos inferidos con Máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana mostraron que los 86 especímenes identificados como *A. ostrowskiae* más el espécimen de *A. ostrowskiae* de U.S.A formaron un clado con un soporte de apoyo de ML y una probabilidad posterior Bayesiana de 100/1.0. La divergencia genética entre las secuencias obtenidas de las 71 metacercarias y 15 adultos del sureste de México, Salvador y Venezuela, además del ejemplar diagnosticado como *A. ostrowskiae* de los E.U.A oscilaron en un rango de 0-0.8%. Estos bajos

rangos de divergencia genética son similares a los registrados entre otras especies de la familia Diplostomidae. Por ejemplo, la divergencia genética del cox 1 entre especímenes de las especies *Diplostomum pseudospathaceum*, *D. mergi* and *D. baeri* oscilaron en un rango de 0-1.% y entre metacercarias de *Tylodelphys* de peces infectados en Kenya fue de 0-1% (Georgieva *et al.*, 2013; Otachi *et al.*, 2014). En contraste la divergencia genética encontrada entre especies del género *Diplostomum* (*D. pseudospathaceum*, *D. mergi*, *D. huronense*) oscilaron del 9 al 15 %, entre especies del género *Tylodelphys* (*T. mashonense*, *T. scheuringi*, *T. clavata*, *T. excavata*) del 11 al 14 %.

Los individuos identificados como *A. ostrowskiae* fueron analizados a través de una red de haplotipos encontrando un total de 12 haplotipos. El haplotipo más frecuente es H1, la cual es compartido entre todas las poblaciones del sureste de México, El Salvador y Venezuela, sugiriendo flujo génico entre poblaciones. La baja divergencia genética encontrada en todos los ejemplares del género *Austrodiplostomum* en combinación con los árboles filogenéticos inferidos con los métodos de ML e IB, más los datos morfológicos de los adultos y metacercarias, demuestran que todos los especímenes pertenecen al mismo linaje y por lo tanto representan la misma especie. La presencia de adultos de *A. ostrowskiae* en el cormorán de doble cresta y en el cormorán neotropical puede deberse a un evento de host-sharing (compartiendo parásitos) debido a que ambas especies de cormoranes provienen de un ancestro común (Kennedy y Spencer, 2014) o puede ser debido a que estas especies habitan en simpatria en algunas regiones biogeográficas y a que se alimentan de las mismas presas.

VI.CONCLUSIONES

- En el presente trabajo de tesis se identificaron morfológicamente las metacercarias del Salvador, Venezuela, México y adultos de México como *Austrodiplostomum ostrowskiae*.
- Los análisis filogenéticos inferidos con los métodos de ML y IB indican que el género *Austrodiplostomum* representa un linaje independiente dentro de la familia.
- El haplotipo H1 es compartido entre las poblaciones del sureste de México, El Salvador y Venezuela, sugiriendo flujo genético entre poblaciones debido a la migración de sus hospederos definitivos.
- Los análisis moleculares y morfológicos sugieren que los especímenes de que se distribuyen en México pertenecen *Austrodiplostomum ostrowskiae* y que la validez de la otra especie congénica, *A. mordax* se tiene que probar empleando taxonomía integrativa y de mas ejemplares distribuidos en Centro y América del Sur.

VII. LITERATURA CITADA

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

Bandelt, H-J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37– 48.

Caballero, C., y H. W. Winter. 1954. Metacercarias de *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) en peces de agua dulce de México. *Ciencia*, 46: 77–80.

Cheng, C., 1981. Parasitología General. Editorial, A.C. España. 965 pp.

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

Cribb, T.H., R. A. Bray, D. T.J. Littlewood, S.P. Pichelin, y E. A. Herniou. 2001. The Digenea. In Littlewood, D.T.J. and Bray, R.A. (Eds). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, U.K. pp. 168–185.

Cruickshank, R.H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, 7:3–14.

Dubois, G. 1968. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). *Mémoires de la Société neuchateloise des Sciences*, 10:1–258.

Dubois, G. 1970. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). *Mémoires de la Société neuchateloise des Sciences*, 10:259–727.

Dronen, N. O. 2009. *Austrodiplostomum ostrowskiae* n. sp. (Digenea: Diplostomidae: Diplostominae) from the Double-crested Cormorant, *Phalacrocorax auritus* (Phalacrocoracidae) from Galveston, Texas Area of the Gulf of Mexico, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 76: 34–39.

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

Georgieva, S., C. Selbach, A. Faltynkova, M. Soldanova, B. Sures, Skrírnisson y A. Kostadinova. 2013. New cryptic species of the ‘*revolutum*’ group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors*, 64:1–12.

Kennedy, M., y H. G Spencer. 2014. Classification of the cormorants of the world. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79: 249–257.

Lutz, A. 1928. Estudios de Zoología y Parasitología Venezolanas. Published by the author, Rio de Janeiro, Brazil. 133 pp.

Nadler, S. A., y G. Pérez-Ponce de León. 2011. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, 138:1688–1709.

Niewiadomska, K. Family Diplostomidae Poirier, 1886 *In* Gibson, D.I., Jones, A. y Bray, R.A. (Eds). 2002. *Keys to the Trematoda. Vol 1*. CABI Publishing and The Natural History Museum, Wallingford, U.K., pp. 167–196.

Moszczyńska, A., S. A Locke, J.D McLaughlin, D.J Marcogliese, y T. J Crease. 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: 75–82.

Olson, P.D., T.H. Cribb, V. V. Tkach, R.A. Bray y D.T.J. Littlewood. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes:Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33: 733–755.

Ostrowski de Núñez, M. 1977. El ciclo biológico de *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Lutz 1928) Dubois 1970 (*syn Austrodiplostomum mordax* Szidat y Nani 1951). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia Parasitol* 2:1–63.

Ostrowski de Núñez, M. 1982. Die Entwicklungszyklen von *Diplostomum (A.) compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970 und *D. (A.) mordax* (Szidat und Nani, 1951) n. comb. in Sudamerika. *Zoologischer Anzeiger* 208:393–404.

Otachi, E. O., A.E Magana, F. Jirsa, y C. Fellner-Frank. 2014. Parasites of commercially fish from Lake Naivasha, Rift Valley, Kenya. *Parasitology Research*, 113: 1057–1067.

Pérez-del-Olmo, A., S. Georgieva, H. J Pula y A. Kostadinova. 2014. Molecular and morphological evidence for three species of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae), parasites of fishes and fish-eating birds in Spain. *Parasites & Vectors* 7:502.

Pérez-Ponce de León, G., L. García-Prieto y B. Mendoza-Garfias. 2007. Trematode parasites (Platyhelminthes) of wildlife vertebrates in Mexico. *Zootaxa*, 1534,247 pp.

Pineda-López, R., Osorio-Sarabia, J. Almeyda y O. Andrade. 1985. Estudio del control sanitario de la Piscifactoria “Benito Juárez” y en los vasos de las presas de “Malpaso” y “La Angostura” Chiapas. Memoria contrato ep-009-84. Dir. Gral. Acuacultura SEPESCA. pp 309.

Szidat, L., y A. Nani. 1951. Diplostomiasis cerebri del pejerrey. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Zoología*, 1:323–384.

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

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

Violante-González, J., M. García-Varela, A. Rojas-Herrera y S. Guerrero, 2009. Diplostomiasis in cultured and wild tilapia *Oreochromis niloticus* in Guerrero State, México. *Parasitology Research*, 105: 803–807.

VIII. ANEXO

Fijación: Para conservar los ejemplares, se les almacenó en viales con alcohol al 70% a los que se le introdujo una etiqueta con los datos de colecta.

Tinción y montaje: Para llevar a cabo el estudio morfológico del material se procedió a teñirlo y montarlo en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá.

El método empleado fue la tinción de Paracarmín Mayer:

- Los ejemplares conservados en formol al 4 % o en OH al 70% se deshidrataron en alcohol al 96 % durante 15 minutos.
- Se tiñeron con Paracarmín Mayer durante 10 minutos.
- Se lavó con alcohol al 96% para eliminar el exceso de colorante
- Se diferenció con alcohol al 96% acidulado al 2 % con HCl hasta que el parénquima de los ejemplares tomo un color rosa pálido y los órganos internos se observaran definidos.
- Se deshidrato en alcohol absoluto de 15 a 20 minutos.
- Se aclaró en salicilato de metilo o en aceite de clavo.
- Se montó en bálsamo de Canadá , teniendo cuidado de los trematodos quedaran en posición ventral
- Se etiqueto la preparación.