



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
SISTEMÁTICA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CILIADO
ECTOPARÁSITO DE PECES MARINOS *Trichodina rectuncinata* (CILIOPHORA:
TRICHODINIDAE), EN DISTINTAS LOCALIDADES INTERMAREALES DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALMA GABRIELA ISLAS ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. MIROSLAV MACEK
FES, IZTACALA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
SISTEMÁTICA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CILIADO
ECTOPARÁSITO DE PECES MARINOS *Trichodina rectuncinata* (CILIOPHORA:
TRICHODINIDAE), EN DISTINTAS LOCALIDADES INTERMAREALES DE MÉXICO**

TESIS

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

PRESENTA:

ALMA GABRIELA ISLAS ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. MIROSLAV MACEK
FES, IZTACALA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL, 2017



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/180/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del (la) alumno (a) **ISLAS ORTEGA ALMA GABRIELA** con número de cuenta **306161078** con la tesis titulada "**Caracterización morfológica y molecular del ciliado ectoparásito de peces marinos *Trichodina rectuncinata* (Ciliophora: Trichodinidae), en distintas localidades intermareales de México**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR**:

Presidente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Vocal: DR. JOSÉ JAIME ZUÑIGA VEGA
Secretario: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
Suplente: DRA. PAULA SOLEDAD MARCOTEGUI
Suplente: DR. MIROSLAV MACEK

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 6 de marzo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/grf*

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado

Al proyecto “Análisis de patrones biogeográficos y gradientes de diversidad de ácaros acuáticos (Trombidiformes; Hydrachnidiae) de la Península de Baja California” PAPIIT-IN218414 de la DGAPA-UNAM a cargo del Dr. Gerardo Rivas Lechuga por el apoyo económico en la salida a campo realizada al estado de Sonora.

Al Dr. Rogelio Aguilar Aguilar, por ser mi tutor de tesis, por compartirme mucho de su conocimiento. Por todos sus consejos, comentarios y sugerencias durante mis estudios. Gracias por todo el apoyo y por confiar en mí.

A los Doctores: Gerardo Pérez Ponce de León y Miroslav Macek por ser parte de mi comité tutorial, por abrirme las puertas de sus laboratorios para poder desarrollar mi proyecto de maestría y por sus valiosos comentarios en el desarrollo de este proyecto.

Agradecimientos Personales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi alma máter, por todas las oportunidades que me ha brindado, por ser el lugar en donde más he aprendido, tanto personal como académicamente.

A los doctores Martín García Varela, Jaime Zuñiga Vega, Paula Marcotegui, Gerardo Pérez Ponce de León y Misroslav Macek por ser parte de mi jurado, por sus comentarios y consejos para mejorar el escrito.

Al Dr. Gerardo Rivas por su apoyo incondicional, por toda la ayuda en el campo, por los consejos y sugerencias al proyecto, muchas gracias.

A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias del Instituto de Biología por apoyarme en la toma de fotografías y medidas en el microscopio invertido. Así como a la M. en C. Laura Márquez por la secuenciación del ADN.

A la Dra. Norma López y al M. en C. Carlos Candelaria, de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Zihuatanejo, UNAM, por su apoyo en la salida al campo realizada en el estado de Guerrero.

Al M. en C. David Hernández Mena, muchas gracias por toda la ayuda en las técnicas en el laboratorio y los análisis filogenéticos, por todo el tiempo invertido en este proyecto.

Al M. en C. Héctor Espinosa y a la Biól. Christian Lambarri de la Colección Nacional de Peces por su ayuda en la identificación de los peces.

Al Dr. Sergio Martorelli y a la Dra. Paula Marcotegui por todo su apoyo en la realización de las técnicas morfológicas durante la estancia de investigación en el Laboratorio de Parásitos de Peces, Crustáceos y Moluscos en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), en la Universidad de La Plata, Argentina.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Ana, Nallely, Ricardo, Omar por todo su apoyo y consejos durante el posgrado.

A mis amigos de la Facultad: Ana, Bere, Ángel, Rubén por siempre estar conmigo apoyándome y animándome, pese a lo complicado que resultaba organizarnos para vernos.

A Regina, por seguir siendo parte de mi vida, por todos los años de complicidad y de apoyo incondicional. Gracias por ser una extraordinaria amiga y hermana.

Dedicatoria

A mi familia, mi pilar más grande en la vida.

A mis padres, a mi mamá, que siempre tiene una palabra de aliento y me motiva para seguir adelante cuando más lo necesito. A mi papá, que siempre está conmigo, que confía y apoya cada una de mis decisiones. Han sido parte fundamental de todos mis logros, y son mi ejemplo más grande a seguir.

A mis hermanos, Osiris y Jorge. Que siempre han visto por mí, siempre me han cuidado y consentido. Y que agradezco a la vida por tenerlos conmigo.

A mis sobrinos, Tobías y Javier. Que cambiaron mi vida con su llegada y la han llenado de felicidad. Gracias por ser de mis motores más grandes.

A mi Bishkish, a mi amor. A quien admiro y quiero profundamente, quien también ha cambiado mi vida y la ha llenado de amor, de ilusiones y de sueños en pareja. Gracias por tanto, gracias por confiar, apoyarme y siempre creer en mí. Te amo!

Y al resto de mi familia: Yaya, Ángeles, abuelos, tíos, primos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Características generales del Phylum Ciliophora.....	4
Sistemática de ciliados.....	5
Familia Trichodinidae.....	6
Problemas taxonómicos de la familia Trichodinidae.....	8
<i>Trichodina rectuncinata</i>	10
OBJETIVOS.....	19
Objetivos generales.....	19
Objetivos particulares.....	19
HIPÓTESIS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Estudio morfológico.....	20
Estudio molecular.....	23
RESULTADOS.....	26
Resultados morfológicos.....	26
Resultados moleculares.....	39
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55
APENDICE I.....	73
APENDICE II.....	74

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

- 1a Esquema general del cuerpo de *Trichodina*
- 1b Partes esqueléticas del disco adhesivo de *Trichodina*
- 2 Medidas del denticulo de *Trichodina*
- 3 Esquema para ilustrar la estructura del denticulo de *Trichodina* y la construcción de los ejes X y Y
- 4 Distribución de *Trichodina rectuncinata*
- 5 Formas de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* del presente trabajo
- 6 Variaciones de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de San Carlos, Sonora
- 7 Variaciones de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de San Carlos, Sonora
- 8 Variaciones de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de "El Palmar", Guerrero
- 9 Variaciones de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de Cuatun Alco, Oaxaca
- 10 Variaciones de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de Cuatun Alco, Oaxaca
- 11 Árbol de inferencia bayesiana
- 12 Árbol inferido con máxima verosimilitud

Cuadros

- 1 Hospederos y localidades en donde se ha registrado *Trichodina rectuncinata* en el mundo
- 2 Especies de peces recolectados en cada localidad
- 3 Pasos de la amplificación mediante PCR
- 4 Secuencias de tricodínidos obtenidos de la base de datos del GenBank
- 5 Número de secuencias por hospedero y localidad

- 6 Medidas de *T. rectuncinata* en San Carlos, sonora
- 7 Medidas de *T. rectuncinata* en "El Palmar", Guerrero
- 8 Medidas de *T. rectuncinata* en Cuatun Alco, Oaxaca
- 9 Divergencias genéticas entre especies de los géneros *Trichodina* y *Trichodinella*
- 10 Divergencias genéticas entre *Trichodina rectuncinata*
- 11 Divergencias genéticas entre *Trichodina rectuncinata* del presente estudio y especies de los géneros *Trichodina* y *Trichodinella*

RESUMEN

Trichodina rectuncinata es un ciliado ectoparásito de peces ampliamente distribuido en el mundo, y en México esta especie se ha registrado recientemente. Los caracteres diagnósticos más importantes de esta especie son una cuchilla triangular y una cavidad triangular o piriforme en el centro de la cuchilla. Dichos caracteres presentan una amplia variación incluyendo sus dimensiones. Debido a esta variación los caracteres moleculares representan una excelente oportunidad para integrarlos a dicho estudio y corroborar la determinación de esta especie utilizando taxonomía integrativa. El estudio morfológico, en combinación con los datos genéticos, nos permitirá probar si se trata de un complejo de especies, o bien se trata de una especie con amplia variabilidad morfológica intraespecífica. En este trabajo analizamos la diversidad morfológica y genética de tres poblaciones de *T. rectuncinata* distribuidas a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, mediante el estudio de caracteres morfológicos diagnósticos y de fragmentos de secuencias del gen nuclear 18S.

Los ejemplares de *T. rectuncinata* mostraron variabilidad morfológica, sobre todo en la forma del dentículo. Se registraron ocho formas diferentes en los dentículos: cinco formas de los organismos de San Carlos, Sonora, dos formas diferentes entre los tricodínidos de “El Palmar”, Guerrero, pero similares a dos de las formas de San Carlos y cuatro formas diferentes entre los organismos de Cuatun Alco, Oaxaca siendo similar una de ellas con una de las formas de San Carlos. Las poblaciones de *Trichodina rectuncinata* presentaron una diversidad genética baja para el gen 18S que conduce a considerarlas como parte de la misma especie. Esta uniformidad genética contrasta con la diversidad morfológica, la cual se evidencia en la forma y tamaño del dentículo de las

poblaciones. Los análisis filogenéticos inferidos con el método de Bayes mostraron que *Trichodina rectuncinata* se agrupan en su solo clado con el valor máximo (1.0) como soporte y el análisis de máxima verosimilitud mostró un clado similar, bien sustentado por el remuestreo de bootstrap. Ambos árboles están en correspondencia con los resultados de divergencia genética, mostrando que nuestras poblaciones pertenecen a la misma especie.

El análisis permite corroborar la idea de que *T rectuncinata* es una especie altamente generalista, sin embargo, a pesar de poder alojarse en hospederos poco relacionados filogenéticamente, aparentemente existe una especificidad ecológica hacia peces con hábitos bentónicos, habitantes de la zona intermareal.

ABSTRACT

The ciliate ecto-parasitic species *Trichodina rectuncinata* has a worldwide distribution, and has been recently reported from Mexican intertidal localities. The most relevant diagnostic features of this ectoparasite are a triangular blade of denticle in adhesive disc possessing a triangular or piriform cavity, however, a high level of variability of these characters has been reported in the literature. The use of an integrative taxonomy approach, through the comparison of morphological features along with the analysis of 18S rRNA gene sequence data obtained from three populations of *T. rectuncinata* collected across the Mexican Pacific Ocean, would allow us to determine if individuals of these populations belong to a single but morphologically variable species, or if these populations are actually a species complex.

Eight different morphotypes were observed. Five of these were determined from the individuals from San Carlos, Sonora; two of these morphotypes were also collected and observed in “El Palmar”, Guerrero; while in Cuatun Alco, Oaxaca, four morphotypes were observed, one of the similar to the other found in San Carlos, and three more only observed in the locality. Despite this morphological variability, the genetic divergence among the populations was very low, and the Bayesian and Maximum likelihood analyses gather the sequences in the same clade with a strong nodal support. Thus, the genetic evidence show that the analyzed populations are members of a single, genetically uniform species, with generalist habits, but strongly associated to benthic intertidal fishes.

INTRODUCCIÓN

Características generales del Phylum Ciliophora

Los organismos unicelulares pertenecientes al Phylum Ciliophora (ciliados) son componentes importantes de la biodiversidad en ambientes acuáticos por diversas razones, principalmente por su posición en las redes alimentarias que vinculan el flujo de nutrientes entre los microorganismos y organismos más grandes como los metazoarios. Parte de esa biodiversidad por lo general se oculta debido a la dificultad de su estudio; al ser organismos microscópicos, la correcta identificación a nivel de especie puede ser complicada (Rossi et al., 2016).

Los ciliados se caracterizan brevemente por tres características principales: (1) por la presencia de cilios o estructuras ciliares compuestas en alguna etapa de su ciclo de vida, variables en número y en arreglo, distribuidos sobre la superficie corporal y derivados del cinetosoma; (2) por la posesión de dos tipos de núcleo; macronúcleo y micronúcleo, el primero controla las funciones fisiológicas y bioquímicas de la célula y el segundo actúa como una reserva de la línea germinal, por lo cual son heterocarióticos. Y (3) por el proceso sexual de conjugación en el cual los organismos típicamente se fusionan temporalmente para intercambiar núcleos gaméticos (Lynn, 2008). Otra característica importante es la presencia de una corteza o capa cortical con dos componentes, la película y las cinétidas (Hausmann y Hülsmann, 1996), dicha película incluye a la membrana celular y por debajo de ella se ubican una serie de alveolos, por lo cual se incluyen en el taxón Alveolata (Adl et al., 2012; Mayén-Estrada et al., 2014).

Sistemática de ciliados

Corliss (1974) dividió la historia de la sistemática de los ciliados en cuatro periodos: (1) la etapa de descubrimiento (1880 – 1930), periodo en donde los ciliados fueron clasificados con base en las diferencias fácilmente visibles de la localización y composición de la ciliatura externa; (2) la etapa de la explosión (1930 – 1950), periodo que estuvo marcado por el gran crecimiento en número de especies y por el incremento en el interés de diversos investigadores en este grupo; (3) la etapa de la infraciliatura (1950 – 1970) en donde se comienza a usar la impregnación argéntica como una técnica citológica más adecuada y eficaz para la determinación de especies; el resultado de esta técnica se vio reflejado en reagrupamientos importantes de muchos taxones. En este periodo también se empiezan a explorar nuevos nichos ecológicos. (4) La etapa de la ultraestructura (1970 – a la fecha) se caracteriza por el uso de microscopía electrónica, lo que permitió conocer la estructura de muchos orgánulos, esto brindó información importante sobre los grados de diferencia y similitud entre las especies de ciliados. Todos estos periodos demuestran que el estudio de los ciliados se ha basado principalmente en caracteres morfológicos. Actualmente, es oportuno adicionar los datos ultraestructurales y moleculares conocidos a la fecha de los diferentes grupos, en los que se basa la propuesta más reciente de clasificación de eucariontes con énfasis en protistas (Adl et al., 2012).

La utilización de datos moleculares en el estudio de protistas se ha reflejado en una gran cantidad de estudios sobre la diversidad genética y su distribución geográfica, en donde se debaten dos hipótesis respecto a la distribución de los microorganismos; la hipótesis de que son cosmopolitas, que postula un alto flujo génico, baja diversidad, y la

hipótesis del endemismo, que sugiere una alta diversidad y flujo génico restringido geográficamente (Ryneckson y Armbrust, 2004; Katz et al., 2005; Barth et al., 2006; Finlay et al., 2006; Šlapeta et al., 2006; Amato et al., 2007; Bass et al., 2007; Darling et al., 2007; Foissner et al., 2007; Gentekaki y Lynn, 2009; 2010, 2012; Lowe et al., 2010; Penna et al., 2010; Di Giuseppe et al., 2013; Heger et al., 2013). Las evidencias sugieren que la diversidad morfológica y la genética podrían estar desacopladas en algunos grupos de protistas, incluyendo a los ciliados y que estos grupos podrían ser más diversos de lo que implica su morfología. Muchos de estos estudios han demostrado genéticamente la existencia de diversos linajes de especies con morfología aparentemente homogénea. Y que a pesar de que la mayoría podrían estar ampliamente distribuidos, hay casos en donde están restringidos geográficamente (Gentekaki y Lynn, 2010, 2012).

Familia Trichodinidae

Dentro de los ciliados se encuentra la familia Trichodinidae, la cual contiene una gran cantidad de especies parásitas que se incluyen en los géneros *Trichodina* Ehrenberg, 1838, *Vauchomia* Müller, 1938, *Trichodinella* (Raabe, 1950) Šrámek-Hušek, 1953, *Semitrichodina* Kazubski, 1958, *Tripartiella* Lom, 1959, *Dipartiella* Stein, 1961, *Paratrichodina* Lom, 1963, *Trichodoxa* Sirgel, 1983, *Hemitrichodina* Basson y van As, 1989, *Pallitrichodina* van As y Basson, 1993 y *Heterobladetrichodina* Hu, 2011 (Hu, 2011). Los tricodínidos (Trichodinidae) son uno de los grupos más diversos y más ampliamente distribuidos de ectoparásitos (algunas veces endoparásitos). Comúnmente se encuentran asociados a la piel o branquias de peces, dentro de la vejiga urinaria de anfibios o al tegumento y el conducto genital de diversos invertebrados (Lom y Dyková, 1992), en ambientes de agua dulce, marinos y eurihalinos. Los tricodínidos marinos viven como

comensales o parásitos en varios hospederos, como ctenóforos, equinodermos, equiúridos, moluscos y peces (Dobberstein y Palm, 2000). Muchas de las especies se han descrito de la superficie del cuerpo y/o de las branquias de peces teleósteos (Grupcheva et al., 1989; Loubser et al., 1995; Su y White, 1995; Xu et al., 1999; Dobberstein y Palm, 2000; Asmat, 2001; Xu et al., 2001, 2002; Asmat et al., 2003; Özer y Öztürk, 2004; Xu, 2007; Khan et al., 2008; Shwani et al., 2010; Marcotegui y Martorelli, 2009; Özer et al., 2015).

Las tricodinas tienen cuerpo en forma de copa, cubierto por una membrana delgada, llamada periciclo (Figura 1a). Su tamaño puede variar de 20 a 100 μ de diámetro (van As y Basson, 1987). En la zona adoral se encuentran los cilios, usados para la alimentación y locomoción. En el lado opuesto del cuerpo se ubica una de las características taxonómicas más importantes de la familia; el disco adhesivo, que consiste de dentículos y membranas estriadas, normalmente oscurecidas por el periciclo (Figura 1b) (Basson y van As, 1995). La familia Trichodinidae se diferencia por la morfología de los dentículos en el disco adhesivo y la longitud de la espiral que forman los cilios adorales espirales. Los dentículos son estructuras proteínicas, que se conectan con la membrana estriada por medio de microfibrillas (Kruger et al., 1993). La forma de los dentículos consiste de cuchilla, parte central y rayo (Figura 2). Las cuchillas pueden ser rectas o curvas; muestran diferentes formas y tamaños incluso en el mismo anillo denticular del tricodínido (Basson y van As, 1989; Hu, 2011), mientras que los rayos pueden ser de diferentes longitudes, en forma de barra, de espina, de aguja o de remo (Basson y van As, 1989). La reproducción es por fisión binaria, pero bajo ciertas condiciones se ha observado la conjugación (van As y Basson, 1987).

Muchas especies de *Trichodina* son patógenas, a la enfermedad que ocasionan se le conoce como trichodinosis (Durborow, 2003). Algunos estudios han registrado que los tricodinidos pueden causar daños severos y mortalidad en poblaciones de peces juveniles y adultos, en especial en peces de acuicultura (Van As y Basson, 1987). Debido a su transmisión directa, los tricodinidos pueden invadir a su hospedero en poco tiempo, en especial a peces que se encuentran en condiciones menos óptimas. En ese caso, se alimentan de las células de desecho del hospedero. Normalmente los tricodinidos se alojan en piel y branquias dado que las branquias de los peces entran en contacto directo con el ambiente, estas proporcionan un nicho único para muchos parásitos que tienen ciclo de vida simple, especialmente ciliados y crustáceos, así como bacterias presentes en el agua (Wlasow et al., 2003). La infestación por tricodinidos puede derivar en daño en piel y branquias (Sleigh, 1991), e incluso provocar la muerte del huésped (Hoffman, 1999).

Problemas taxonómicos de la familia Trichodinidae

El estudio taxonómico de la familia Trichodinidae, como el de la mayoría de los ciliados, ha sido meramente morfológico. Con el fin de proporcionar características específicas uniformes para las descripciones taxonómicas de tricodínidos, Lom (1958) propuso el uso de un conjunto de características taxonómicas estándar basadas en especímenes impregnados, con la técnica de impregnación en Plata de Klein, la cual revela detalles del disco adhesivo. Con base en esta propuesta, van As y Basson (1989) propusieron un método para describir la forma de los dentículos basado en la construcción de tres ejes que se extienden desde el centro del disco adhesivo a la punta de los dentículos (Figura 3), esto proporciona puntos fijos de referencia que ayudan a

una descripción más precisa de los elementos del dentículo. Para ellos, se requiere de una ampliación de los dentículos por medio de un microscopio o microfotografías. Sin embargo, la similitud morfológica de muchas especies conduce frecuentemente a confusiones taxonómicas ya sea a nivel intraespecífico tal como algunos autores han mencionado para *Trichodina diaptomi*, *T. heterodentata*, *T. rectuncinata*, *T. jadránica* (Grupcheva et al., 1989; van As y Basson, 1992; Loubser et al., 1995; Silva-Briano et al., 2011) o interespecífico, por ejemplo para las especies *T. acuta*, *T. nigra*, *T. matsui*, *T. pagoda* (Basson y van As, 1994; Dove y O'Donoghue, 2005; Tang et al., 2016).

Este tipo de problemas taxonómicos no son exclusivos de los protistas, por lo que recientemente se ha sugerido el uso de herramientas moleculares (Xu et al., 2001; Zhan et al., 2012; Tang et al., 2016) que contribuyan a hacer más clara la delimitación entre especies en taxones tan diversos como crustáceos del género *Helice* (Yin et al., 2009); reptiles del género *Hemidactylus* (Leaché y Fujita, 2010); medusas del género *Pocillopora* (Pinzón y LaJeunesse, 2011); acantocéfalos del género *Neochinorhynchus* (Martínez-Aquino et al., 2009); digéneos del género *Crassicutis* (Razo-Mendivil et al., 2010); algas pardas del género *Dictyota* (Tronholm, 2010); plantas del género *Hedera* (Valcárcel y Vargas, 2010); y hongos del género *Lasiosphaeria* (Miller y Huhndorf, 2004).

En este sentido, la aplicación de técnicas moleculares en ciliados es aún incipiente y los pocos estudios disponibles no siempre abordan el mismo objetivo. Por ejemplo, se ha utilizado el gen 18S del DNA nuclear de algunos integrantes de la familia Trichodinidae para evaluar o reevaluar la monofilia del orden Peritricha empleando métodos de inferencia filogenética, principalmente máxima parsimonia e inferencia bayesiana (Hertel et al., 2004; Gong et al., 2006, 2010; Zhan et al., 2009, 2012; Tang et

al., 2013). El tema de la delimitación de especies de tricodinídeos basada en estudios de biología molecular ha sido abordado solo hasta muy recientemente por Tang y colaboradores (2016), quienes realizaron una caracterización tanto morfológica como molecular de la especie *Trichodina pseudoheterodontata* en Chongqing China, presentando un análisis de divergencia del gen 18S entre esta especie y otras especies del género. Siendo este el único trabajo publicado hasta la fecha en donde se establece una caracterización molecular de una especie de *Trichodina*.

Trichodina rectuncinata

Trichodina rectuncinata es uno de los tricodinidos más ampliamente distribuidos en el mundo (Figura 4), parasitando branquias de peces marinos; ha sido registrada por diferentes autores en más de 20 especies de peces hospederos de alrededor de 11 familias (Cuadro 1) (Xu et al., 2001). En México esta especie se ha registrado hasta recientemente (Islas-Ortega, 2013; Aguilar-Aguilar et al., 2016). Los caracteres diagnósticos más significativos de esta especie son una cuchilla triangular y una cavidad triangular o piriforme en el centro de la cuchilla (Loubser et al., 1995; Xu et al., 2001), características que presentan una gran cantidad de variación en forma y dimensiones (Grupcheva et al., 1989; Loubser et al., 1995; Xu et al., 2001).

Dada esta variación en los caracteres diagnósticos de *Trichodina rectuncinata*, los caracteres moleculares ofrecen una herramienta alternativa para corroborar la uniformidad de la especie amén de los caracteres morfológicos. El estudio morfológico, en combinación con los datos genéticos, nos permitirá demostrar si se trata de más de una especie o de una especie con variabilidad morfológica intraespecífica.

Un estudio donde se integren análisis morfológicos y moleculares permitirá aportar evidencia para tomar decisiones sobre la identidad taxonómica de organismos poco abordados en la literatura, que podrá ser utilizada para realizar inferencias sobre su diversidad a nivel mundial.

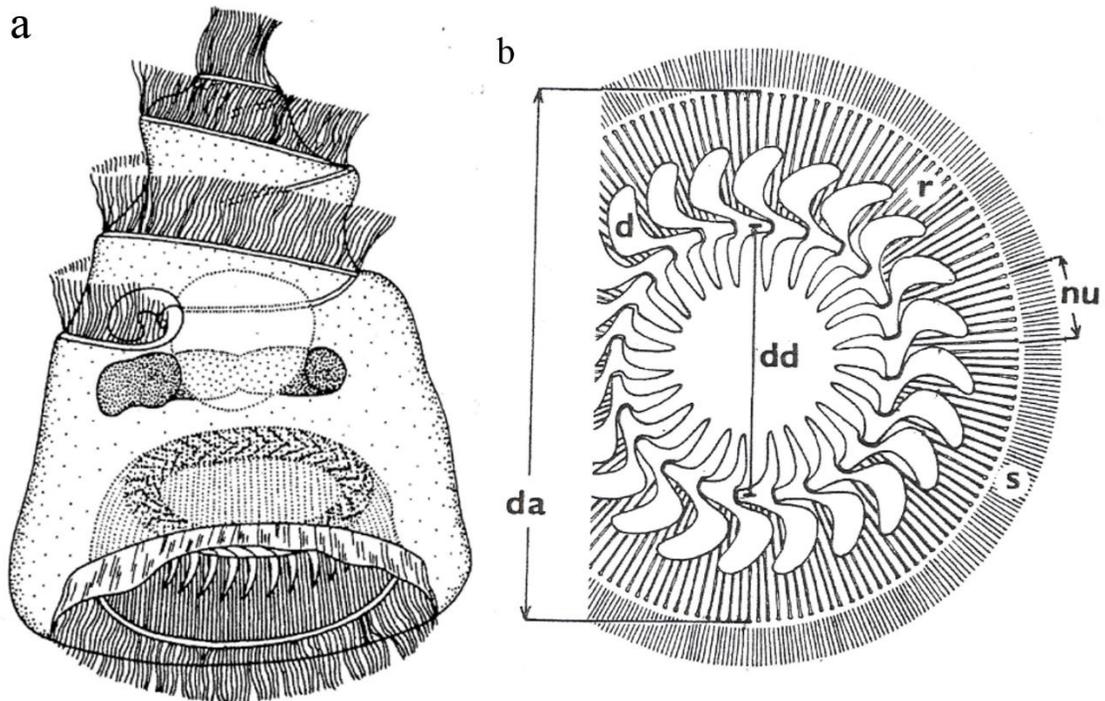


Figura 1a. Esquema general del cuerpo de *Trichodina*. **1b.** Partes esqueléticas del disco adhesivo de *Trichodina*. **s.** varillas en la membrana del borde. **r.** estriaciones radiales. **nu.** Número de estriaciones radiales entre denticulos. **d.** denticulos. **dd.** Diámetro del anillo denticular. **da.** Diámetro del disco adhesivo (Tomada de Lom y Diková, 1992).

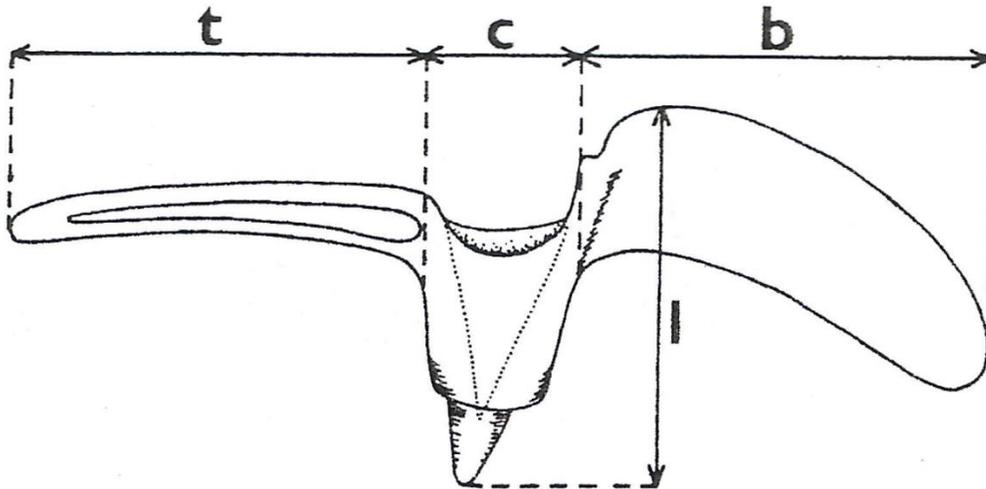


Figura 2. Medidas del denticulo de *Trichodina*. **t.** Longitud del rayo. **c.** Anchura de la parte central. **b.** Longitud de la cuchilla. **l.** Ancho del denticulo. **t+c+b.** *Span* (Lom y Diková, 1992).

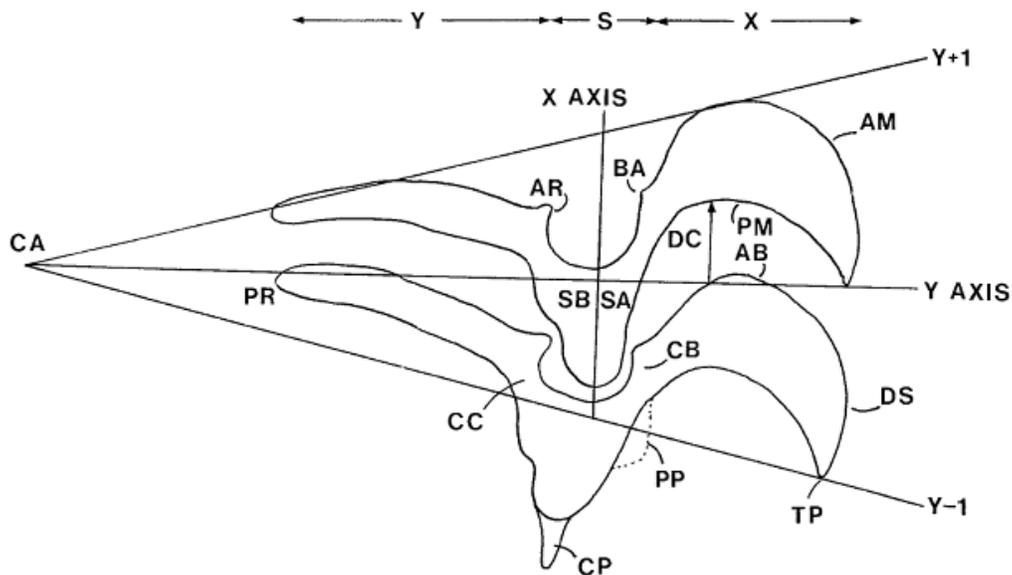


Figura 3. Esquema para ilustrar la estructura del denticulo de *Trichodina* y la construcción de los ejes *X* y *Y* como referencia para la descripción de los denticulos. **AB.** Ápice de la cuchilla. **AM.** Margen anterior de la cuchilla. **AR.** Apófisis del rayo. **BA.** Apófisis de la cuchilla. **CA.** Centro del disco adhesivo. **CB.** Sección que conecta la cuchilla con la parte central. **CC.** Sección que conecta la parte central con el rayo. **CP.** Parte cónica central. **DC.** Parte más profunda de la curva. **DS.** Superficie distal de la cuchilla. **PM.** Margen posterior de la cuchilla. **PP.** Proyección posterior. **PR.** Punto del rayo. **S.** Parte Central. **SA.** Sección de la parte central por encima del eje *X*. **SB.** Sección de la parte debajo del eje *X*. **TP.** Punto tangente. **X.** Cuchilla. **Y.** Rayo (Tomada de Xu et al., 1999b).



Figura 4. Distribución de *Trichodina rectuncinata*. **A.** Distribución mundial. **B.** Localidades del presente estudio.

Cuadro 1. Hospederos y localidades en donde se ha registrado *Trichodina rectuncinata* en el mundo.

Hospedero	Familia	Localidad	Referencia
<i>Melichthys vidua</i>	Balistidae	Moorea, Polinesia Francesa	Palm (2011)
<i>Aidablennius sphyinx</i>	Blenniidae	Balchik, Mar Negro	Grupcheva et al. (1989)
<i>Blennius pholis</i>	Blenniidae	Dinard, costa británica de Francia	Lom (1970)
<i>Chalaroderma ocellata</i>	Blenniidae	Mar Adriático	Raabe (1958 en Lom, 1970)
		Mar Adriático	Haider (1964 en Lom, 1970)
		Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitzky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Entomacrodus cadenati</i>	Blenniidae	Bahía de Dakar, Senegal	Loubster et al. (1995)
<i>Parablennius gattorugine</i>	Blenniidae	Banyuls, Francia	Grupcheva et al. (1989)
<i>Parablennius parvicornis</i>	Blenniidae	Bahía de Dakar, Senegal	Loubster et al. (1995)
<i>Parablennius sanguinolentus</i>	Blenniidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970); Zaika, (1966 en Özer et al., 2015)
		Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitzky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Parablennius tentacularis</i>	Blenniidae	Balchik, Mar Negro	Grupcheva et al. (1989)
		Mar Adriático	Raabe (1958 en Lom, 1970)
		Mar Adriático	Haider (1964 en Lom, 1970)
		Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitzky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
		Balchik, Mar Negro	Grupcheva et al. (1989)
		Mar Adriático	Grupcheva et al. (1989)
<i>Salaria pavo</i>	Blenniidae	Mar Adriático	Raabe (1958 en Lom, 1970)

Cuadro 1. Continuación.

Hospedero	Familia	Localidad	Referencia
		Mar Adriático Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Haider (1964 en Lom, 1970) Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Artedius fenestralis</i>	Cottidae	Costa del pacífico, Canadá California	Lom (1970) Love y Moser (1976)
<i>Merlangius merlangus</i>	Gadidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
<i>Tomocodon myersi</i>	Gobiesocidae	Zihuatanejo, Guerrero, México	Aguilar-Aguilar et al. (2016)
<i>Deltentosteus quadrimaculatus</i>	Gobiidae	Banyuls, Francia	Grupcheva et al. (1989)
<i>Gobius cobitis</i>	Gobiidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Gobius niger</i>	Gobiidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Neogobius melanostomus</i>	Gobiidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Gobiidae	Mar Adriático Mar Adriático Mar Adriático	Raabe (1958 en Lom, 1970) Haider (1964 en Lom, 1970) Grupcheva et al. (1989)

Cuadro 1. Continuación.

Hospedero	Familia	Localidad	Referencia
		Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Hexagrammos agrammus</i>	Hexagrammidae	Mar Amarillo	Xu et al. (2001)
<i>Centrolabrus exoletus</i>	Labridae	Costas de Escocia	Treasurer (1997)
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	Labridae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970); Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
<i>Labrus bergylta</i>	Labridae	Costas de Escocia	Treasurer (1997)
<i>Symphodus cinereus</i>	Labridae	Mar Negro, costas de Rumania	Lom (1962)
		Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970); Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
		Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Symphodus melops</i>	Labridae	Costas de Escocia	Treasurer (1997)
<i>Symphodus ocellatus</i>	Labridae	Balchik, Mar Negro	Grupcheva et al. (1989)
<i>Symphodus roissali</i>	Labridae	Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970); Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
		Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Symphodus rostratus</i>	Labridae	Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag; Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970); Zaika (1966 en Özer et al., 2015)

Cuadro 1. Continuación.

Hospedero	Familia	Localidad	Referencia
<i>Symphodus tinca</i>	Labridae	Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitsky, Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
		Mar Negro	Zaika (1966 en Lom, 1970)
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Lateolabracidae	Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag	Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
		Costas de Escocia	Treasurer (1997)
		Costas de Qingdao	Xu et al. (2000)
<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Lotidae	Mar Amarillo	Xu et al. (2001)
		Bohai Sea	Xu et al. (2001)
		Mar Negro, costas de Rumania	Lom (1962)
<i>Pseudophycis bachus</i>	Moridae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag	Zaika (1966 en Özer et al., 2015)
		Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Mullus barbatus ponticus</i>	Mullidae	Tasmania	Nowak et al. (2004)
<i>Sciaena umbra</i>	Sciaenidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Scorpaena porcus</i>	Scorpaenidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitsky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)

Cuadro 1. Continuación.

Hospedero	Familia	Localidad	Referencia
<i>Serranus scriba</i>	Serranidae	Sebastopol, Rusia; Constanza, Rumania; Karadag; Golfo de Karkinitzky; Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Hippocampus guttulatus</i>	Syngnathidae	Francia (costa del Atlántico) Balchik, Mar Negro	Lom (1970) Grupcheva et al. (1989)
<i>Syngnathus abaster</i>	Syngnathidae	Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Syngnathus typhle</i>	Syngnathidae	Balchik, Mar Negro Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Grupcheva et al. (1989) Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Syngnathus variegatus</i>	Syngnathidae	Balchik, Mar Negro Sebastopol, Rusia, Constanza, Rumania, Karadag, Golfo de Karkinitzky, Estrecho de Kerch	Grupcheva et al. (1989) Gaevskaya et al. (1975 en Özer et al., 2015)
<i>Enneanectes reticulatus</i>	Tripterygiidae	San Carlos, Sonora, México	Aguilar-Aguilar et al. (2016)

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Analizar la diversidad morfológica de tres poblaciones de *Trichodina rectuncinata* distribuidas a lo largo de la costa del Pacífico mexicano.
- Explorar la diversidad genética en estas poblaciones a través del análisis de secuencias parciales del gen ribosomal 18S.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Registrar distintas poblaciones de *Trichodina rectuncinata* en tres localidades del país, describiendo las especies de hospederos en las que el parásito se encuentre y registrando además aquellas en las que no aparezca.
- Realizar la caracterización morfológica y molecular de cada población.
- Corroborar la existencia de una sola especie a nivel molecular.

HIPÓTESIS

- Las distintas poblaciones de *T. rectuncinata* recolectadas en peces marinos de las tres localidades intermareales de México corresponden a la misma especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron peces marinos de diversas especies (Cuadro 2) en tres localidades intermareales de México (Figura 4B). Los peces se capturaron vivos mediante el empleo de redes de acuario. Estos se conservaron vivos hasta su estudio y posteriormente se sacrificaron por descerebración, tras lo que comenzó el estudio con el lavado de branquias de cada pez, que se realizó con agua destilada. Este lavado se revisó al microscopio óptico para corroborar la presencia de ciliados, una vez observados se realizó una lámina para verificar que los ejemplares correspondieran con la morfoespecie *Trichodina rectuncinata*. Posteriormente, dada la falta de un protocolo, se exploraron los siguientes métodos de fijación para intentar obtener ejemplares mejor impregnados: se colocó una gota del lavado de branquias en cada portaobjeto, a varias gotas se les agregó una gota de alcohol al 96%, a otras se le agregó una gota de Bouin, a otras una gota de formol a temperatura ambiente, a otras gotas solo se les acercó a los gases de formol en ebullición hasta que se secaran, y finalmente otras gotas del lavado se colocaron en portaobjetos con albumina; todas las láminas realizadas con los diferentes métodos se dejaron secar, todo esto para el estudio morfológico.

El resto de la muestra se fijó en viales con alcohol absoluto para el análisis molecular.

ESTUDIO MORFOLÓGICO

La técnica utilizada para resaltar características diagnósticas de los ciliados es la de impregnación de Plata “en seco” de Klein (Apéndice 1); tal como describe Lom (1958). La aplicación de la técnica resultó en ejemplares poco impregnados, por lo que se recurrió a ajustarla basándose en la modificación al protocolo mencionada por Martorelli

y colaboradores (2008), quienes mejoran la impregnación mediante la adición de productos químicos utilizados en el revelado fotográfico. Esta técnica se ajustó para *T. rectuncinata* en una estancia de investigación en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), en la Universidad de La Plata, Argentina, bajo la supervisión de los doctores Paula Marcotegui y Sergio Martorelli, ensayando diferentes tiempos de exposición a cada químico, así como la proporciones de estos, para optimizar el proceso de revelado de los ejemplares. La técnica de impregnación ajustada se describe a continuación.

TÉCNICA DE IMPREGNACIÓN DE PLATA “EN SECO” DE KLEIN MODIFICADA

Las preparaciones secadas al aire con los diferentes métodos de impregnación se lavaron con agua destilada de dos a tres veces y se dejaron secar. Posteriormente se les agregó Nitrato de Plata al 5% por 40 min. Pasado este tiempo las preparaciones se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Una vez secas se expusieron a luz dicróica por 30 min. Después se les aplicó revelador fotográfico comercial por 30 min, se lavaron con agua corriente dos o tres veces y se dejaron secar. Una vez secas se utilizó fijador fotográfico comercial y se lavaron nuevamente. Para finalizar, se les agregó alcohol al 100% por 5 minutos y se montaron con bálsamo de Canadá o con resina sintética. Las preparaciones se dejaron secar durante dos semanas aproximadamente.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se obtuvieron microfotografías de las preparaciones usando el equipo de fotomicroscopía Leica DM500 ®, con el sistema de imagen de captura Leica ICC50 HD® y con el microscopio invertido OLYMPUS IX81. Se obtuvieron

aproximadamente cuatro imágenes por microorganismo. Siguiendo las recomendaciones de Lom (1958) se obtuvieron las medidas de las diferentes estructuras anatómicas de los ciliados, como los dentículos (cuchilla, parte central y rayo), disco adhesivo, anillo denticular, abertura central, número de dentículos, entre otras. Todas las mediciones se hicieron en micrómetros con ayuda del software Image-Pro Plus® 7.0. sobre las microfotografías obtenidas previamente.

Se trazaron los dentículos de cada población de organismos utilizando el programa GIMP versión 2.8.16. La descripción de los dentículos se hizo bajo las recomendaciones de van As y Basson (1989).

Cuadro 2. Especies de peces recolectados en cada localidad, n= número de hospederos examinados.

Localidad	Especie de pez	n
"El Palmar", Guerrero	<i>Abudefduf declivifrons</i> (Gill, 1862)	1
	<i>Entomacrodus chiostictus</i> (Jordan & Gilbert, 1882) *	10
	<i>Malacoctenus ebisui</i> Springer, 1959	3
	<i>Microspathodon bairdii</i> (Gill, 1862)	1
	<i>Tomicodon zebra</i> (Jordan & Gilbert, 1882) *	30
Cuatunualco, Oaxaca	<i>Abudefduf troschelii</i> (Gill, 1862)	2
	<i>Halichoeres nicholsi</i> (Jordan & Gilbert, 1882)	1
	<i>Malacoctenus margaritae</i> (Fowler, 1944)	1
	<i>Microspathodon bairdii</i> (Gill, 1862)	2
	<i>Sargocentron suborbitale</i> (Gill, 1863)	1
	<i>Stegastes rectifraenum</i> (Gill, 1862)	4
	<i>Tomicodon zebra</i> (Jordan & Gilbert, 1882) *	31
San Carlos, Sonora	<i>Abudefduf troschelii</i> (Gill, 1862)	1
	<i>Bathygobius ramosus</i> Ginsburg, 1947	4
	<i>Enneanectes reticulatus</i> (Allen & Robertson, 1991) *	16
	<i>Evermannia longipinnis</i> (Steindachner, 1879)	1

*Especies en donde se encontró *Trichodina rectuncinata*

ESTUDIO MOLECULAR

OBTENCIÓN DE ADN

Un conjunto de organismos recuperados de cada hospedero se aisló en viales con alcohol absoluto, estos se centrifugaron al vacío para generar un pellet. Con base en el estudio de Tang y colaboradores (2013) se utilizó el kit de Sigma llamado REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit para la extracción de ADN. Se siguió el procedimiento para la extracción de DNA de tejidos animales, modificando el volumen de los reactivos (Solución de extracción, Solución de preparación del tejido, Solución B de neutralización) a una cuarta parte de lo requerido.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La amplificación del gen 18S se llevó a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación también se utilizó el REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, la mezcla de reacción de PCR tuvo un volumen final de 20µL, de los cuales 4µL fueron de DNA; 10µL de REDEExtract-N-Amp PCR Reaction Mix, el cual contiene el buffer, incluyendo MGCL₂ (cloruro de magnesio), una mezcla de dNTPs, la Taq polimerasa, colorante RED Taq y el anticuerpo JumpStart Taq; 1µL del primer Forward (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3'); 1µL del primer reverse (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') (Tang et al., 2013), y 4µL de agua. Las muestras se incubaron en un termociclador con un programa que comenzó con un periodo de desnaturalización por un minuto a 94°C, después con cinco ciclos: con un periodo de desnaturalización por un minuto a 94°C, un periodo de alineación por dos minutos a 56°C y uno de extensión por dos minutos a 72°C, seguidos de 35 ciclos de manera similar a los ciclos anteriores, con la diferencia de la temperatura del periodo de alineación que incrementó a 62°C, y por último una etapa extendida de alargamiento a 72°C por 10

minutos (Cuadro 3). Los productos amplificados fueron evaluados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el buffer Tris-Acetato (TAE 1X).

94°C → 5 min	
94°C → 1 min	} 5 ciclos
56°C → 2 min	
72°C → 2 min	} 35 ciclos
94°C → 1 min	
62°C → 2 min	
72°C → 2 min	
72°C → 10 min	
4°C → ∞	

Cuadro 3. Pasos de la amplificación mediante PCR.

SECUENCIACIÓN DEL ADN

Los productos de la extracción se añadieron a una reacción de secuenciación que contenía una mezcla de: 20µL del producto del PCR y 1µL de cada primer por muestra. Estas muestras se enviaron a secuencias la Laboratorio de Secuenciación Genómica y de la Salud, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM) y una vez obtenidas se depositaron en la base de datos del GenBank. Las secuencias fueron comparadas en la base de datos del GenBank a través de búsquedas de similitud con la opción BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Con base en 23 secuencias del gen 18S de poblaciones de organismos de la familia Trichodinidae, de las cuales 11 corresponden a la región reverse de *Trichodina rectuncinata* y 12 obtenidas de la base de datos del GenBank (Cuadro 4), (de estas, 11 corresponden a diferentes especies de la familia Trichodinidae y una más a *Urceolaria urechi* usada como grupo externo), se realizó un alineamiento múltiple con ayuda del

programa SATé versión 2.2.7 y las herramientas externas CLUSTALW2 y MUSCLE, más una reevaluación manual a ojo, generando una base de datos de 1745 pares de bases (pb). Es importante mencionar que para las secuencias de *T. rectuncinata* solo se trabajó con la parte reverse de la secuencia, recortando el alineamiento para que todas las secuencias tuvieran 500 pb.

Los análisis filogenéticos se realizaron con el método de inferencia bayesiana usando el programa MrBayes (Ronquist et al., 2012) con los siguientes parámetros: corridas de ocho cadenas de Markov para 10,000,000 generaciones, partiendo de un árbol al azar, muestreando cada 1000 generaciones. Con el método de máxima verosimilitud usando el programa RAxML (Stamatakis, 2014), utilizando el modelo evolutivo GTRGAMMA. La divergencia genética entre los taxa fue estimada con las distancias no corregidas “*p*” usando el programa Mega versión 6.0 (Tamura et al. 2013).

Cuadro 4. Secuencias de tricodínicos obtenidas de la base de datos del GenBank.

Especie	GenBank
<i>Trichodina heterodentata</i>	AY788099
<i>Trichodina hysilepis</i>	EF524274
<i>Trichodina meretricis</i>	FJ499387
<i>Trichodina modesta</i>	GU906245
<i>Trichodina mutabilis</i>	HQ407384
<i>Trichodina pectenis</i>	JQ663868
<i>Trichodina reticulata</i>	AY741784
<i>Trichodina sinipercae</i>	EF599288
<i>Trichodina uniforma</i>	HQ407383
<i>Trichodinella epizootica</i>	HQ407386
<i>Trichodinella myakkae</i>	AY102176
<i>Urceolaria urechi</i>	FJ499388

RESULTADOS

Se revisaron 111 peces de 14 especies diferentes en tres localidades del pacifico mexicano (Apéndice II), en tres especies se registró *Trichodina rectuncinata* (Cuadro 2), de la localidad de San Carlos, Sonora se obtuvieron 39 muestras para estudios moleculares y 33 para morfológicos, para “El Palmar”, Guerrero, se obtuvieron 22 muestras para estudios moleculares del hospedero *Tomicodon zebra* y 2 para *Entomacrodus chiostictus*, en cuanto a las muestras para estudios morfológicos, se obtuvieron 24 y tres respectivamente. Por último, para Cuatunalco, Oaxaca se obtuvieron 29 muestras para análisis moleculares y 29 para morfológicos. De las muestras obtenidas para morfología, se realizaron 94 preparaciones con Nitrato de Plata, de las cuales se tomaron 320 microfotografías de *Trichodina rectuncinata* y se obtuvieron 11 secuencias pertenecientes a tres hospederos diferentes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de secuencias por hospedero y localidad.

Localidad	Huésped	No. de secuencias
San Carlos, Sonora	<i>Enneanectes reticulatus</i>	5
"El Palmar", Guerrero	<i>Tomicodon zebra</i>	2
	<i>Entomacrodus chiostictus</i>	1
Cuatunalco, Oaxaca	<i>Tomicodon zebra</i>	3

RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Los ejemplares de *T. rectuncinata* mostraron variabilidad morfológica, sobre todo en la forma del denticulo. Considerando las muestras obtenidas en las tres localidades y con tres huéspedes diferentes, *T. rectuncinata* presentó ocho formas diferentes en los denticulos (Figura 5). Los organismos de San Carlos, Sonora presentaron cinco formas

diferentes de denticulos, mientras que los tricodínidos de “El Palmar”, Guerrero, mostraron dos formas diferentes entre ellos, pero similares a dos formas de los organismos de San Carlos. Los organismos de Cuatun Alco, Oaxaca presentaron cuatro formas diferentes de denticulo, siendo similar una de ellas con una de las formas de San Carlos.

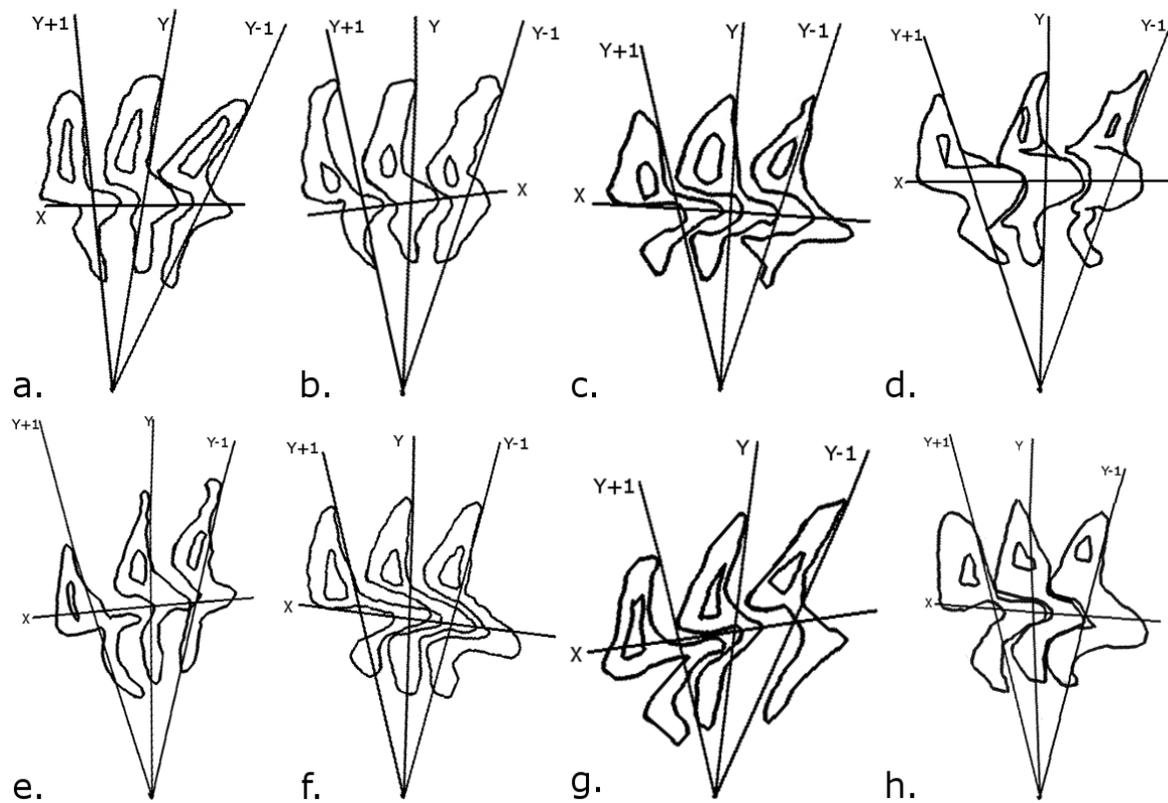


Figura 5. Dibujos esquemáticos de las diferentes formas de los denticulos de *Trichodina rectuncinata* del presente trabajo. **a – b.** Formas presentes en San Carlos, Sonora y “El Palmar”, Guerrero. **c.** Forma presente en Cuatun Alco, Oaxaca y San Carlos, Sonora. **d – e.** Formas presentes en San Carlos, Sonora. **f, g, h.** Formas presentes en Cuatun Alco, Oaxaca.

San Carlos, Sonora

Huésped: *Enneanectes reticulatus*

Las poblaciones de esta localidad y este huésped mostraron cinco variaciones en la forma del denticulo, también sus medidas presentaron variaciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medidas de *T. rectuncinata* en San Carlos, Sonora.

Parámetro	Intervalo (promedio)
Diámetro del: anillo denticular	12.61 - 22.93 (16.03)
Disco adhesivo	28.63 - 37.59 (28.71)
Número de denticulos	22 - 28 (25.25)
Estriaciones radiales	7
Ancho de la membrana	1.73 - 5.07 (2.83)
Dimensiones del denticulo: longitud	2.85 - 2.98 (2.92)
Rayo	1.22 - 3.43 (2.40)
Parte central	1.39 - 2.25 (1.81)
Cuchilla	2.96 - 4.23 (3.73)
Apertura del denticulo	1.56
<i>Span</i>	6.11 - 9.37 (7.64)

En el primer caso (Figura 6A-D) la cuchilla es en forma triangular, con el margen anterior y el posterior recto, este último paralelo a los ejes Y, la superficie distal curva, con un punto tangente poco definido y el ápice lejano a los ejes Y, la cavidad central de las cuchillas en forma de gota o triangulo. La parte central es ancha, por encima del eje X y con punta curva. El rayo es mediano con punta curva, la conexión con la parte central es ancha, la mayoría de los rayos tocando los ejes Y, sin apófisis evidente. Para la segunda variación (Figura 6E y 6F) la cuchilla el margen anterior y el posterior son poco curvos, este último sin tocar los ejes Y, la superficie distal es curva con un punto tangente más definido, el ápice es curvo y alejado de los ejes Y, la cavidad central de la cuchilla en forma de gota. La parte central es ancha y poco definida, por encima del eje

X. Los rayos son anchos, cortos y terminación en punta, sin apófisis evidente, en su mayoría tocando los ejes Y. En la siguiente variación (Figura 7A y 7B) la cuchilla es con forma triangular con los márgenes anterior y posterior ligeramente curvos, con la superficie distal redonda, la cavidad central en forma de triángulo, la parte central del denticulo delgada, dirigida hacia los ejes Y, con la parte cónica en punta, en algunos denticulos por arriba del eje X, en otros tantos completamente debajo de este eje. Rayos delgados con una apófisis evidente cerca de la conexión con la parte central. En la cuarta variación (Figura 7C y 7D), la cuchilla mantiene la forma triangular, pero presenta en la mayoría de los denticulos una pequeña apófisis en el margen anterior, el punto tangente de la cuchilla esta poco definido, el margen posterior tiende a ser recto, paralelo a los ejes Y, la cavidad central es pequeña sin forma definida. La parte central es muy ancha, con una conexión poco visible con la cuchilla, el eje X cruza por en medio. Los rayos son cortos en comparación con la parte central, delgados, curvos hacia el eje Y-1 y con una ligera apófisis en la parte posterior, cercana a la conexión con la parte central. En la última variación (Figura 7E y 7F), la cuchilla es más alargada en comparación con el resto de las variaciones, el margen anterior es recto en la mayoría de los denticulos, el margen posterior ligeramente curvo en algunas zonas, la superficie distal es en punta delgada, la cavidad de la parte central de la cuchilla es grande y en la mayoría de los denticulos delgada. La parte central es delgada con forma triangular, la conexión de la cuchilla con la parte central ancha. Los rayos son delgados, de tamaño medio, algunos de ellos rectos el resto curvos hacia el eje Y-1, la conexión del rayo con la parte central delgada.

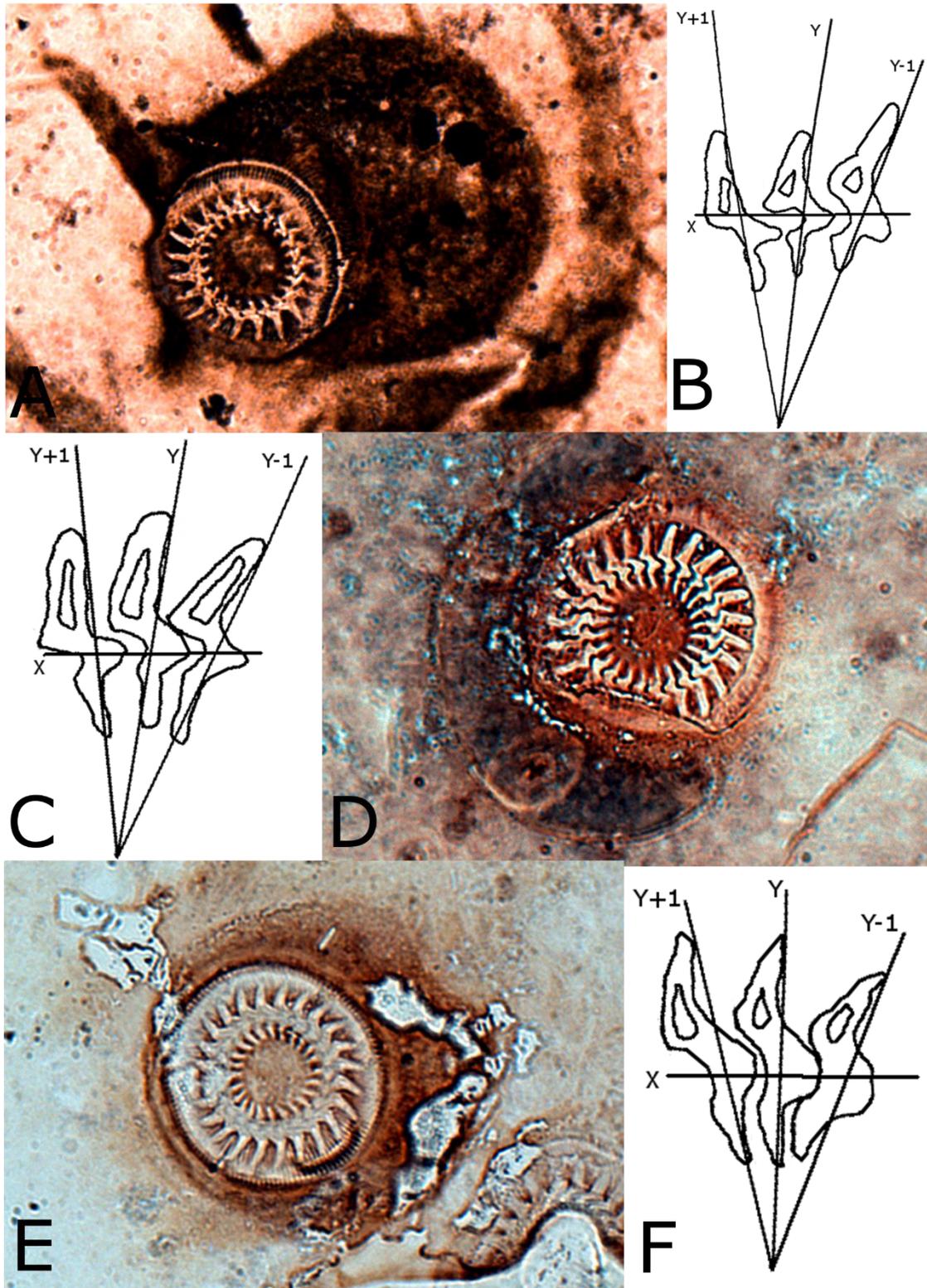


Figura 6. Variaciones en los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de San Carlos, Sonora. **A.D.E.** Microfotografías. Impregnación con nitrato de Plata. **B.C.F.** Esquema de los denticulos.

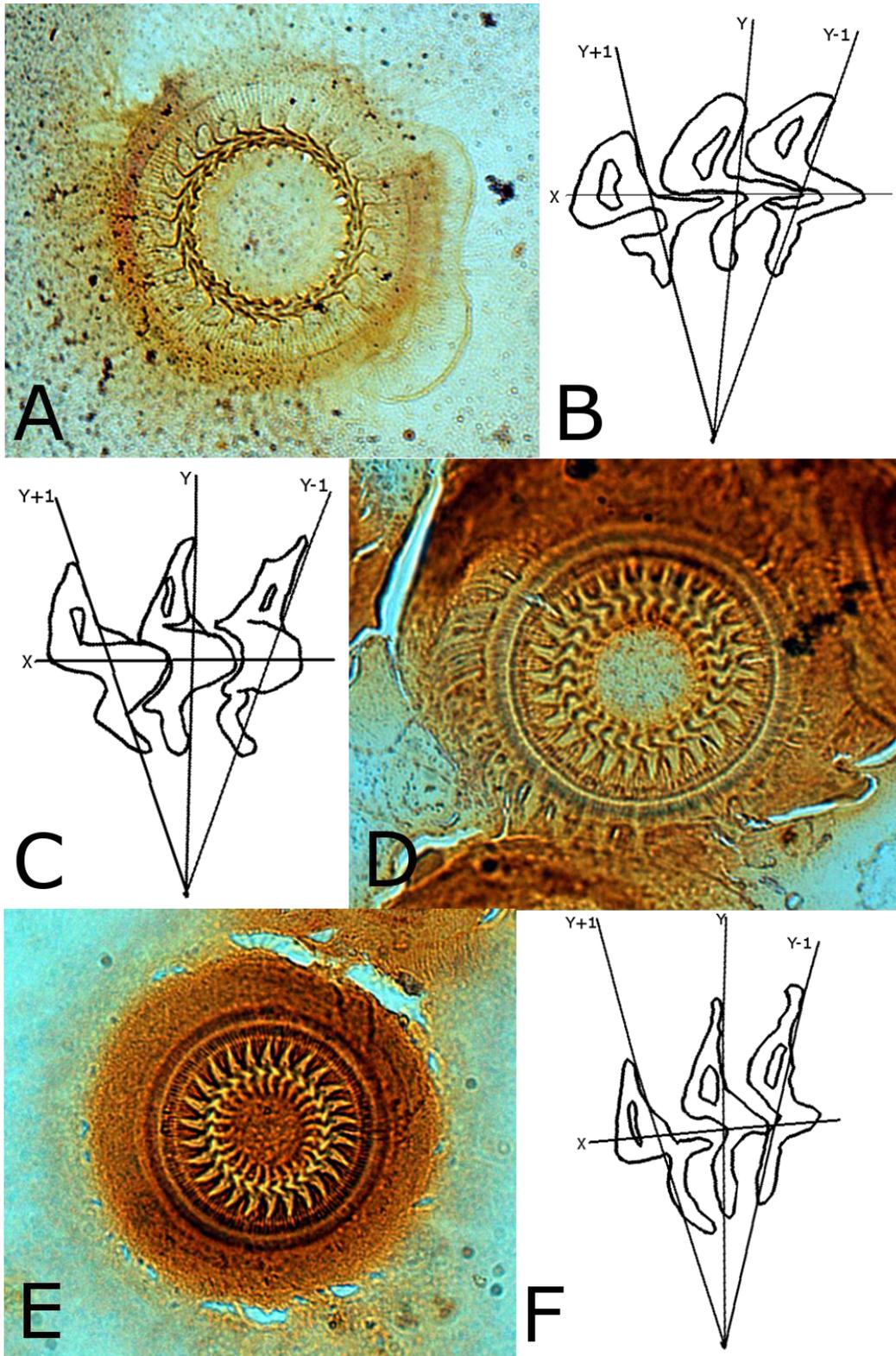


Figura 7. Variaciones en los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de San Carlos, Sonora. **A.D.E.** Microfotografías. Impregnación con nitrato de Plata. **B.C.F.** Esquema de los denticulos.

“El Palmar”, Guerrero

Huésped: *Tomicodon zebra*

Las poblaciones de *Trichodina rectuncinata* de esta localidad y de este huésped mostraron variaciones notables en la forma y medidas (Cuadro 7) de los dentículos.

Cuadro 7. Medidas de *T. rectuncinata* en “El Palmar”, Guerrero.

Parámetro	Intervalo (promedio)
Diámetro del: anillo denticular	12.53 - 16.42 (13.82)
Disco adhesivo	24.51 - 32.32 (28.74)
Número de dentículos	22
Estriaciones radiales	-
Ancho de la membrana	-
Dimensiones del dentículo: longitud	2.85 - 2.98 (2.92)
Rayo	1.86 - 2.38 (2.12)
Parte central	1.69
Cuchilla	3.37 - 7.12 (5.18)
Apertura del dentículo	-
<i>Span</i>	6.2 - 7.13 (6.66)

La primera variación (Figura 8A y 8B) muestra cuchillas triangulares, con los márgenes anterior y posterior curvos, la superficie distal ancha y curva, con un punto tangente visible, la cavidad central de tamaño medio con forma de gota en la mayoría de los dentículos. La parte central triangular, ancha, en la mayoría de los dentículos con el eje X por en medio, la conexión de la parte central con la cuchilla poco diferenciada al igual que con el rayo. Los rayos son cortos y anchos, con terminación redonda. En la siguiente y última variación (Figura 8C y 8D), las cuchillas presentan una forma que va de rectangular a triangular en algunos dentículos, con los márgenes anterior y posterior paralelos entre sí, la superficie distal recta en la mayoría de los dentículos y con un punto

tangente bien diferenciado. La forma de gota predomina en la cavidad central de la mayoría de las cuchillas. La parte central es en forma triangular ancha, con una conexión a la cuchilla amplia por encima del eje X, la conexión con los rayos poco diferenciada. Los rayos son cortos, gruesos y con terminación delgada y en punta tocando los ejes Y, sin apófisis evidente.

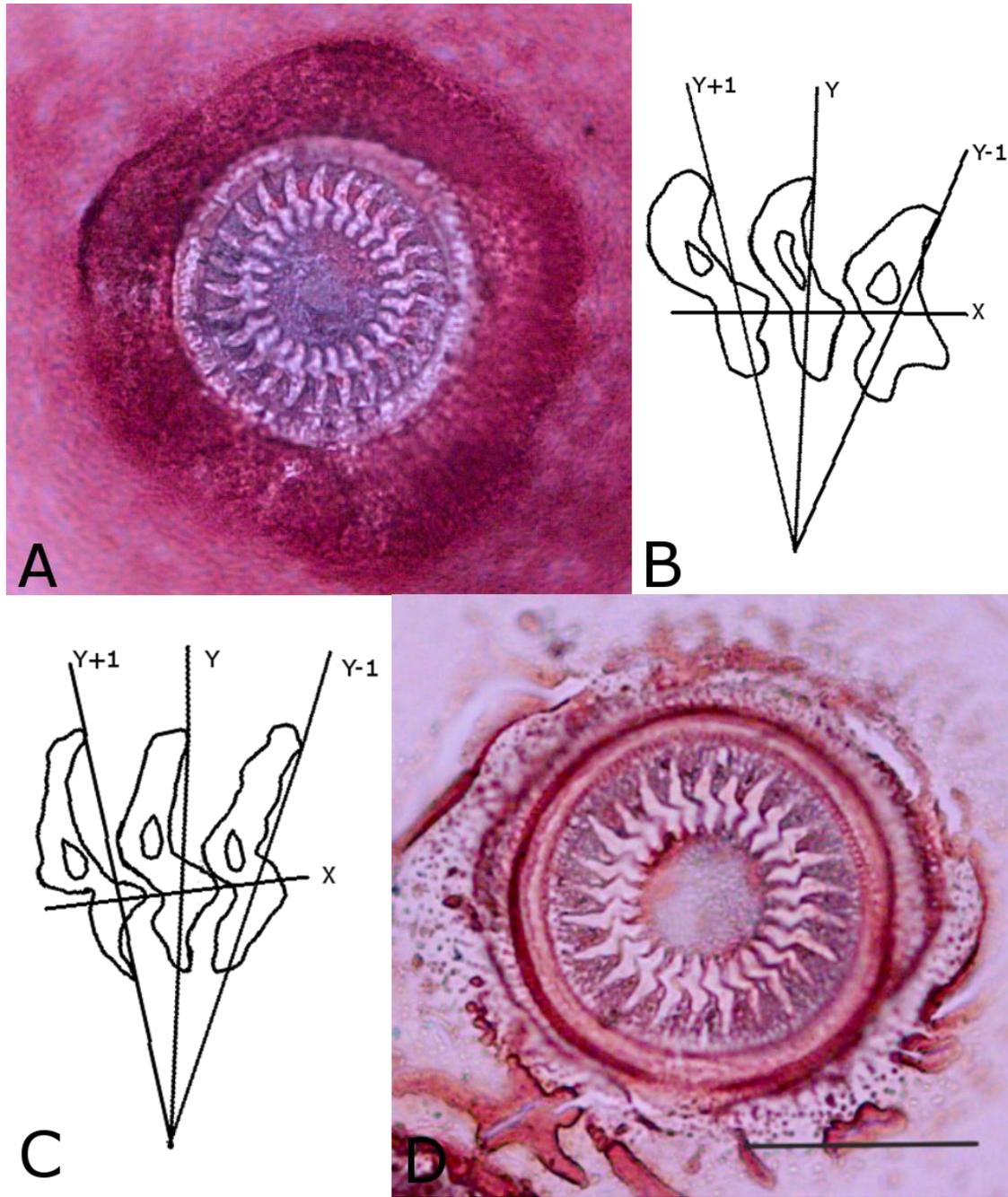


Figura 8. Variaciones en los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de “El Palmar”, Guerrero. **A.D.** Microfotografías. Impregnación con nitrato de Plata. **B.C.** Esquema de los denticulos.

Cuatunualco, Oaxaca

Huésped: *Tomicodon zebra*

Las poblaciones de esta localidad presentan variaciones morfológicas y de tamaño (Cuadro 8) en los dentículos de los organismos.

Cuadro 8. Medidas de *T. rectuncinata* en Cuatunualco, Oaxaca

Parámetro	Intervalo (promedio)
Diámetro del: anillo denticular	14.43 - 18.18 (16.40)
Disco adhesivo	28.03 - 29.35 (28.69)
Número de dentículos	23 - 25 (24)
Estriaciones radiales	7
Ancho de la membrana	2.85
Dimensiones del dentículo: longitud	2.96 - 5.28 (4.5)
Rayo	1.95 - 3.37 (2.67)
Parte central	1.29 - 2.50 (1.97)
Cuchilla	4.23 - 5.27 (4.85)
Apertura del dentículo	1.48 - 2.02 (1.76)
<i>Span</i>	7.76 - 9.14 (8.41)

Las cuchillas de la primera variación morfológica (Figura 9A y 9B) son de forma triangular con la cavidad central amplia también en forma triangular, el margen anterior y el posterior de la cuchilla rectos, este último paralelo a los ejes Y, la superficie distal con terminación en punta redonda. La parte central delgada, triangular, con conexión a la cuchilla alarga y delgada cruzando los ejes Y por encima del eje X, la conexión de la parte central hacia el rayo delgada y más corta en comparación con la de la cuchilla. Rayos cortos, de grosor medio, ligeramente curvos hacia el eje Y-1. La siguiente variación (Figura 9C y 9D) se caracteriza por tener cuchillas triangulares, todas por encima del eje X, la cavidad central triangular de gran tamaño. A diferencia de la

variación anterior, la conexión de la cuchilla con la parte central es corta, delgada y con el eje X por en medio en la mayoría de los dentículos. La parte central es delgada al igual que la conexión con el rayo. Los rayos son curvos, dirigidos hacia el eje Y+1, en algunos casos con una apófisis muy visible. En la siguiente variación (Figura 10A y 10B), el margen posterior de la cuchilla es ligeramente curvo, con un punto tangente muy marcado, la superficie distal en la mayoría de los dentículos es recta, al igual que el margen anterior. La cavidad central de la cuchilla es amplia, la conexión entre la cuchilla y la parte central es corta, y en algunos casos poco diferenciada, la parte central es delgada y se encuentra por debajo del eje X. Los rayos son delgados y cortos, en algunos casos ligeramente curvos, dirigiéndose hacia el eje Y-1, sin apófisis visible. Las cuchillas de la última variación (Figura 10C y 10D) a pesar de presentar forma triangular como el resto de las variaciones, estas son más anchas, con un punto tangente en punta, con los márgenes anterior y posterior rectos, la cavidad central es pequeña, con forma de triángulo. La conexión entre la cuchilla y la parte central en algunos dentículos es muy delgada y en otros es demasiado gruesa, la parte central es ancha, triangular, con punta redonda, en la mayoría de los casos con el eje X por en medio. La conexión de la parte central hacia el rayo está poco diferenciada, los rayos son gruesos, curvos, dirigidos hacia el eje Y-1 y con terminación en punta.

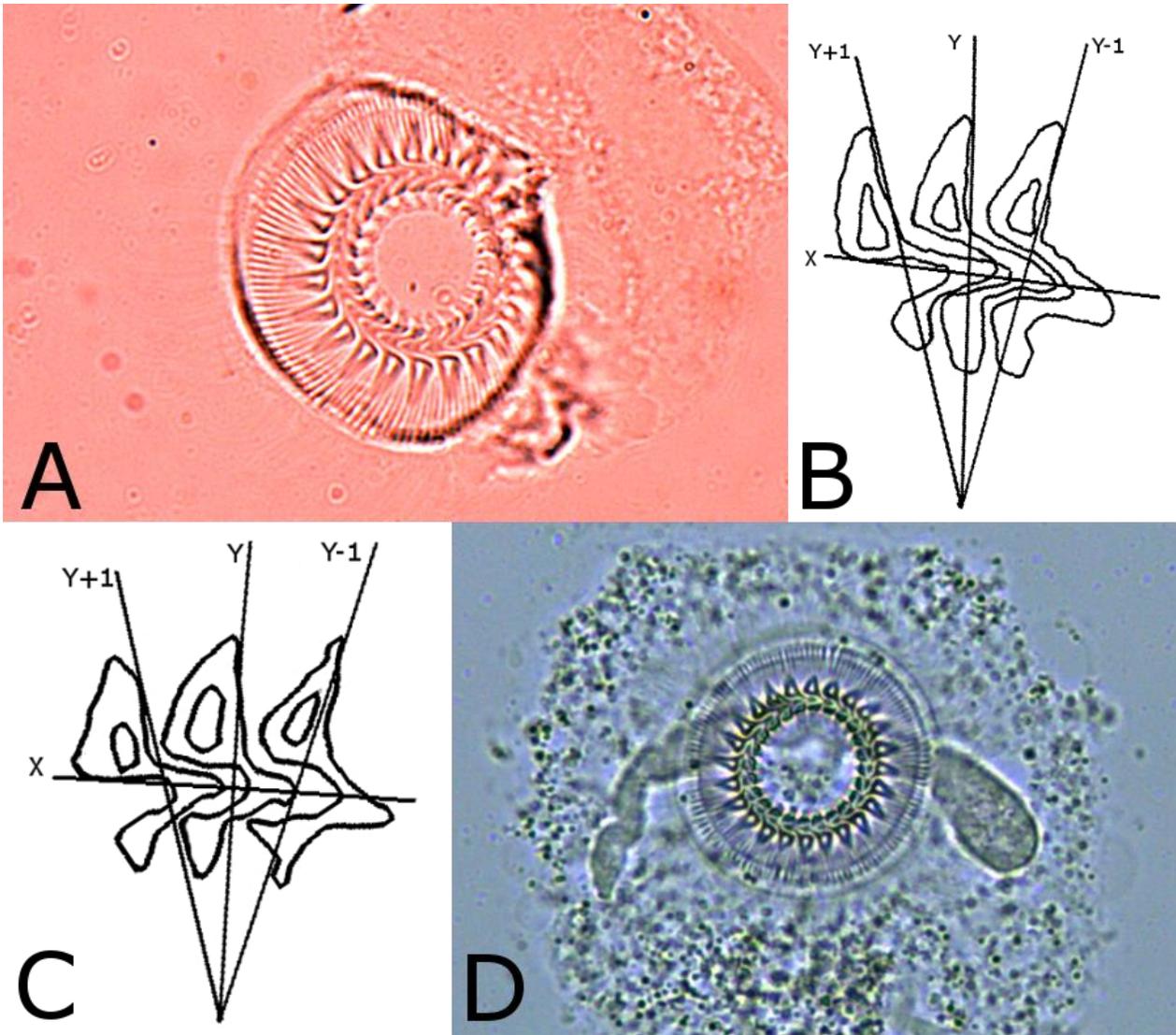


Figura 9. Variaciones en los dentículos de *Trichodina rectuncinata* de Cuatunualco, Oaxaca. **A.D.** Microfotografías. Impregnación con nitrato de Plata. **B.C.** Esquema de los dentículos.

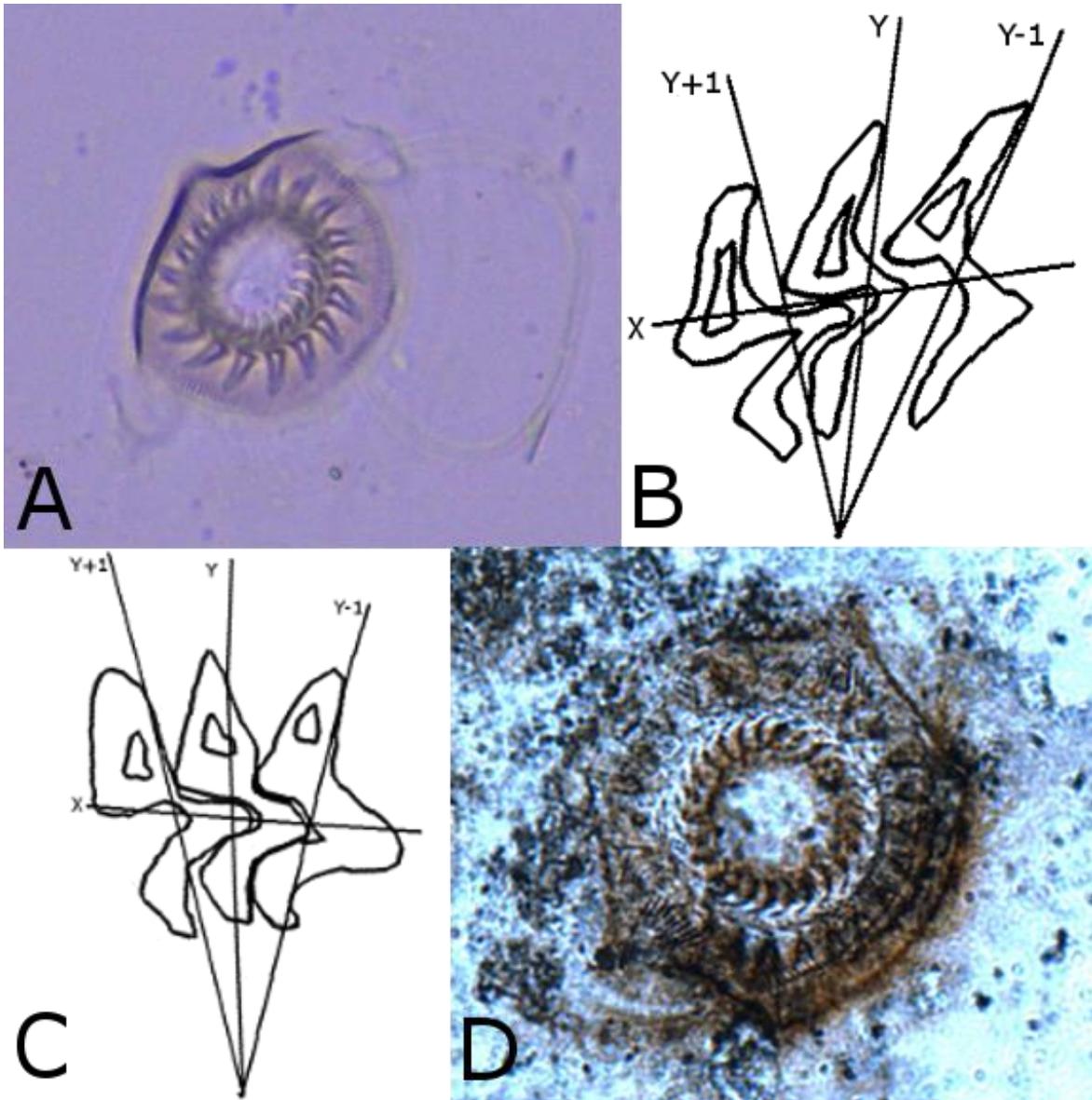


Figura 10. Variaciones en los denticulos de *Trichodina rectuncinata* de Cuatunanco, Oaxaca. **A.D.** Microfotografías. Impregnación con nitrato de Plata. **B.C.** Esquema de los denticulos.

RESULTADOS MOLECULARES

BASE DE DATOS Y DIVERGENCIAS GENÉTICAS

Se amplificó y secuenció un fragmento del gen 18S de 11 poblaciones de *Trichodina rectuncinata*, los productos de PCR variaron entre 420 a 527 pb, las secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank variaron entre 1320 a 1895 pb.

Las divergencias genéticas, estimadas entre las secuencias de 12 especies de los géneros *Trichodina* y *Trichodinella* disponibles en GenBank varían entre 1.18 y 21.37% con un promedio de 11.80% (Cuadro 9). Esto nos permite visualizar un valor de divergencia genética entre especies validas morfológicamente diferentes, el cual se podría considerar suficiente para proponer a dos entidades genéticas como especies diferentes. En el caso de las secuencias obtenidas en el presente estudio (Cuadro 10) las divergencias genéticas en “El Palmar”, Guerrero oscilan entre 0.25 a 1%, en Cuatunaco, Oaxaca presentan un intervalo de 0 a 0.25%, en tanto que, en San Carlos, Sonora tienen un intervalo de 0 a 0.20%. Por lo que, en relación con las comparaciones anteriores, consideramos que las poblaciones pertenecen a la misma especie. Las divergencias entre nuestras secuencias de *T. rectuncinata* respecto a las especies disponibles en GenBank (Cuadro 11), tanto del género *Trichodina* como del género *Trichodinella* varían de 2.91 a 21.50%. Al comparar la divergencia genética entre poblaciones de *T. rectuncinata* en relación al huésped, se encontró la mayor divergencia entre aquellas presentes en *Tomicodon zebra* y las de *Entomacrodus chiostictus*, con un valor de 0.25 a 1%.

Cuadro 9. Divergencias genéticas entre especies de los géneros *Trichodina* y *Trichodinella*.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1. <i>Trichodina heterodentata</i>										
2. <i>Trichodina hypsilepis</i>	8.72%									
3. <i>Trichodina meretricis</i>	11.85%	14.03%								
4. <i>Trichodina modesta</i>	10.56%	10.47%	13.17%							
5. <i>Trichodina mutabilis</i>	17.37%	17.02%	21.97%	7.90%						
6. <i>Trichodina pectenis</i>	10.39%	13.22%	14.38%	11.71%	19.52%					
7. <i>Trichodina reticulata</i>	10.28%	9.44%	14.78%	1.64%	8.75%	14.39%				
8. <i>Trichodina sinipercae</i>	9.85%	9.25%	14.88%	1.48%	9.11%	14.08%	1.18%			
9. <i>Trichodina uniforma</i>	18.13%	17.91%	21.37%	2.15%	13.87%	19.74%	9.27%	9.99%		
10. <i>Trichodinella epizootica</i>	7.13%	10.97%	14.98%	10.12%	16.65%	8.86%	10.78%	10.58%	16.88%	
11. <i>Trichodinella myakkae</i>	6.20%	9.55%	13.33%	10.87%	17.25%	10.10%	9.81%	9.62%	18.37%	3.28%

Cuadro 10. Divergencias genéticas entre *Trichodina rectuncinata* (*Enneanectes reticulatus*, *Entomacrodus chiostictus* y *Tomicodon zebra*).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
1. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Gro.)											
2. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Gro.)	1.00%										
3. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Gro.)	0.25%	0.97%									
4. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Oax.)	1.42%	0.25%	1.47%								
5. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Oax.)	1.25%	0.19%	1.17%	0.00%							
6. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Oax.)	1.68%	0.48%	1.70%	0.25%	0.24%						
7. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Son.)	1.00%	0.00%	0.97%	0.25%	0.19%	0.48%					
8. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Son.)	1.00%	0.00%	0.98%	0.25%	0.20%	0.49%	0.00%				
9. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Son.)	1.00%	0.00%	0.97%	0.25%	0.19%	0.48%	0.00%	0.00%			
10. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Son.)	1.00%	0.00%	0.97%	0.25%	0.19%	0.48%	0.00%	0.00%	0.00%		
11. <i>Trichodina rectuncinata</i> (Son.)	1.00%	0.19%	0.98%	0.25%	0.39%	0.49%	0.19%	0.20%	0.19%	0.19%	

Cuadro 11. Divergencias genéticas entre *Trichodina rectuncinata* del presente estudio (*Enneanectes reticulatus*, *Entomacrodus chiostrictus* y *Tomocodon zebra*) y especies del género *Trichodina* y *Trichodinella*.

	(Gro.)	(Gro.)	(Gro.)	(Oax.)	(Oax.)	(Oax.)	(Son.)	(Son.)	(Son.)	(Son.)	(Son.)
<i>Trichodina heterodontata</i>	5.26%	3.70%	4.49%	4.67%	3.89%	4.85%	3.70%	3.72%	3.70%	3.70%	3.90%
<i>Trichodina hypsilepis</i>	10.05%	7.41%	8.02%	8.62%	7.21%	8.76%	7.41%	7.45%	7.41%	7.41%	7.62%
<i>Trichodina meretricis</i>	21.50%	17.28%	17.54%	19.61%	17.28%	19.61%	17.28%	17.38%	17.28%	17.28%	17.51%
<i>Trichodina modesta</i>	9.39%	6.96%	7.72%	10.84%	6.96%	10.53%	6.96%	6.96%	6.96%	6.96%	7.33%
<i>Trichodina mutabilis</i>	9.77%	7.20%	8.01%	8.85%	7.20%	8.98%	7.20%	7.24%	7.20%	7.20%	7.41%
<i>Trichodina pectenis</i>	4.25%	2.91%	3.90%	3.68%	3.11%	3.87%	2.91%	2.93%	2.91%	2.91%	3.11%
<i>Trichodina reticulata</i>	10.03%	7.39%	8.20%	9.09%	7.39%	9.22%	7.39%	7.44%	7.39%	7.39%	7.60%
<i>Trichodina sinipercae</i>	9.52%	7.00%	7.81%	8.60%	7.00%	8.74%	7.00%	7.05%	7.00%	7.00%	7.21%
<i>Trichodina uniforma</i>	12.03%	14.20%	15.04%	17.69%	14.20%	17.72%	14.20%	13.89%	14.20%	14.20%	14.23%
<i>Trichodinella epizootica</i>	4.27%	3.12%	3.91%	3.94%	3.31%	4.14%	3.12%	3.14%	3.12%	3.12%	3.32%
<i>Trichodinella myakkae</i>	5.03%	3.70%	4.70%	4.19%	3.51%	4.38%	3.70%	3.73%	3.70%	3.70%	3.91%

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

La inferencia bayesiana mostró que las secuencias de *Trichodina rectuncinata* se agrupan en su solo clado (Figura 11) con el valor máximo (1.0) de probabilidades posteriores, incluyendo en este clado a la especie *Trichodina pectenis*. Este clado a su vez se divide en dos subclados, el primero agrupando los organismos de Cuatun Alco, Oaxaca con un valor de 0.753 como soporte y el segundo con los organismos del huésped *Entomacrodus chiostrictus*. El análisis de máxima verosimilitud produjo un solo árbol (-lnL= 8676.19), encontrando el mismo patrón en las ramas como el árbol de inferencia bayesiana en las secuencias obtenidas de GenBank, en cuanto a las muestras de *T. rectuncinata* muestra un clado similar, bien sustentado por el remuestreo de bootstrap (Figura 12), en donde *T. pectenis* se encuentra como grupo hermano. Ambos árboles son congruentes con los resultados de divergencia genética, mostrando que las poblaciones pertenecen a la misma especie.

Como observación adicional se observa que en las relaciones entre trichodinidos obtenidos a partir de los análisis de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud las especies del género *Trichodinella* se anidan por completo con aquellas del género *Trichodina*, lo que sugiere que *Tichodinella* no existe.

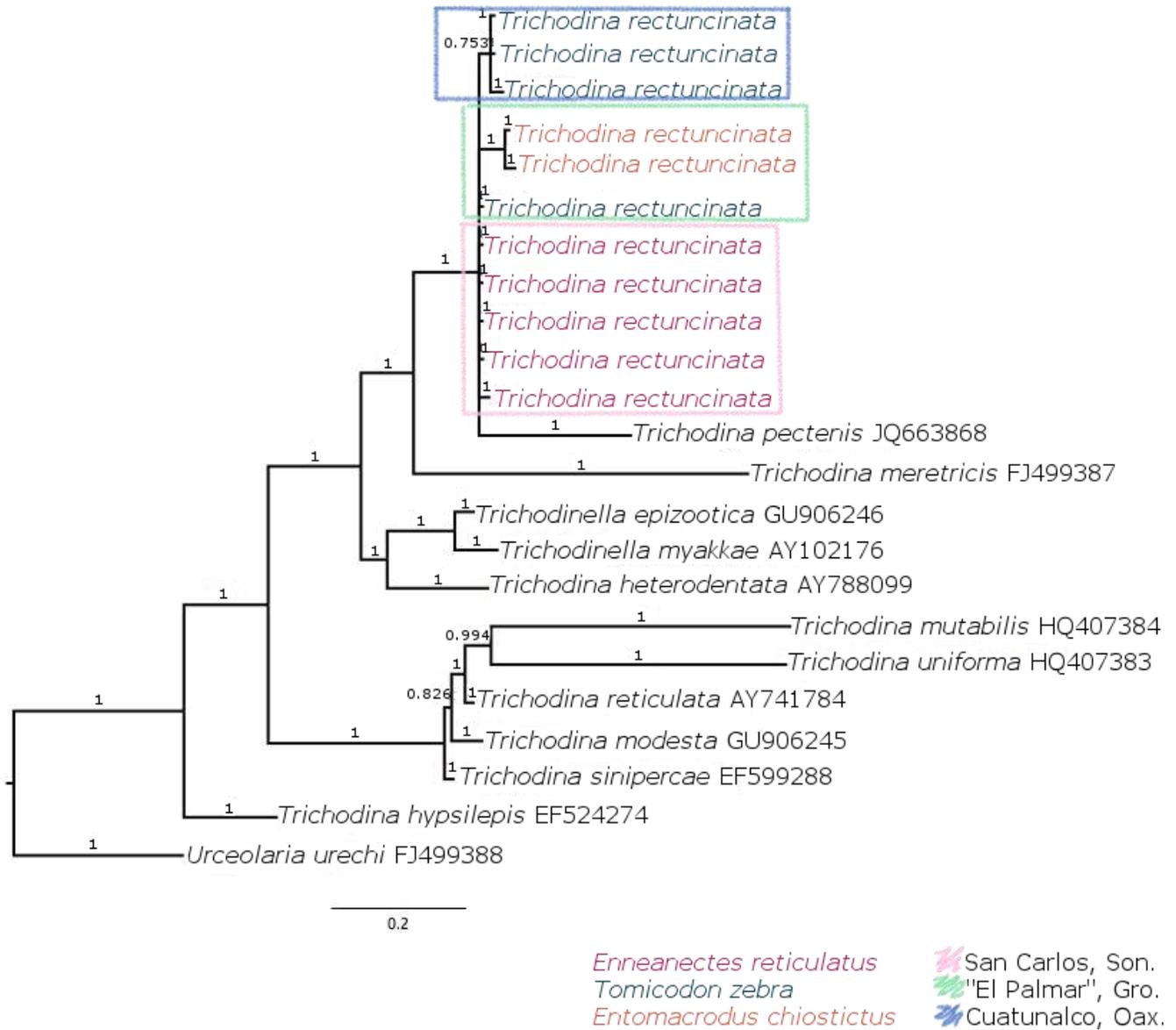


Figura 11. Árbol de inferencia bayesiana de secuencias del gen 18S de tricodínidos del género *Trichodina* y *Trichodinella*, con énfasis en *Trichodina rectuncinata* mostrando el huésped y la localidad. Los números cerca de los nodos internos muestran el valor de soporte.

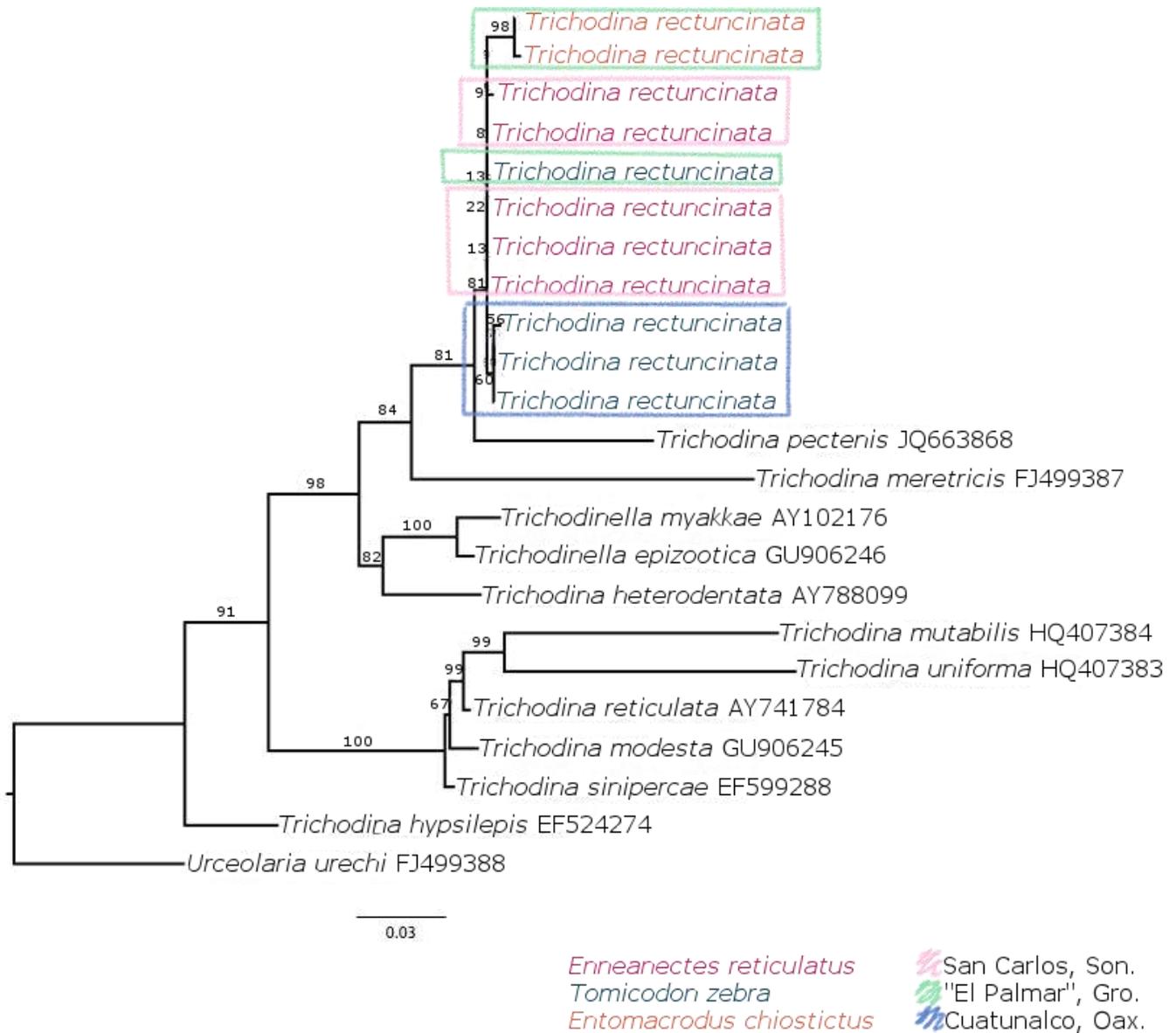


Figura 12. Árbol inferido con máxima verosimilitud de secuencias del gen 18S de tricodínidos del género *Trichodina* y *Trichodinella*, con énfasis en *Trichodina rectuncinata* mostrando el huésped y la localidad. Números cerca de los nodos internos muestran los valores de bootstrap.

DISCUSIÓN

La variabilidad morfológica en tricodínidos ha sido discutida por diversos autores (Lom, 1970; Dobberstein y Palm, 2000; Martins y Ghiraldelli, 2008; Silva-Briano et al., 2011; Drobinia et al., 2014; Valladão et al., 2015), principalmente la variabilidad que exhibe el disco adhesivo, la cual es más constante en algunas especies que en otras. En el caso particular de *Trichodina rectuncinata* la variabilidad de la forma de los dentículos y sus medidas ha sido tratada por la mayoría de los autores que la han registrado.

Desde la descripción original de *T. rectuncinata* las dimensiones del anillo denticular variaron en un intervalo de 23 - 50 μ (Loubser et al., 1995). Grupcheva et al. (1989) mencionan que las poblaciones que registran de diversos hospederos en el Mar Negro y en el Mediterráneo presentan variaciones considerables en cuanto morfología y dimensiones y a su vez presentan una variación inusualmente grande al comparar su material con la descripción original, incluyendo la forma del dentículo, aun así, estas poblaciones son reportadas como *T. rectuncinata* por presentar la cavidad triangular en la cuchilla del dentículo. Tanto Grupcheva y colaboradores (1989) como Lom (1970) mencionan que Zaika en 1966 también nota la gran variabilidad de *T. rectuncinata* y sugiere que con el tiempo se podrán distinguir las diferentes formas taxonómicas de esta especie. Loubser et al. (1995) y Xu et al. (2001) coinciden con Grupcheva y colaboradores (1989) en que esta especie necesita una minuciosa revisión tomando en cuenta la cavidad triangular de la cuchilla, la cual está presente en la mayoría de los organismos.

En el presente trabajo se muestran ocho diferentes formas de dentículos, de las cuales tres son similares a las descritas por Xu y colaboradores (2001), el resto son

diferentes a las descritas en la literatura. En cuanto a sus medidas, los organismos de *T. rectuncinata* descritos en la literatura presentan un intervalo amplio en cada característica diagnóstica. Las medidas de las poblaciones de San Carlos, Sonora son similares a las de los organismos descritos por Lom (1970) respecto al anillo denticular y disco adhesivo y a los descritos por Grupcheva y colaboradores (1989) en las características de los denticulos (longitud, rayo, cuchilla, parte central y *span*). El anillo denticular, el disco adhesivo, la cuchilla y la parte central de los denticulos de los ejemplares de “El Palmar”, Guerrero coinciden con los descritos por Xu y colaboradores (2001), el resto de las medidas (número de denticulos, rayo y longitud del denticulo y *span*) son similares con los organismos reportados por Grupcheva et al. (1989). Los organismos de Cuatunanco, Oaxaca presentan medidas que coinciden con diversos autores, como Grupcheva et al., (1989), Lom (1970), Loubser et al., (1990) y Xu et al., (2001).

La descripción original de muchos organismos protistas se ha basado en caracteres morfológicos principalmente, dada la taxonomía clásica la cual utiliza datos aportados por campos biológicos básicos, como son la morfología, fisiología, ecología, paleontología, entre otros (López-Ochoterena y Serrano-Limón, 1994). Con el paso del tiempo estas descripciones han requerido de la integración de nuevas herramientas, como son las herramientas moleculares, esto principalmente en microorganismos que morfológicamente no son fáciles de identificar, lo que hace que su biodiversidad se vea subestimada. Por ejemplo, existen linajes completamente nuevos, así como entidades genéticamente distintas dentro de las especies delimitadas morfológicamente (Montresor et al., 2003; Sáez et al., 2003; Guillou et al., 2004; Massana et al., 2004; Sarno et al., 2005; Finlay et al., 2006). Por varias décadas, las secuencias de ADN han

jugado un papel importante en la sistemática. En la década de los 90's estudios que originalmente fueron diseñados para revelar relaciones filogenéticas entre taxones también arrojaron información de diversidad genética a nivel de especie, lo que llevo a que los estudios de variabilidad genética intraespecífica rápidamente se convirtieran en un área importante de investigación (Meier, 2008).

En cuanto a la sistemática clásica de los ciliados López-Ochoterena y Serrano-Limón (1994) mencionan que las bases de la clasificación en “protozoarios” comienzan con la morfología comparada, la cual ha sido la mayoría del tiempo la fuente principal de caracteres utilizables, para reconocer las relaciones a todos niveles en la jerarquía taxonómica de las diversas formas de “protozoarios” y que en cuanto a estudios genéticos y filogenéticos han sido considerados un obstáculo para refinar aspectos taxonómico-genéticos a niveles específicos y subespecíficos, esto debido a las dificultades que presentan desarrollar este tipo de estudios, como son la amplia carencia de fósiles en la mayor parte de los grupos, su tamaño típicamente microscópico, su organización celular y la ausencia frecuente de sexualidad o cuando menos no descubierta en muchos grupos.

Las técnicas moleculares ofrecen una poderosa herramienta para la clasificación, generación de hipótesis filogenéticas, delimitación de especies y caracterización genética de la biota del planeta. Los marcadores moleculares aportan información genética que permite detectar variaciones entre especies y poblaciones de organismos (Avise, 2004). El ARN ribosomal citoplasmático, así como el ADN y ARN mitocondrial han sido utilizados ampliamente debido a que presenta regiones variables flanqueadas por regiones altamente conservadas que reflejan diferentes tasas de evolución, lo que permite

su versatilidad al ser usados en estudios taxonómicos a diferentes niveles (Hillis y Dixon, 1991).

A pesar de que en muchos grupos de “protozoarios” la morfología comparada sigue siendo la manera principal de clasificación, en algunos grupos, como en el de los ciliados se han realizado diversos estudios que evalúan la variación genética dentro de la especie. Se han evaluado diferentes métodos para estos, como la utilización de secuencias de espaciadores internos no transcritos o ITS, llamados ITS1 e ITS2, de la región rRNA, utilizados principalmente para evaluar la diversidad genética y la estructura de la población de algunos protistas (Miao et al., 2004; Amato et al., 2007; Bass et al., 2007). En varios casos, las secuencias ITS de poblaciones de ciliados de gran parte del mundo han sido casi idénticas, lo que indica una variación genética muy baja (Coleman, 2005; Barth et al., 2006; Gentekaki y Lynn, 2009). Por otro lado, las regiones hipervariables de la subunidad grande (LSU) rRNA y la subunidad pequeña (SSU) rRNA han revelado una diversidad genética moderada en ciliados a nivel de población, siendo esta última la más usada para inferir relaciones entre los taxones de ciliados (Preparata et al., 1989; Finlay et al., 2006; Agatha y Strüder-Kypke, 2014). El ADN mitocondrial (ADNmt) se ha empleado poco en estudios con protistas, a diferencia de estudios similares con metazoarios (P. ej. Wörheide, 2006; Nadler y Pérez-Ponce de León, 2011; Alcántar-Escalera et al., 2013; Pérez-Ponce de León et al., 2015). Los genes mitocondriales apocitocromo *b* (*cob*) y el citocromo *c* oxidasa I (*cox-I*) se han utilizado para análisis poblacionales de ciliados. La estimación de nucleótidos intraespecíficos del gen *cob* de tres especies de ciliados del género *Coleps* mostró solo diferencias menores.

Por otro lado, el gen *cox-I* mostró diversidad genética en especies del género *Paramecium* y *Tetrahymena*, divergencia que los marcadores nucleares no habían mostrado.

Pese a la notoria variabilidad morfológica en *T. rectuncinata* ningún autor ha sugerido la utilización de herramientas moleculares para saber si también existe variabilidad genética intraespecífica. Las secuencias de *T. rectuncinata* obtenidas en el presente estudio son del gen 18S, si bien el gen *cox-I* ha reflejado mayor diversidad genética intraespecífica, las secuencias que se conocen de la familia Trichodinidae están disponibles únicamente para el gen 18S. A este nivel no existen diferencias entre las poblaciones, ya que el análisis de divergencias muestra que entre las secuencias de *T. rectuncinata* existe un intervalo general de 0 a 1.7% de diversidad, que al compararlo con el porcentaje de diversidad que presentan otros organismos de la misma familia descritos morfológicamente como especies diferentes, se podría considerar un porcentaje de diversidad muy bajo, es decir, que no existe diferencia significativa entre estas poblaciones. No obstante, queda abierta la posibilidad a un estudio más detallado con un mayor número de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales para observar estas posibles diferencias a nivel poblacional. De hecho, el empleo de un mayor número de marcadores permitiría resolver diversos problemas taxonómicos dentro de la familia Trichodinidae, como el señalado anteriormente para el género *Trichodinella*, que de acuerdo con el presente análisis en realidad sería parte del género *Trichodina*.

El ADN mitocondrial ha sido uno de los principales marcadores moleculares para estudiar organismos en estudios filogenéticos, filogeográficos, ecológicos, de evolución y biogeográficos. En algunos organismos se diferencia del ADN nuclear porque presenta un genoma de estructura simple y circular, una alta tasa de mutación y

es independiente del ADN nuclear, por lo que ha sido usado para delimitar e identificar especies, especies crípticas y describir variación genética intrapoblacional (Steinauer et al., 2007; Alcantar-Escalera, 2013). Es importante mencionar que la relación entre taxonomía y divergencia molecular ya ha sido estudiada en diversos taxones (p. ej. en crustáceos (Lefébure et al., 2006), en insectos (Pons et al., 2006), en hongos (Miller y Huhndorf, 2004; Nilsson et al., 2008), en algas (Tronholm et al., 2010), en helmintos (Brabec et al., 2015)), en donde se ha demostrado que el uso de un solo marcador molecular no refleja adecuadamente las relaciones entre especies o poblaciones, por lo que el uso de numerosos marcadores moleculares en un mismo estudio es fundamental para revelar posibles relaciones inter o intraespecíficas entre los taxones. Sin embargo, tal como se ha mencionado anteriormente, los escasos estudios moleculares con trichodínidos se han realizado para un solo marcador molecular que es el gen 18S, por lo que en este estudio se le dio prioridad a la estandarización del protocolo para el aislamiento de las células, así como para la extracción, amplificación y secuenciación del ADN, razón por la que el uso de otros marcadores moleculares no fue posible.

En cuanto a morfología es importante adicionar estudios morfométricos que nos permitan la aplicación de análisis estadísticos, para evaluar las variaciones morfológicas principalmente de los denticulos. Así, con estudios morfológicos más detallados y el uso de herramientas moleculares para la extracción y análisis de secuencias de ADN se podrá mejorar la descripción y clasificación de trichodínidos, sobre todo de aquellos que morfológicamente son muy similares o aquellos que a pesar de su evidente variabilidad morfológica son clasificados como la misma especie.

En cuanto a aspectos ecológicos derivados del presente estudio, es importante notar que, en solo tres de las 14 especies de hospederos revisadas en el presente trabajo, se registró la presencia de *T. rectuncinata*. Estas tres especies presentan hábitos similares entre sí a pesar de ser filogenéticamente lejanas, habitan en costas rocosas cubiertas por algas y de poca profundidad, incluyendo pozos de marea, y su posición en la columna de agua es en el fondo solamente (Robertson y Allen, 2015), si bien *Entomacrodus chiostictus* es también habitante de arrecifes (Kotrschal y Thomson, 1986); es decir, todos ellos tienen hábitos bentónicos en fondos arenosos de poca profundidad (Robertson y Allen, 2015). A pesar de que el resto de especies revisadas pertenecientes a ocho géneros diferentes (ver cuadro 2) también habitan en zonas intermareales, a lo largo de costas rocosas, muchas de ellas están expuestas al oleaje, por lo que tienen un nado continuo, a diferencia de las especies al principio mencionadas, que fueron halladas resguardadas bajo rocas, o entre la arena.

Los parásitos que infectan un solo taxón o taxones relacionados, se dice que muestran una especificidad filogenética respecto a su hospedero. Incluso los parásitos con un amplio rango de hospederos, muestran ciertas preferencias en sus hospederos, dichas preferencias suelen estar determinadas por los requerimientos ecológicos del hospedero. A estos parásitos se les considera con una especificidad ecológica (Rohde, 1993). La especificidad ecológica de algunos parásitos puede estar relacionada con un micro y/o macrohábitat. El microhábitat puede ser sobre o dentro del hospedero (endo o ectoparásitos) y el macrohábitat incluye aquellos componentes del nicho que también representan en hábitat de su(s) hospedero(s). Una playa arenosa, una costa rocosa o el estuario de un río, son un ejemplo de diferentes macrohabitats (Rhode, 1993). Dicha

especificidad ecológica puede tener diversas aplicaciones, como el uso de los parásitos como bioindicadores de efectos de diversos contaminantes en la calidad del agua (Palm, 2011).

Dado que *T. rectuncinata* se ha registrado en diversos hospederos con afinidades filogenéticas diferentes, se puede sugerir que tienen una asociación o especificidad más ecológica que filogenética. En primera instancia, porque en los peces en que se ha registrado tienen hábitos similares, la mayoría son bentónicos, prefieren estar cerca de sustratos como algas o rocas, muchos de ellos viven en fondos arenosos, de poca profundidad, entre algas, rocas o pastos marinos y en segunda instancia porque solo se ha registrado en branquias, y no en piel como algunos otros tricodínicos. Palm y Doberstein (1999) sugirieron el uso de datos de prevalencia y densidad de tricodínicos como indicador biológico para la biomasa bacteriana en el medio ambiente.

Es importante verificar la diversidad genética de *T. rectuncinata* con genes mitocondriales y otros marcadores moleculares y corroborar si cada variante morfológica está relacionada a una variante molecular. Igualmente, la importancia del ambiente en el establecimiento de cada haplotipo.

CONCUSIONES

- Las poblaciones de *Trichodina rectuncinata* presentaron una diversidad genética baja para el gen 18S, contrastando con la diversidad morfológica la cual se evidencia en la forma y tamaño del dentículo de las poblaciones.
- Se sugiere utilizar marcadores más variables, como es el gen mitocondrial cox-I, para explorar la variación genética intraespecífica.
- Aparentemente *T. rectuncinata* tienen una asociación ecológica hacia sus hospederos, prefiriendo peces con hábitos similares, como son los peces marinos bentónicos.
- *Entomacrodus chiostictus* se adiciona como hospedero de *T. rectuncinata* y Cuatunalco, Oaxaca como localidad donde se ha registrado *T. rectuncinata*.

REFERENCIAS

Adl, S.M., A. G. B. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, S. S. Bowser, M. W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L. L. Gall, D. H. Lynn, H. McManus, E. A. D. Mitchell, S. E. Mozley-Stanridge, L. W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C. L. Schoch, A. Smirnov y F. W. Spiegel. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429 – 493.

Agatha, S. y M. C. Strüder-Kypke. 2014. What morphology and molecules tell us about the evolution of Oligotrichea (Alveolata, Ciliophora). *Acta protozoologica* 53: 77 – 90.

Aguilar-Aguilar, R., A. G. Islas-Ortega, O. Lagunas-Calvo, N. López y H. Espinosa-Pérez. 2016. New host-parasite relationships for *Trichodina rectuncinata* (Ciliophora: Trichodinidae) on the gills of marine fishes from Mexico. *Marine Biodiversity* 46: 3 – 4.

Alcántar-Escalera, F. J. 2013. Caracterización morfológica y molecular del cistacanto de *Polymorphus brevis* Van Cleave, 1916 (Acanthocephala) en peces dulceacuícolas del centro de México. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, 52 pp.

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

Amato, A., W.H.C.F. Kooistra, J.H.L. Ghiron, D.G. Mann, T. Proschold y M. Montresor. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193 – 207.

Asmat, G. S. M. 2001. *Trichodina porocephalusi* sp. n. (Ciliophora: Trichodinidae) from an Indian Flathead Sleeper, *Ophiocara porocephalus* (Valenciennes) (Eleotrididae). *Acta Protozoologica* 40: 297 – 301.

Asmat, G. S. M., Md. M. Kibria y L. Naher. 2003. *Trichodina gulshae* sp. n. (Ciliophora: Trichodinidae) from Gangetic Mystus, *Mystus cavasisus* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Bagridae) in Chittagong. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6: 1608 – 1611.

Awise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution, 2nd edition. Sinauer, Sunderland, EUA, 684 pp.

Barth, D., S. Krenek, S. I. Fokin y T. U. Berendonk. 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 20 – 25.

Bass, D., T. A. Richards, L. Matthai, V. Marsh y T. Cavalier-Smith. 2007. DNA evidence for global dispersal and probable endemism of protozoa. *BMC Evolutionary Biology* 7: 162 – 175.

Basson, L. y J. G. van As. 1989. Differential diagnosis of the genera in the family Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichida) with the description of a new genus

ectoparasitic on freshwater fish from southern Africa. *Systematic Parasitology* 13: 153 – 160.

Basson, L. y J. G. van As. 1994. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of wild and cultured freshwater fishes in Taiwan, with notes on their origin. *Systematic Parasitology* 28: 197 – 222.

Basson, L. y J. G. van As. 1995. SEM methods for revealing structures in mobile ciliophorans. *Electron Microscopy Society of Southern Africa* 25: 68.

Brabec, J., A. Waeschenbach, T. Scholz, D. T. J. Littlewood y R. Kuchta. Molecular phylogeny of the Bothriocephalidea (Cestoda): molecular data challenge morphological classification. *International Journal for Parasitology* 45: 761 – 771.

Coleman, A. W. 2005. *Paramecium aurelia* revisited. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 68 – 77.

Corliss, J. O. 1974. The changing world of ciliate systematics: historical analysis of past efforts and a newly proposed phylogenetic scheme of classification for the protistan phylum Ciliophora. *Systematic Zoology* 23: 91 – 138.

Darling, K.F., M. Kucera y C. M. Wade. 2007. Global molecular phylogeography reveals persistent Arctic circumpolar isolation in a marine planktonic protist. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 104: 5002 – 5007.

Di Giuseppe G., M. Barbieri, A. Vallesi, P. Luporini y F. Dini. 2013. Phylogeographical pattern of *Euplotes nobilii*, a protist ciliate with a bipolar biogeographical distribution. *Molecular Ecology* 22: 4029 – 4037.

Dobberstein, R. C. y H. W. Palm. 2000. Trichodinid ciliates (Peritrichia: Trichodinidea) from the Bay of Kiel, with the description of *Trichodina claviformis* sp. n. *Folia Parasitologica* 47: 81 – 90.

Dove, A. D. M. y P. J. O'Donoghue. 2005. Trichodinids (Ciliophora: Trichodinidae) from native and exotic australian freshwater fishes. *Acta Protozoologica* 44: 51 – 60.

Drobiniak, O., Y. Kutsokon y Y. Kvach. 2014. Trichodinids (Ciliophora, Peritrichia) of *Perccottus glenii* (Actinopterygii, Odontobutidae) in three Ukrainian rivers. *Vestnik Zoologii* 48(3): 231 – 238.

Durborow, R. M. 2003. Protozoan Parasites. Southern Regional Aquaculture Center Publication 4701.

Fernández-Barajas, M. E., M. A. Monreal-Gómez y A. Molina-Cruz. 1994. Thermohaline structure and geostrophic flow in the Gulf of California, during 1992. *Ciencias Marinas* 20 (2): 267 – 286.

Finlay, B.J., G. F. Esteban, S. Brown, T. Fenchel y K. Hoef-Emden. 2006. Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist* 157: 377 – 390.

Foissner, W., A. Chao y L. A. Katz. 2007. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Journal Biodiversity and Conservation*, 17 (2): 345 – 363.

Gentekaki, E. y D. Lynn. 2009. High-level genetic diversity but no population structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River Basin (North America). *Applied and Environmental Microbiology* 75(10): 3187 – 3195.

Gentekaki, E. y D. Lynn. 2010. Evidence of cryptic speciation in *Carchesium polypinum* Linnaeus, 1758 (Ciliophora: Peritrichia) inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological markers. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57(6): 508 – 519.

Gentekaki, E. y D. Lynn. 2012. Spatial genetic variation, phylogeography and barcoding of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum*. *European Journal of Protistology* 48: 305 – 313.

Gong, Y., Y.H. Yu, E. Villalobo, F.Y. Zhu y W. Miao. 2006. Reevaluation of the phylogenetic relationship between mobilid and sessilid peritrichs (Ciliophora, Oligohymenophorea) based on small subunit rRNA genes sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53(5): 397 – 403.

Gong, Y., K. Xu, Z. Zhan, Y. Yu, X. Li, E. Villalobo y W. Feng. 2010. Alpha-Tubulin and small subunit rRNA phylogenies of peritrichs are congruent and do not support the clustering of mobilids and sessilids (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57(3): 265 – 272.

Grupcheva, G., J. Lom y I. Dyková. 1989. Trichodinids (Ciliata: Urceolariidae) from gills of some marine fishes with the description of *Trichodina zaikai* sp. n. *Folia Parasitologica* 36: 193–207.

Guillou, L., W. Eikrem, M.J. Chrétiennot-Dinet, F. Le Gall, R. Massana, K. Romari, C. Pedròs-Aliò y D. Valuot. 2004. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155: 193 – 214.

Hausmann, K. y N. Hülsmann. 1996. *Protozoology*. George Thieme Verlag, Stuttgart. 338 pp.

Heger, T. J., E. A. D. Mitchell y B. S. Leander. 2013. Holarctic phylogeography of the testate amoeba *Hyalosphenia papilio* (Amoebozoa: Arcellinida) reveals extensive genetic diversity explained more by environment than dispersal limitation. *Molecular Ecology* 22: 5172 – 5184.

Hertel, L. A., C. S. Barbosa, R. A. A. L. Santos y E. S. Loker. 2004. Molecular identification of symbionts from the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* in Brazil. *Journal of Parasitology* 90(4): 759 – 763.

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

Hoffman, G. L. 1999. *Parasites of North American Freshwater Fishes*, 2nd ed. Comstock Publishing Associates, New York, 539 pp.

Hu, Y. 2011. Description of a new genus *Heterobladetrichodina* n. g. (Ciliata: Trichodinidae) with a new species from *Ictalurus punctatus* in China. *European Journal of Scientific Research* 60(3): 334 – 341.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2005. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. San Pedro

Pochutla, Oaxaca en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/20/20324.pdf>; última consulta: noviembre 2015.

Islas-Ortega, A. G. 2013. Registro taxonómico de ciliados parásitos de la familia Trichodinidae en peces del norte de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, D.F., México, 93 pp.

Katz, L.A., G. B. McManus, O. L. O. Snoeyenbos-West, A. Griffin, K. Pirog, B. Costas y W. Foissner. 2005. Reframing the 'Everything is everywhere' debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquatic Microbial Ecology* 41: 55 – 65.

Khan, R. A., F. Díaz y M. George-Nascimento. 2008. Two new protist species, *Trypanoplasma ojeda* sp. n. (Mastigophora: Kinetoplastida) and *Trichodina lascrucensis* sp. n. (Ciliophora: Peritrichida) in a blennioid fish, *Scartichthys viridis*, from the coast of Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 585 – 590.

Knox, G. A. 2000. *The Ecology of Seashores*. CRP Press. USA. 557 pp.

Kotrschal, K. y D. A. Thomson. 1986. Feeding patterns in Eastern tropical Pacific blennioid fishes (Teleostei: Trypterygiidae, Labrisomidae, Chaenopsidae, Blennidae). *Oecologia* 70: 367 – 378.

Kruger J., J. G. van As y L. Basson. 1993. *Trichodina heterodentata* Duncan, 1977 (Ciliophora: Peritrichida), an Ectoparasite on larvae of the African clawed toad *Xenopus laevis laevis* (Daudin, 1802). *Acta Protozoologica* 32: 255 – 259.

Leaché, A. D. y M. K. Fujita. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277: 3071 – 3077.

Lefébure, T., C. J. Douady, M. Gouy y J. Gibert. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proporsal od a molecular threshold to help species delimitation. Molecular Phylogenetics and Evolution 40: 435 – 447.

Lom, J. 1958. A contribution to the systematic and morphology of endoparasitic trichodinids from amphibians with a proposal of uniform specific characteristics. Journal of Protozoology 5 (4): 251 – 263.

Lom, J. 1962. Trichodinid ciliates from fishes of the Rumanian Black Sea coast. Parasitology 52: 49 - 61.

Lom, J. 1970. Trichodinid ciliates (Peritrichida: Urceolariidae) from some marine fishes. Folia Parasitologica 17: 113 – 125.

Lom J. y I. Dyková. 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science publishers, Amsterdam, 315 pp.

López-Ochoterena, E. y G. Serrano-Limón. 1994. XX. Notas sobre la sistemática y filogenia de los protozoarios. En J. Llorente-Bousquets e I. Luna-Vega (comp.). Taxonomía Biológica. Ediciones científicas universitarias. Texto científico universitario. Ciudad de México, México, pp. 379 – 395.

Loubser, G. J., J. G. van As y L. Basson. 1995. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of some fishes from the Bay of Dakar, Senegal (West Africa). *Acta Protozoologica*, 34: 211–216.

Love M. S. y M. Moser. 1976. Parasites of California marine and estuarine fish. Faculty Publications from the Harold W. Manter, University of Nebraska – Lincoln, 520 pp.

Lowe, C. D., D.J.S. Montagnes, L. E. Martin y P. H. Watts. 2010. Patterns of genetic diversity in the marine heterotrophic flagellate *Oxyrrhis marina* (Alveolata: Dinophyceae). *Protist* 161: 212 – 221.

Lynn, D. H. 2008. The ciliated Protozoa. Characterization, classification and guide to the literature. Springer, Nueva York, EUA, 605 pp.

Lynn, D. H. 2012. Ciliophora. En *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley y Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001966.pub3

Marcotegui P. S. y S. Martorelli. 2009. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) of *Mugil platanus* (Mugiliformes: Mugilidae) and *Micropogonias furnieri* (Perciformes: Sciaenidae) from Samborombón Bay, Argentina, with the description of a new species. *Folia Parasitologica* 56(3): 167 – 172.

Martínez-Aquino, A., M. F. Reyna-Fabián, R. Rosas-Vladez, U. Razo-Mendivil, G. Pérez-Ponce de León y M. García-Varela. 2009. Detecting a complex of cryptic species within *Neoechinorhynchus golvani* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) inferred from ITSs and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 95(5): 1040 – 1047.

Martins, M. L. y L. Ghiraldelli. 2008. *Trichodina magna* van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 68(1): 169 – 172.

Martorelli, S. R., P. S. Marcotegui y P. Alda. 2008. *Trichodina marplatensis* sp. n. (Ciliophora: Trichodinidae) from Combjelly *Mnemiopsis mccradyi* (Mayer, 1900) in Argentine Sea. *Acta Protozoologica* 47: 257 – 261.

Massana R, J. Castresana, V. Balagué, L. Guillou, K. Romari, A. Groisillier, K. Valentin y C. Pedròs-Aliò. 2004. Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3528 – 3534.

Mayén-Estrada, R., M. Reyes-Santos y R. Aguilar-Aguilar. 2014. Biodiversidad de Ciliophora en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S34 – S43.

Meier, R. 2008. DNA Sequences in taxonomy. Opportunities and challenges. En *The New Taxonomy*, Q.D. Wheeler (ed.) CRC Press Taylor & Francis Group, Arizona, Estados Unidos, pp. 95 – 127.

Miao, W., Y. Yu, Y. Shen y X. Zhang. 2004. Intraspecific phylogeography of *Charchesium polypinum* (Peritrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18s-ITS1-5.8s ribosomal DNA. *Science in China Life Sciences* 47:11 – 17.

Miller, A. N. y S. M. Huhndorf. 2004. Using phylogenetic recognition to delimit species boundaries within *Lasio-sphaeria*. *Mycologia* 96(5): 1106 – 1127.

Montresor M., S. Sagrosso. G. Procaccini y W. H. C. F. Kooistra. 2003. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species. *Phycologia* 42(1): 56 – 70.

Moreno-Casasola, P., H. López-Rosas, D. Infante-Mata, I. Espejel, O. Jiménez-Orocio, M. L. Martínez, N. Rodríguez-Revelo, V. E. Espejel-González y R. Monroy. 2014. Guerrero. En M. L. Martínez, P. Moreno-Casasola, I. Espejel, O. Jimenéz-Orocio y D. Infante Mata. Diagnóstico de las dunas costeras de México. Instituto de Ecología, México, 201 – 210 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.

Nilsson, R. H., E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg y K-H. Larsson. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193 – 201.

Nowak, B. F., D. Dawson, L. Basson, M. Deveney y M. D. Powell. 2004. Gill histopathology of wild marine fish in Tasmania: potential interactions with gill health of cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 27: 709 – 717.

Özer, A. y T. Öztürk. 2004. *Trichodina puytoraci* Lom, 1962 and *Trichodina lepsii* Lom, 1962 (Peritrichida: Ciliophora) infestations on mugilids caught at the Black sea coast of Sinop in Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 28: 179 – 182.

Özer, A., T. Öztürk, Y. M. Kornychuk y V. Yurakhno. 2015. *Trichodina gobii* (Ciliophora: Trichodinidae) on whiting *Merlangius merlangus* with a checklist from Turkish and Russian coasts of the Black Sea. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 61(2): 119 – 134.

Palm, H. W. 2011. Fish parasites as biological indicators in a changing world: Can we monitor environmental impact and climate change? En H. Mehlhorn (ed.). Progress in Parasitology. Research Monographs 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 223 – 250.

Palm, H.W. y R. C. Dobberstein. 1999. Occurrence of trichodinid ciliates (Peritricha: Urceolariidae) in the Kiel Fjord, Baltic Sea, and its possible use as biological indicator. Parasitology Research 85: 726 – 732.

Penna, A., S. Fraga, C. Battocchi, S. Casabianca, M. G. Giacobbe, P. Riobó y C. Vernesi. 2010. A phylogeography study of the toxic benthic genus *Ostreopsis* Schmidt. Journal of Biogeography 37: 830 – 841.

Pérez-Ponce de León, G., A. Martínez-Aquino y B. Mendoza-Garfias. 2015. Two new species of *Phyllodistomum* Braun, 1899 (Digenea: Gorgoderidae), from freshwater fishes (Cyprinodontiformes: Goodeidea: Goodeinae) in central Mexico: An integrative taxonomy approach using morphology, ultrastructure and molecular phylogenetics. Zootaxa 4013(1): 087 – 099.

Pinzón, J. H. y T. C. LaJeunesse. 2011. Species delimitation of common reef corals in the genus *Pocillopora* using nucleotide sequence phylogenies, population genetics and symbiosis ecology. Molecular Ecology 20: 311 – 325.

Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin y A. P. Vogler. 2006. Sequence-Based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Systematic Biology 55(4): 595 – 609.

Preparata, R. M., E. B. Meyer, F. P. Preparata, E. M. Simon, C. R. Vossbrinck y D. L. Nanney. 1989. Ciliate evolution: The ribosomal phylogenies of the tetrahymenine ciliates. *Journal of Molecular Evolution* 28: 427 – 441.

Razo-Mendivil, U., E. Vázquez-Domínguez, R. Rosas-Valdez, G. Pérez-Ponce de León y S. A. Nadler. 2010. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial DNA reveals a complex of cryptic species in *Crassicutis cichlasomae* (Digenea: Apocreadiidae), a parasite of Middle-American cichlids. *International Journal for Parasitology* 40: 471 – 486.

Robertson D. R. y G. R. Allen. 2015. Peces costeros del Pacífico Oriental Tropical: Sistema de información en línea. Versión 2.0 Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Balboa, República de Panamá.

Rohde, K. 1993. Ecology of marine parasites. An Introduction to marine parasitology. 2ª edición. CAB International, California, Estados Unidos. 298 pp.

Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard y J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539 – 542.

Rossi, A., V. Boscaro, D. Carducci, V. Serra, L. Modeo, F. Verni, S. I. Fokin y G. Petroni. 2016. Ciliate communities and hidden biodiversity in freshwater biotopes of the Pistoia province (Tuscany, Italy). *European Journal of Protistology* 53: 11 – 19.

Rynearson, T.A. y E. V. Armbrust. 2004. Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* Bacillariophyceae. *Journal Phycology* 43: 34 – 43.

Sáez A. G., I. Probert, M. Geisen, P. Quinn, J. R. Young y L. K. Medlin. 2003. Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 7163 – 7168.

Sarno, D., W. C. H. F. Kooistra. L. K. Medlin, I. Percopo y A. Zingone. 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum* – like species, with the description of four new species. *Journal of Phycology* 41: 151 – 176.

SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2016. Estadísticas Ambientales. Programa de playas limpias. Resultados de Calidad de Agua de Mar. Zihuatanejo, Guerrero en http://www.semarnat.gob.mx/playas/playas_limpias/destinos/zihuatanejo, última consulta: agosto 2016.

Shwani, A. A. A., S. M. A. Abdullah y G. Asmat. 2010. Two New Species of *Trichodina* Ehrenberg, 1830 (Ciliophora: Trichodinidae) from *Silurus triostigus* in Iraq. *European Journal of Scientific Research* 40: 598 – 604.

Silva-Briano, M., E. Suárez-Morales, A. Adabache Ortiz y M. Reyes-Flores. 2011. Two species of *Mastigodiatomus* (Copepoda: Diaptomidae), host of the epibiotic ciliate *Trichodina diaptomi* (Peritrichia) in North America. *Journal of Limnology* 70(2): 329 – 333.

Šlapeta, J., P. López-García y D. Moreira. 2006. Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 23: 23 – 29.

Sleigh, M. A. 1991. The nature of Protozoa. *Parasitic Protozoa*, 2nd ed. J.P. Kreier and J. R. (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, California p. 1-53.

Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic analysis and Post-analysis of large phylogenies *bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033

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

Su, X. y R. W. G. White. 1995. Trichodinid parasites (Ciliophora: Peritricha) from the gills of some Australian marine fishes. *Systematic Parasitology* 32: 53 – 59.

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.

Tang, F.H., Y.J. Zhao y A. Warren. 2013. Phylogenetic Analyses of Trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophora) Inferred from 18S rRNA Gene Sequence Data. *Current Microbiology* 66: 306 – 313.

Tang, F. H., Y. Zhang y Y. Zhao. 2016. Morphological and molecular of the new species, *Trichodina pseudoheterodentata* sp. n. (Ciliophora, Mobilida, Trichodinidae) from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in Chongqing China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. DOI: 10.1111/jeu.12335.

Treasurer, J. W. 1997. Parasites of wrasse (Labridae) in inshore waters of west Scotland stocked as cleaner fish of sea lice (Caligidae) on farmed Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 50: 895 – 899.

Tronholm, A. 2010. Species delimitation, taxonomy, and biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 46: 1301 – 1321.

Valladão, G. M. R., L. G. Giannecchini, M. L. Martins y S. Benites de Pádua. 2015. *Trichodina modesta*: an exotic ciliate in the Neotropical region parasitizing an unusual host. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal* 24(2): 162 – 167.

Van As, J. G. y L. Basson. 1987. Host specificity of trichodinid ectoparasites of freshwater fish. *Parasitology Today* 3: 88 – 90.

Van As, J. G. y L. Basson. 1989. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids. *Systematic Parasitology* 14: 157 – 179.

Van As, J. G. y L. Basson. 1992. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of freshwater fishes of the Zambesi River System, with a reappraisal of host specificity. *Systematic Parasitology* 22: 81 – 109.

Wlasow, T., I. Zmyslowska, D. Lewandowska, K. Mierzejewska, R. Idzikowski y E. Ziomek. 2003. Bacteria and parasites on the gills of pike *Esox lucius* L. and tench *Tinca tinca* (L.) as indices of the trophic level of Oświn lake (Northeastern Poland). *Archives of Polish Fisheries* 11: 225 - 235.

Wörheide, G. 2006. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequence in the coralline demospone *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific. *Marine Biology* 148(5): 907 – 912.

Xu, K. 2007. Trichodinid Ectoparasites (Ciliophora, Peritrichia) from the Tiger Puffer *Takifugu rubripes* in the Yellow Sea, with Revision of *Trichodina jadratica* Raabe, 1958. *Acta Protozoologica* 46: 311 – 324.

Xu, K., M. Fanlin y W. Song. 2000. Scanning electron microscopic observations on the histopathology of trichodiniasis of the mariculture fish, *Lateolabrax japonicas*. *Journal of Ocean University of Qingdao* 30(3): 418 – 422.

Xu, K., W. Song y A. Warren. 1999. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) from the gills of cultured marine fishes in China, with the description of *Trichodinella lomi* n. sp. *Systematic Parasitology* 42: 219 – 227.

Xu, K., W. Song y A. Warren. 2002. Taxonomy of trichodinids from the gills of marine fishes in coastal regions of the Yellow Sea, with descriptions of two new species of *Trichodina* Ehrenberg, 1830 (Protozoa: Ciliophora: Peritrichia). *Systematic Parasitology* 51: 107 – 120.

Xu, K., W. Song, A. Warren y J. K. Choi. 2001. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of some marine fishes from coastal regions of the Yellow Sea and Bohai Sea. *Systematic Parasitology* 50: 69 – 79.

Yin, W., C. Fu, L. Guo, Q. He, J. Li, B. Jin, Q. Wu y B. Li. 2009. Species delimitation and historical biogeography in the genus *Helice* (Brachyura: Varunidae) in the Northwestern Pacific. *Zoological Science* 26: 467 – 475.

Zamorano, P. y M. E. Hendrickx. 2012. Moluscos de aguas profundas del sur del Golfo de California. En P. Zamorano, M. E. Hendrickx y M. Caso-Chávez (eds.). *Biodiversidad y comunidades del talud continental del Pacífico mexicano, México*, 243 – 281.

Zhan, Z., K. Xu, A. Warren y Y. Gong. 2009. Reconsideration of Phylogenetic Relationships of the Subclass Peritrichia (Ciliophora, Oligohymenophorea) Based on Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences, with the Establishment of a New Subclass Mobilia Kahl, 1933. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(6): 552 – 558.

Zhan, Z., K. Xu y M. Dunthorn. 2012. Evaluating molecular support for and against the monophyly of the Peritrichia and phylogenetic relationships within the Mobilida (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Zoologica Scripta* 42(2): 213 – 226.

APENDICE I

TÉCNICA DE NITRATO DE PLATA “EN SECO” DE KLEIN

Reactivos

- Nitrato de Plata 5%
- Bálsamo de Canadá

Procedimiento

Se coloca una gota de muestra al centro de un portaobjetos y se deja secar. Una vez seca se le agrega la solución de Nitrato de Plata al 5% hasta cubrir el total de la muestra y se dejan pasar 5 minutos. Después de ese tiempo se lava con agua destilada dos veces y se coloca bajo una lámpara de rayos UV durante 5 minutos (evitando que se seque la muestra). Ya que pasó el tiempo indicado se retira el portaobjetos de la lámpara y se deja secar, posteriormente se monta con bálsamo de Canadá.

APENDICE II

ÁREAS DE ESTUDIO

La zona intermareal se encuentra entre los niveles superior e inferior de marea, se caracteriza también por las condiciones extremas a las que están sujeta las comunidades, formando una variedad de ambientes litorales, como son las playas rocosas o arenosas y los sitios donde las aguas dulces de los ríos se unen al mar, donde la flora y la fauna resisten cambios considerables en los valores de salinidad y temperatura del agua, recibiendo altas concentraciones de nutrientes que les confieren una productividad alta (Knox, 2000).

“El Palmar”, Zihuatanejo, Guerrero

Esta área se encuentra al sureste de la bahía de Ixtapa, Zihutanejo, Guerrero (17°38'58.24"N y 101°36'00.31" O); el clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la temporada de lluvias se produce entre abril y agosto y la estación seca está presente desde septiembre a marzo. Es objeto de moderado a fuerte oleaje que depende de la temporada, el nivel medio de la marea es de 60 cm. La temperatura media anual es de 26,9 °C, el rango de temperatura a lo largo del año es 21 a 30 °C. (Moreno-Casasola et al., 2014)

Playa El Palmar ha sido certificada como "Playa Limpia" por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación AC debido a su correcta calidad sanitaria, que es supervisada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) y la Comisión Federal Para La Protección de Riesgos Sanitarios (Cofepris) y la Secretaría de Salud, estos niveles de calidad del agua se mantienen a lo largo de los años desde 2006.

Los análisis físico-químicos en PTAR (plantas de tratamiento de aguas residuales) en El Palmar en marzo de 2013 indican que el pH, la temperatura, el cloro residual, la DBO (demanda biológica de oxígeno), la DBQ (demanda química de oxígeno), los sólidos suspendidos y los coliformes fecales están por debajo de los límites máximos permitidos (SEMARNAT, 2016)

San Carlos, Sonora

La Bahía de San Carlos (27°56'N, 111° 5'O) se encuentra en el municipio de Guaymas, Sonora; esta bahía pertenece al Golfo de California, que es una cuenca alargada y estrecha que constituye un mar marginal del Océano Pacífico. La topografía corresponde a una cuenca compleja, donde se registran desde abanicos sedimentarios de pendientes suaves en el norte, mismos que se interrumpen bruscamente por una serie de escarpes accidentados hasta llegar a formar paredes casi verticales en el canal de Ballenas, hasta los cañones submarinos. Otra característica del golfo es la extensión de la plataforma continental en su margen oriental y una fuerte reducción, hasta su casi ausencia, en el lado opuesto (Fernández-Barajas et al., 1994; Armando-Buenrostro et al., 2003 en Zamorano y Hendrickx, 2012).

Cuatunualco, Oaxaca

Catunualco (15°41'8.98"N, 96°20'26.343"O) pertenece al municipio de San Pedro Pochutla, en el estado de Oaxaca. Este municipio colinda al sur con el Océano Pacífico. La región de La Costa, va a lo largo del Océano Pacífico. Limita al norte con la región de la Sierra Sur; al este con El Istmo de Tehuantepec; al oeste con el Estado de Guerrero

y al sur con el Océano Pacífico. El municipio presenta un clima caluroso con temperaturas que van de los 22 °C hasta los 38 °C, con lluvias durante el verano (INEGI, 2005).